



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca
Maestría en Ciencias Bioquímicas



**Estudio de la interacción de hongos endófitos-orquídea en el
desarrollo vegetal**

Tesis Profesional

Como requerimiento para obtener el título de

Alumno:

David Guadalupe Cruz Torres

Comité tutelar:

Director: Dra. Candy Carranza Álvarez

Codirector: Dr. Raúl Ocampo Pérez

Asesor: Dr. Domingo Soto Martínez

Ciudad Valles San Luis Potosí, octubre 2023



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca



FACULTAD DE
ESTUDIOS PROFESIONALES
ZONA HUASTECA
UASLP

Maestría en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la interacción de hongos endófitos-orquídea en el
desarrollo vegetal

Tesis Profesional

Como requerimiento para obtener el título de

Alumno:

David Guadalupe Cruz Torres

Comité

Director: Dra. Candy Carranza Álvarez

Codirector: Dr. Raúl Ocampo Pérez

Domingo Martínez Soto

Asesor: Dr. Domingo Soto Martínez

Ciudad Valles San Luis Potosí, octubre 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES ZONA HUASTECA

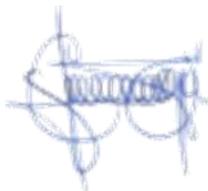
**“Estudio de la interacción de hongos endófitos-orquídea en
el desarrollo vegetal”**

”

SINODALES:



Dra. Gabriela Pérez Flores
Presidente



Dra. Candy Carraza Álvarez
Secretario



Dr. Raúl Ocampo Pérez

Vocal

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Ciencias Ambientales de la Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí bajo la Dirección de la Dra. Candy Carranza Álvarez con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), bajo el CVU 1149281.

i. Agradecimiento Institucionales

Agradezco a el laboratorio de ciencias ambientales, laboratorio de ciencias básicas, de microbiología y al laboratorio de ciencias biomédicas de la FEPZH por facilitarme el acceso a sus instalaciones necesario para culminar con la presente tesis.

A la Facultad de Ciencias Químicas UASLP por proporcionar acceso a sus laboratorios para poder realizar parte de la presente tesis.

Al proyecto "Fortalecimiento del sistema Jardín Botánico de la UASLP para la conservación y visibilización de la riqueza biocultural y la difusión e intercambio del conocimiento etnobiológico" con clave 321352 por facilitarme el financiamiento de los reactivos utilizados.

ii. Agradecimientos

A los integrantes del laboratorio de ciencias ambientales de la FEPZH por su gran acogida y todas las facilidades concedidas para desempeñarme.

A la Doctora Candy Carranza Álvarez por su gran disposición, enseñanzas en la investigación y en singular por su gran amabilidad y comprensión.

Al Doctor Domingo Soto por orientarme en el desarrollo de la parte experimental, por su gran disposición y por la disposición del material vegetal.

Al Doctor Raúl Ocampo Pérez, le agradezco su hospitalidad en mi estancia en la Facultad de Ciencias Químicas y por su gran paciencia conmigo.

A Alejandra Morales López por su inconmensurable apoyo, su perspicacia y amabilidad en el transcurso de este proyecto.

A mis padres por su gran cariño y devoción, sus enseñanzas siempre repercutirán en mis logros, son y serán la piedra angular de mis proezas.

A mi hermano por los momentos divertidos y las ocurrencias que me hacen reír incluso en momentos no tan agradables.

A mis abuelitos por su gran confianza y cariño, son un gran pilar en mi formación.

A la Psicología Liliana Leyva por sus enseñanzas y su muy acertada guía para ayudarme a resolver mis conflictos.

«El ayer es historia, el mañana es un misterio, pero el hoy es un regalo. Por eso se le llama presente»

iii. RESUMEN

Stanhopea tigrina es una orquídea que se encuentra en peligro de extinción y es endémica de México, la germinación y desarrollo simbiótico de las orquídeas en ocasiones genera dificultades debido al rápido crecimiento de los hongos, la utilización de un sistema que permita la interacción del hongo y la orquídea es una herramienta necesaria, por lo cual se tiene como objetivo evaluar el efecto de la interacción hongo-planta y el carbón activado F-400 durante el crecimiento vegetal *Stanhopea tigrina*, así se comen el establecimiento de los hongos, *Trichoderma sp-A*, *Trichoderma sp-B*, *Lasiodiplodia macrospora* y *Penicillium sp.* en *Arabidopsis thaliana*, utilizando dos sistemas para la evaluación del crecimiento y germinación, en el primero se utilizó placas de Petri sencillas donde las semillas y plántulas tendrían un contacto directo con el hongo y otro en donde se tendría un contacto indirecto utilizando placas de Petri con división, mostrando diferencias significativas *lasiodiplodia macrospora* en longitud de hipocótilo y de raíz, peso total y clorofila en ambos sistemas, además *Trichoderma sp-A* destaco significativamente en longitud de raíz primaria, peso total, cantidad de clorofila y carotenoides en ambos sistemas así como en la germinación en el sistema división, en la absorción de las cepas con ayuda de un reactor se absorbió *lasiodiplodia macrospora* en el carbón activado, este mostro una viabilidad hasta por 3 meses, se encontró que el carbón activado era capaz de absorber con eficiencia has 4 ml de *lasiodiplodia macrospora* a 10^8 EPM, por último se estableció la germinación de *Stanhopea tigrina* con *lasiodiplodia macrospora* adsorbido en el carbón demostrando una eficiencia del 95%, por otra parte el cultivo con este hongo promovió el desarrollo en hasta 3 veces de hojas y brotes en *Stanhopea tigrina*. En conclusión, la adsorción de *lasiodiplodia macrospora* en el carbón activado F-400 para la promoción de crecimiento de *Stanhopea tigrina* fue realizada con éxito.

Contenido

i.	Agradecimiento Institucionales.....	ii
ii.	Agradecimientos	iii
iii.	RESUMEN	iv
I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Objetivos e hipótesis	2
1.1.1	Objetivo general.....	2
1.1.2	Objetivos específicos.....	2
1.1.3	Hipótesis.....	3
1.2	Justificación	3
II.	MARCO TEÓRICO	4
2.1	Orquídeas	4
2.1.2	limitantes en el desarrollo de las orquídeas	4
2.2	Interacciones ecológicas de las orquídeas	5
2.2.1	Relación con sus polinizadores.....	6
2.2.2	La interacción hongo-orquídea	7
2.2.2.1	Hongos micorrícicos	7
2.2.2.2	Hongos endófitos de orquídeas	8
2.3	<i>Stanhopea tigrina</i>	9
2.4	Hongos asociados a <i>Stanhopea tigrina</i>	11
2.4.1	Lasiodiplodia.....	12
2.4.2	Penicillium	13
2.4.3	Trichoderma	14
2.5	Cultivo <i>in vitro</i> vegetal.....	15
2.5.1	Micropropagación	16
2.6	Tipos de sustrato empleados en el CTV	18
2.6.1	Corteza de pino	19
2.6.2	Fibra de coco	19
2.6.3	Perlita o agrolita	19
2.6.4	Carbón	20
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1	Cultivo de hongos.....	21

3.2 Germinación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
3.3 Evaluación de cepas fúngicas aisladas de <i>Stanhopea tigrina</i> en el desarrollo vegetal de en <i>A. thaliana</i>	21
3.4 Adsorción de <i>Lasiodiplodia macrospora</i> en carbón activado F-400	22
3.5 Evaluación de la viabilidad de <i>Lasiodiplodia macrospora</i> en el carbón activado F-400.	23
3.6 Evaluación de la promoción de crecimiento de protocormos de <i>Stanhopea tigrina</i>	23
3.7 Subcultivo de <i>S. tigrina</i> previamente estimulado por <i>Lasiodiplodia macrospora</i> en el carbón activado F-400.....	24
3.8 Determinación de clorofila.....	24
3.8 Análisis estadístico	25
3.9 Diseño experimental	25
IV. RESULTADOS	27
4.2 Evaluación de <i>Trichoderma sp-A</i> , <i>Trichoderma sp-B</i> , <i>Lasiodiplodia macrospora</i> y <i>Penicillium sp.</i> en la promoción de crecimiento en <i>A. thaliana</i> en placas divididas.....	29
4.2.1 Interacción de cepas de rápido crecimiento con <i>A. thaliana</i>	29
4.2.2 Experimento con cepas de lento crecimiento.....	31
4.3 Efecto de <i>Trichoderma sp-A</i> , <i>Trichoderma sp-B</i> , <i>Lasiodiplodia macrospora</i> y <i>Penicillium sp.</i> en la promoción de crecimiento en <i>A. thaliana</i>	33
4.3.1 Efecto de cepas de lento crecimiento sobre el crecimiento de <i>A. thaliana</i>	36
4.4 Evaluación de la germinación de <i>A. thaliana</i>	37
4.5 Fijación de <i>Lasiodiplodia macrospora</i> en carbón activado	38
.....	40
4.6 Características de crecimiento de <i>Lasiodiplodia macropora</i> en el carbón activado F-400.....	40
4.7 Germinación y desarrollo simbiótico de protocormos de <i>Stanhopea tigrina Bateman</i>	42
V DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
VI. CONCLUSIONES	51
VII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	52
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

índice de figuras y tablas

Figura 1	7
Figura 2	10
Figura 3	11
Figura 4	12
Figura 5	15
Tabla 1	25
Tabla 2	26
Tabla 3	27
Figura 6	30
Figura 7	30
Figura 8	31
Figura 9	32
Tabla 4	33
Figura 10	34
Figura 11	35
Figura 12	36
Tabla 5	37
Figura 13	38
Figura 14	39
Figura 15	40
Figura 16	41
Tabla 6	41
Figura 17	42
Figura 18	43
Figura 19	44
Figura 20	45
Figura 21	45

I. INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae se considera una de las familias más diversas dentro de las plantas angiospermas, es ampliamente conocida por su gran complejidad de morfología, por sus singulares flores de simetría bilateral. Esta familia posee un importante papel biológico debido a sus compuestos volátiles y a los pigmentos exuberantes expresados, que pueden llegar a ser específicos para captar la atención de ciertos polinizadores (Gantait, 2021). En México, la familia Orchidaceae ocupa el tercer lugar a nivel familia con alrededor de 1,400 especies y más de 170 géneros, sin embargo, se considera que del total de orquídeas endémicas en México, 73 especies (40 %) se clasifican en alguna categoría de riesgo de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010, esto se atribuye a la falta de microorganismos y polinizadores, causando bajas tasas de germinación de sus semillas, dado que estas carecen de los nutrientes necesarios para su germinación por lo que recurren a interacciones micorrícicas (Jersáková *et al.*, 2006).

Las orquídeas representan un ejemplo de interacciones mutualistas o simbióticas, ejemplo de ellas son generas con hongos micorrícicos o la relación con sus hongos endófitos (Cazar y Pérez, 2019), ya sea para la germinación, supervivencia y desarrollo de la semilla, debido a que en la asociación hongo-planta, el hongo es el encargado de favorecer la solubilidad y adsorción de nutrientes necesarios para el desarrollo de las orquídeas en las etapas de semilla y protocormo, dado que, en este momento las orquídeas son incapaces de desarrollarse solas (León y Romero 2017). En la etapa adulta las orquídeas siguen necesitando ayuda de los hongos, estos tienen la capacidad de expresar metabolitos capaces de inhibir el crecimiento de agentes patógenos, de tal manera que la planta provee carbohidratos simples al hongo, y este la abastece de minerales, a través de su micelio y le brinda protección contra patógenos (Rajani, 2021).

En las investigaciones de cultivos *in vitro* para comprender y contribuir a la conservación de las orquídeas, se han diseñado diversos protocolos biotecnológicos empleando herramientas del cultivo de tejidos vegetales (CTV) en

medios de cultivo sintéticos y bajo condiciones controladas. En estos sistemas se ha reportado que la utilización de carbón activado beneficia en el desarrollo de las orquídeas reduciendo la presencia de gas etileno, estimulando la aparición de raíces y rizomas, equilibrando la concentración de los nutrientes y las hormonas de crecimiento adicionadas en los cultivos (Morales *et al.*, 2003, Chutipaijit y Sutjaritvorakul, 2018). Además, debido a sus propiedades de adsorción se favorece la liberación gradual de los nutrientes que se incorporen en el medio, para apoyar el crecimiento de manera eficaz (Manokari *et al.*, 2021).

Así mismo, algunos estudios recientes han demostrado que el uso de carbón activado como soporte para los hongos es una opción viable para la investigación de las relaciones hongo-orquídea, logrando avances importantes en diversas plantas, en la colonización de raíces de *Solanum tuberosum* L. se encontró el mejoramiento del crecimiento; favoreciendo la disponibilidad de fósforo para las plantas como *Zea mays* L., y reduciendo la biodisponibilidad de metales pesados (Rafique, 2019; Abou, 2021; Yang Q, 2022). No obstante, no se han encontrado reportes de los beneficios del uso de carbón activado en orquídeas. Por ello, el objetivo del presente proyecto fue evaluar el efecto de la interacción simbiótica hongo-planta y el carbón activado F-400 en el crecimiento vegetal de *S. tigrina*, utilizando un modelo vegetal *in vitro*.

1.1 Objetivos e hipótesis

1.1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la interacción hongo-planta y el carbón activado F-400 durante el crecimiento vegetal *Stanhopea tigrina*.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Determinar el efecto benéfico en la promoción de crecimiento de hongos endófitos aislados *Stanhopea tigrina*.
- b) Establecer un sistema de interacción entre *Arabidopsis thaliana* y hongos endófitos de *Stanhopea tigrina*.

- c) Evaluar el desarrollo *Arabidopsis thaliana* en interacción con los hongos endófitos
- d) Evaluar los efectos de la interacción simbiótica sobre el desarrollo y germinación de *Stanhopea tigrina*.
- e) Realiza curvas de adsorción de los hongos endófitos sobre el carbón activado F-400.
- f) Evaluar distintas masas de carbón activado como soporte para las cepas fúngicas.
- g) Evaluar la capacidad de promoción de crecimiento en hojas y brotes en la vitroorquídea *Stanhopea tigrina* del carbón activado inoculado con las cepas fúngicas.

1.1.3 Hipótesis

Los hongos aislados de plantas silvestres de *S. tigrina* promueven el desarrollo y crecimiento de dichas orquídeas cultivadas *in vitro*.

1.2 Justificación

Los hongos endófitos tienen un papel importante en la nutrición de las plantas además ayudan a inhibir fitopatógenos y a estimular el crecimiento vegetal en diferentes etapas del ciclo de vida de las plantas. Las orquídeas están en simbiosis con hongos la cual es necesaria para cumplir algunos procesos como la germinación de las semillas. Por ello, es necesario comprender estas interacciones utilizando condiciones controladas que permitan analizar y desmenuzar los mecanismos que rigen dichas interacciones. Para lograr entender este fenómeno se utilizarán plantas modelo como *A. thaliana*, y posteriormente se evaluará el efecto de la interacción hongo-planta en vitroorquídeas de *S. tigrina*. Esto ayudará a comprender la interacción entre los hongos endófitos y las orquídeas silvestres, además podrá ser aplicado a la mejora de los sistemas de multiplicación *in vitro* y aclimatación al medio exterior.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Orquídeas

El género *Orchidaceae* son un grupo de plantas que tienen características bien definidas como simetría bilateral, semillas diminutas, un pétalo denominado labelo extremadamente complejo, estambres, carpelos con flores y fragancias exuberantes (Lakshman, 2020). Otra de sus características biológicas importantes es que son plantas herbáceas, con hojas perenes y un ciclo de vida largo (Zhang, 2018).

La familia *Orchidaceae* es la más rica en biodiversidad contando con más de 31,000,000 especies (Real Jardín Botánico, 2021) alrededor del mundo, y un total de 1314 especies de orquídeas reportadas para México, siendo casi la mitad de estas especies endémicas del país (Gámez *et al.*, 2017; Hassler, 2023).

2.1.2 limitantes en el desarrollo de las orquídeas

Poseen características que las hacen únicas entre el resto de las plantas, aun así, un alto porcentaje de orquídeas se encuentran en algún grado de peligro en México, ya que según la NOM-059-SEMARNAT 2010 y la Red list en el 2023, se encuentran amenazadas poco más de 40%. Esto se debe a múltiples factores, principalmente los derivados de las acciones antropológicas sobre el medio ambiente, lo cual ha contribuido a la disminución de polinizadores disponibles para orquídeas (Faleiro, 2018), al comercio inadecuado de especies amenazadas por falta de conocimiento de los comerciantes, el desinterés en la vinculación entre las autoridades e investigadores (Hinsley, 2017), al cambio climático y la invasión de su hábitad que contribuye a la modificación de las interacciones ecológicas subyugándolas a altos niveles de estrés y disminuyendo su tasa de reproducción (Fay, 2018).

Otro tipo de limitantes subyacentes a los antropogénicos que afectan el desarrollo de las orquídeas, son los factores abióticos como la sequía (a pesar de que algunas

orquídeas cuentan con pseudobulbos), dado que los periodos de sequía son cada vez más extensos en los que puede disminuir su metabolismo fotosintético (Li *et al.*, 2019). Por otro lado, los cambios drásticos de la temperatura ambiental y el estrés salino pueden causar deterioro en la síntesis de clorofila, daños en el fotosistema II y una elevación de especies reactivas de oxígeno (Higashi y Saito, 2020; Tatcharoen, 2023), asimismo, el estrés por metales pesados puede causar marchitamiento, clorosis e inhibición de síntesis de proteínas (Kumar y Verma, 2018). En adición a estos factores se encuentran los factores bióticos, estos son convergentes a los anteriores debido a que, si se ven afectados los factores abióticos modifican la variedad de microorganismos que habitan en los alrededores (Chodak *et al.*, 2015) causando la aparición de diferentes agentes patógenos como los hongos, estos pueden causar enfermedades como la mancha foliar causada por *Nigrospora oryzae* o *Cladosporium cladosporioides* (Jain *et al.*, 2021), asimismo, cepas emergentes de *Fusarium* causan la muerte de las orquídeas en etapas tempranas del desarrollo, mientras que en la planta adulta causan tizón en la hojas y en la flores manchas necróticas (Srivastava, 2018). El hongo *Colletotrichum* es uno de los agentes causales principales que afecta a las orquídeas que se comercializan afectando su apariencia causando la antracnosis, la cual genera manchas de color café oscuro o negras en las hojas de las orquídeas y pueden llegar a marchitar toda la planta (Park *et al.*, 2020).

2.2 Interacciones ecológicas de las orquídeas

Las orquídeas son conocidas como una de las plantas mejor adaptadas al medio ambiente, sin embargo, como se mencionó anteriormente, diversos factores han impactado demasiado su hábitat, pero la relación que éstas tienen con diferentes organismos son las que le han permitido su hegemonía en casi todos los continentes.

2.2.1 Relación con sus polinizadores

El vínculo de las orquídeas con sus polinizadores es aún, un poco incierto para los investigadores, debido a la complejidad con que se lleva a cabo, existiendo diversos sistemas de polinización, como la polinización engañosa (Jersáková *et al.*, 2006), en la cual, la orquídea emite aromas similares a los de una hembra insecto, atrayendo al macho con engaños de reproducción o de alimentación, sin embargo, sólo recibe pequeñas cantidades de carbohidratos y minerales de las orquídeas (Shrestha *et al.*, 2020). Esta poca disposición favorece a la reducción de la autopolinización mejorando la tasa de semillas viables (Castro y Singer, 2019), no obstante, esto ha causado que algunas abejas y moscas prefieran polinizar otro tipo de plantas que ofrecen néctar (Jersáková, y Johnson, 2006). Estudios como el de Ackerman *et al.* (2023), muestran que un tercio de las orquídeas poseen solo un polinizador denotando la gran especialización, en consecuencia, ha ocasionado en los últimos años tazas de reproducción bajas, debido a la falta del polinizador específico.

Además de las fragancias, las orquídeas poseen un espectro de colores especialmente adaptado para sus polinizadores, debido a la variedad de sistemas oculares presentes en la naturaleza, mostrando una convergencia de la adaptabilidad de las orquídeas con la morfología y las características particulares de los polinizadores (Martín-Rodríguez, 2010). Las aves muestran particularmente preferencias para las orquídeas de espectro rojizo-anaranjado (Burd *et al.*, 2014), las abejas que es su principal polinizador se ven atraídos por puntos de brillo variables aproximadamente dentro de 400-500 nm (violeta-azul), mientras que las moscas prefieren longitudes de onda larga dentro del espectro amarillo.

Por último, se ha descrito que las orquídeas son capaces de mimetizar la morfología de sus polinizadores, un ejemplo de esto es *Ophrys speculum* las cuales imitan características físicas de la avispa hembra *Dasyscolia ciliata*, esta puede expresar algunos compuestos orgánicos similares a las feromonas de la hembra (engaño sexual) (Baguette *et al.*, 2020). Como se puede denotar las especies de la familia

Orchidaceae poseen estrechas relaciones ecológicas con sus polinizadores, en algunos casos hasta dependientes, obteniendo así un gran nicho ecológico.

2.2.2 La interacción hongo-orquídea

La importancia de los hongos en el desarrollo de las orquídeas no está ligada a una sola etapa de su desarrollo sino a la largo de toda su vida (Figura 1), desempeña diferentes propósitos (germinación, crecimiento, asimilación de nutrientes, maduración, etc), esta interacción está ligada al tipo de hongo que la coloniza que pueden ser hongos micorrícicos y endófitos.

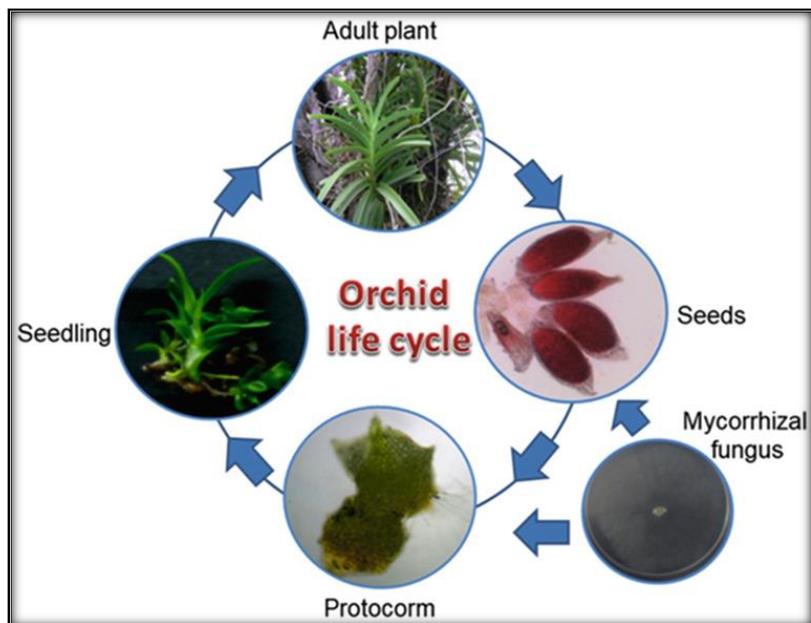


Figura 1. Esquema del apoyo de los hongos en diferentes etapas de la vida de las orquídeas.

2.2.2.1 Hongos micorrícicos

En la etapa de germinación de las semillas, los hongos cumplen con su papel más importante, las orquídeas poseen cápsulas con millones de semillas diminutas que carecen de endospermo, siendo este la principal fuente de nutrientes en la etapa de

germinación (Pujasatria *et al.*, 2020), por ello, las semillas no germinan directamente sino que estas pasan por una etapa intermedia denominada protocormo, antes de esta etapa ellas son heterótrofos, de esta forma los hongos ingresan por un costado de la semillas para colocarse dentro y producir pelotones, estructuras enrolladas de hifas, las cuales son adsorbidas por las células de las semillas y están en constante producción-asimilación hasta la formación del protocormo (Valadares *et al.*, 2020), en donde las orquídeas ya son capaces de realizar fotosíntesis y al entrar en contacto con los hongos, le es posible entrenar su sistema inmunitario por actividades de polifenol oxidasa, ácido ascórbico oxidasa, la peroxidasa y la catalasa (Chen *et al.*, 2017). Aunque las orquídeas necesitan de la interacción con el hongo, estas requieren asociaciones específicas así que, a pesar de la presencia de hongos que puedan participar en la germinación, si éste no es el adecuado para ellas, no se dará la simbiosis (Meng *et al.*, 2019).

Posteriormente, durante la etapa del desarrollo, los hongos siguen interactuando con las plantas en menor o mayor manera dependiendo de la asociación de las orquídeas, si son mico heterótrofas (dependientes de la síntesis de carbono de los hongos), parcial (no dependientes totalmente de las micorrizas) o autótrofa (es capaz de sintetizar su alimento por si sola (Merckx *et al.*, 2013; Těšitel *et al.*, 2018). Las relaciones presentadas durante la germinación pueden cambiar por otros hongos (Meng *et al.*, 2019), encontrándose múltiples interacciones a lo largo de su vida que favorecen la obtención de su alimento (Hou *et al.*, 2009), secreción de hormonas y metabolitos para sus huéspedes como ácido indol acético, compuestos fenólicos (Shah *et al.*, 2022; Mandal, 2010), ayudando en la solubilización de fosfatos y síntesis de amoníaco (Chand, 2020). Estos compuestos ayudarán a mejorar la calidad del crecimiento, así como la senescencia y el metabolismo basal de las orquídeas contribuyendo a la síntesis y catabolismo de aminoácidos (Lallemand *et al.*, 2019), por ello, es de suma importancia la relación orquídea-hongo.

2.2.2.2 Hongos endófitos de orquídeas

Los hongos endófitos son un grupo de hongos capaces de colonizar los tejidos, principalmente las raíces y están en armonía con la planta por lo que no se producen enfermedades o mutaciones morfológicas, dado que en muchos casos actúan como agentes benéficos (Selosse *et al.*, 2022).

Los hongos también se involucran en el sistema de defensa de las orquídeas, sintetizando compuestos antimicrobianos que pueden ser de distinta naturaleza, tales como compuestos orgánicos volátiles o compuestos difusibles (Tyc *et al.*, 2017), como terpenoides o fenilpropanoides, compuestos que tienen nitrógeno, ácido indolacético y pirazinas (Astuti *et al.*, 2014), y los compuestos difusibles por el medio como ginsenoides, y compuestos derivados del alcohol (Qi *et al.*, 2018), los cuales le confieren una mayor oportunidad contra patógenos fúngicos tanto a nivel de raíces como de tallo y hojas (Yuan *et al.*, 2018), funcionan también como control biológico contra el ataque de insectos (Moraga, 2020), asimismo la sola presencia de estos hongos saprófitos hace poco viable la instalación de los patógenos ya que se encuentran pocos nutrientes disponibles, generando una competencia por la supervivencia (Favre-Godal, 2020).

Otra característica de los hongos es la capacidad de asistir en la tolerancia al estrés biótico, se ha reportado que los hongos mejoran la resistencia a la sequía en orquídeas epifitas que tienen menos acceso al agua (McCormick *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2022), mitigan el impacto y apoyan en la adaptación en suelos contaminados por metales pesados (Herrera *et al.*, 2018). Por todos estos factores la abundancia de ciertas orquídeas está limitada a la diversidad o riqueza de los microbiomas para esparcir su población (Lu *et al.*, 2021), siendo esta una de las relaciones más ampliamente estudiada, pero a su vez una de las la más compleja.

2.3 *Stanhopea tigrina*

Esta orquídea es principalmente de hábito epifito, aunque también se encuentra con crecimiento litófito, posee pseudobulbos globosos y cuenta con solo una hoja terminal (Hágsater y Soto, 2003). Produce una o dos flores de hasta 15 cm largo,

de color amarillo paja con manchas violetas y con un aroma llamativo a chocolate, tiene un labelo distintivo conformado de tres estructuras y termina en dos similares a unos cuernos (Figura 2), por lo cual comúnmente se le llama orquídea vaquita (Moreno-Martínez y Menchaca-García, 2007). Es endémica de México y se encuentra principalmente en la sierra madre oriental en los estados de Querétaro, Hidalgo, Veracruz, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas, en el sur de Oaxaca y en el sur de Nuevo León (Figura 3) (Hernández de la Cruz *et al.*, 2022).



Figura 2. Fotografía de *S. tigrina* en estado silvestres floreado tomada de Castillo-Pérez, 2018.

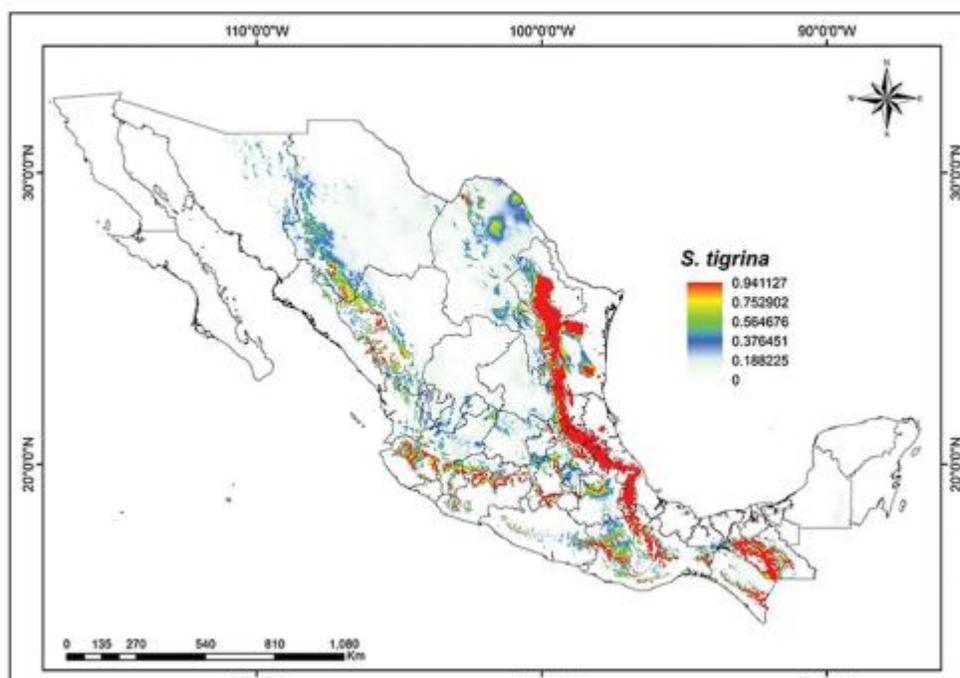


Figura 3. Distribución geográfica en México de *Stanhopea tigrina* tomado de Hernández de la Cruz *et al.* (2022).

Esta orquídea se encuentra amenazada de extinción según la NOM-059-SEMARNAT-2010, debido a la venta ilegal y al saqueo indiscriminado, además, se han encontrado problemas para su germinación debido a que hay pocos estudios sobre la germinación simbiótica, asimismo, se tienen problemas en su propagación *in vitro* debido al tamaño del explante que se tiene que utilizar para su propagación (Cortez *et al.*, 2021).

2.4 Hongos asociados a *Stanhopea tigrina*

Las asociaciones de los hongos con las orquídeas son de gran índole científico por su relevancia en la naturaleza. Se tienen dos antecedentes de hongos aislados de *S. tigrina*: 1) Salazar-Cerezo *et al.* (2018), observaron una diversidad fúngica muy rica, en su mayoría encontraron cepas de *Ascomycetes*, con *Trichoderma* y *Penicillium*, además encontraron *Fusarium* y *Aspergillus* los cuales encontraron cepas productoras de metabolitos de interés como giberelinas, y 2) Castillo-Pérez *et al.* (2018) aisló hongos del género *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium* y

Lasiodiplodia de los cuales se probó su actividad para mejorar la germinación y el crecimiento de plantas de frijol obteniendo los resultados más favorables para *Trichoderma hamatum* y *Lasiodiplodia theobromae*.

En la presente investigación se utilizaron las cepas de Castillo-Pérez (2018), que mostraron una mejor respuesta en la interacción hongo-planta, y cepas que posiblemente pueden reaccionar de forma distinta con su planta endófito.

2.4.1 *Lasiodiplodia*

Son un género de hongos de la familia Botryosphaeriaceae, (Slippers *et al.*, 2013) con colonias algodonosas en un principio blancas, que al cabo de una semana se vuelven grisáceas y con el tiempo negras; al microscopio presentan hifas hialinas, gruesas y segmentadas tiene conidias hialinas de pared gruesa, lisas, cilíndricas a sub-obpiriformes, holoblásticas, con uno o dos halos como se observa a en la figura 4 (Phillips *et al.*, 2013).

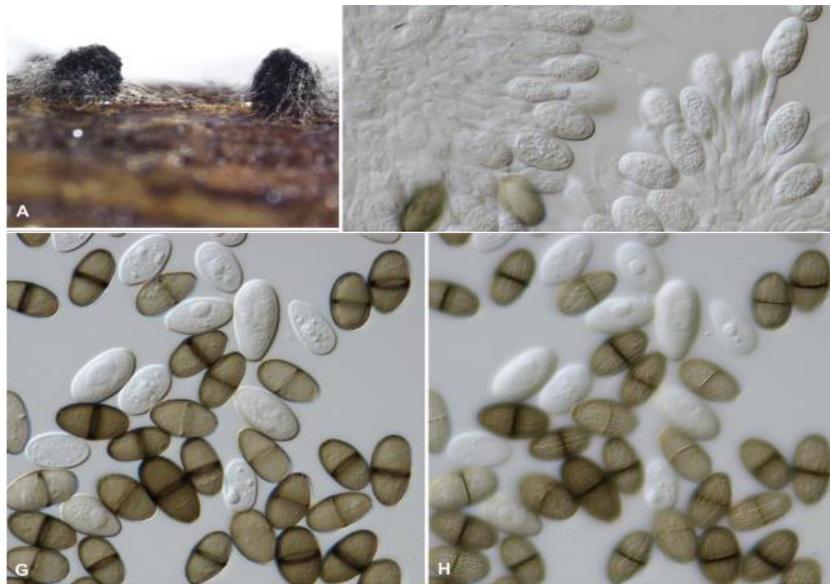


Figura 4. Observación microscópica de *Lasiodiplodia*. Modificado de Rodríguez-Gálvez (2017).

Este género principalmente se cataloga como hongos fitopatógenos, y en los últimos años se ha encontrado como agente endófito, aunque algunos hongos tienen la capacidad de adaptarse o vivir un tiempo como hongo endófito en su ciclo de vida, esta capacidad puede cambiar debido a cambios externos como temperatura, la presencia de fitoquímicos y la disponibilidad de nutrientes o poca compatibilidad con su hospedero. El género *Lasiodioplozia* es comúnmente agrupado en patógenos de plantas, no obstante, puede ser encontrado siendo endófito de ellas, (Huang *et al.*, 2017; Gómez *et al.*, 2021), *Lasiodioplozia* también puede ser endófito de orquídeas como *Cymbidium* sp., *Dendrobium* sp., en *Cattleya*, *Phalaenopsis* y *Oncidium* (Chua *et al.*, 2022).

Este género de hongos se ha encontrado que es capaz de sintetizar metabolitos bioactivos antimicrobianos y compuestos con actividad antifúngica como el ácido acético, glicerol y el 1,3-butanodiol y 2,3-butanodiol (Chua *et al.*, 2022; Hartanto *et al.*, 2023), asimismo se ha observado la producción del ácido 3-indolacético y el ácido 3-indolecarboxílico, hormonas ampliamente implicadas en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas (Félix *et al.*, 2018).

Otros géneros que se asocian a patogenia como el *Fusarium* han demostrado ser endófitos de orquídeas, y pueden mejorar el desarrollo por medio de síntesis de metabolitos bioactivos (Toghueo *et al.*, 2020; Shah *et al.*, 2022), por lo cual es necesario más investigación acerca de los hongos endófitos que comúnmente son agrupados como patógenos.

2.4.2 Penicillium

El género *Penicillium* está ampliamente distribuido por diversos ecosistemas, siendo hongos de tipo cosmopolita de índole ambiental. *Penicillium* es comúnmente encontrado como endófito de orquídeas, es ampliamente reconocido por apoyar a las plantas en su desarrollo y crecimiento. En las orquídeas se ha encontrado que es capaz de favorecer la germinación simbiótica (Çiğ *et al.*, 2018). Se han aislado diferentes cepas de hongos de algunas orquídeas, y se ha observado que pueden solubilizar fosfatos (Sahoo *et al.*, 2014), producir hormonas como AIA (Acido Indol

Acético) y giberelinas (Leitão y Enguita, 2016), pueden ayudar en la protección, produciendo agentes antimicrobianos como sideróforos bioactivos (Chowdappa *et al.*, 2020). Además, se han encontrado especies que son capaces de tolerar altas concentraciones de plomo de hasta 1000 mg/L, mejorando su tolerancia el estrés por estos metales (IDRIS *et al.*, 2019). También se ha demostrado su eficiencia como promotor de crecimiento y de aclimatación simbiótica (Salazar-Cerezo *et al.*, 2018; Castillo-Pérez *et al.*, 2018).

2.4.3 *Trichoderma*

El grupo de *Trichoderma* spp. se distingue por colonias de rápido crecimiento que, en su mayor parte tienen ascosporas de color verde con forma globosa y conidióforos con ramificaciones específicas (Figura 5), colonias con crecimiento radial que en un principio son de color blanco y posteriormente verde (Zhu *et al.*, 2015).

Las especies *Trichoderma* se encuentran ampliamente extendidas por el medio ambiente, en específico por el suelo, se pueden encontrar en suelos agrícolas, forestales, de marismas y desérticos, presentes sobre material en descomposición (Sharma *et al.*, 2019). Tienen la capacidad de colonizar raíces ayudando en la protección de la planta induciendo resistencia sistemática inducida contra patógenos de raíces, hojas y tallos, también producen antifúngicos como enzimas extracelulares (Kumar *et al.*, 2019), se alimentan de patógenos como nematodos destruyendo sus etapas tempranas y en algunos casos también adultos (Zin *et al.*, 2020), asimismo se pueden alimentar de otros hongos (micoparasitos) suprimiendo una posible enfermedad antes de que se desarrolle por completo (Mukherjee *et al.*, 2022).

Además, tiene impacto sobre la morfología vegetal, modificando la captación de Mg, mineral clave para que se lleve a cabo la fotosíntesis, tienen la capacidad de solubilizar fosfatos con la excreción de metabolitos ácidos orgánicos como los ácidos glucónico, cítrico y fumárico (Kumar, 2019). Otros metabolitos detectados en el género *Trichoderma* y de gran impacto son ácido harziánico (HA) y 6-pentil- α -

pirona (6PP) los cuales demostraron actividad antioxidante y producción de polifenoles (Pascale *et al.*, 2017).

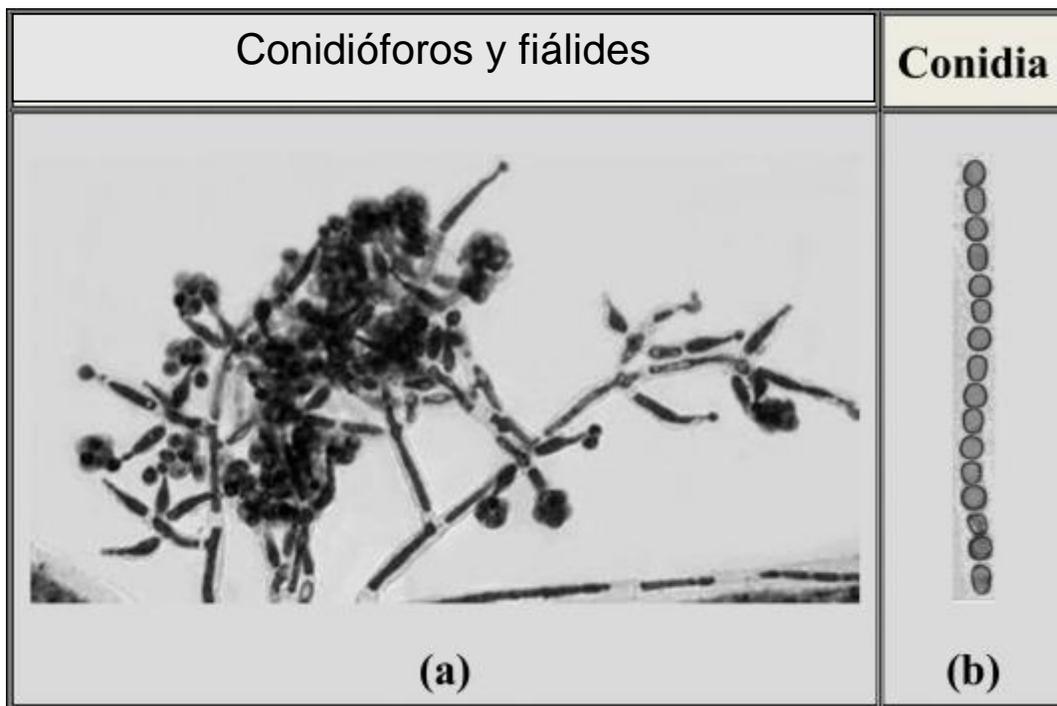


Figura 5. Microscopia de *Trichoderma* sp. modificada de Zhu *et al.* (2015).

2.5 Cultivo *in vitro* vegetal

El cultivo *in vitro* es una herramienta biotecnológica que utiliza cultivos nutritivos y un ambiente estéril riguroso, para el desarrollo de tejidos o células vegetales de diversos tipos (Espinosa-Leal *et al.*, 2018). Se puede partir de diferentes tejidos como semillas, Cuerpos Similares a Protocormos (CSM), brotes, partes de plantas (explanes), protoplastos (Thorpe *et al.*, 2007) con el fin de obtener plantas o tejidos libres de patógenos. El cultivo *in vitro* es un sistema de producción de gran velocidad, ayuda a mantener plantas que se encuentran amenazadas, se pueden producir mutantes para su estudio, e inducir estimulación para producir grandes cantidades de metabolitos de interés farmacológico (Debnarh *et al.*, 2006; Altpeter *et al.*, 2016).

2.5.1 Micropropagación

Consiste en el aprovechamiento de la totipotencialidad de las células vegetales, partiendo de una sección de planta (explante) con la finalidad de obtener plantas completas, mediante cultivos asépticos con los nutrientes necesarios para un correcto desarrollo como carbohidratos, vitaminas, reguladores de crecimiento y en algunos casos sustratos orgánicos. Con esta técnica se obtiene una multiplicación masiva en cortos periodos de tiempo y plantas libres de patógenos (Skoog y Miller, 1957; Intriago, 2020).

El establecimiento inicial de la micropropagación realizada por Murashige, (1974) solo contenía tres etapas: 1) establecimiento aséptico del cultivo, 2) multiplicación, y 3) el enraizamiento y la preparación del inóculo para su trasplante. Con el paso del tiempo se fue agregando etapas hasta completar un total de cinco (Hussain *et al.*, 2012).

Etapa 0: Preparación de planta donante

Se piensa que es el proceso más importante, determinara el éxito de las demás etapas, comúnmente se parte desde plantas de invernadero para maximizar las probabilidades de éxito, estas plántulas poseen una salud optima (Mirani *et al.*, 2017), además el uso de tejidos jóvenes acorta el periodo de respuesta y la obtención de plantas (Olmos *et al.*, 2004).

Etapa 1: Desinfección del material vegetal

En esta fase se realiza la asepsia superficial del tejido que se seleccionó en la anterior etapa, y se procede a cultivar en el medio enriquecido adecuado para la especie. Existen diferentes métodos de esterilización dependiendo el tejido del que se parta, entre los más comunes se encuentran el hipoclorito de sodio), etanol, cloruro de mercurio y Twen (Brenes *et al.*, 2015; Chokheli *et al.*, 2020). Se recomienda utilizar mezclas de estos para tener un rango más amplio de acción frente a los distintos patógenos (Suman, 2017).

Etapa 2: Multiplicación

El interés de esta etapa consiste en la aparición de nuevos brotes, para así obtener una gran cantidad de material vegetal en varios subcultivos progresivos hasta contar con el número que se desean de plántulas.

En esta etapa, principalmente se utilizan tres medios basales Murashige y Skoog, Knudson C y Vacin and Went, no obstante, existe una gran diversidad de suplementos para los medios basales, debido a la especificidad de los nutrientes que cada planta puede tener (Reddy *et al.*, 2016). Se suelen complementar los medios con reguladores de crecimiento como citocinas y auxinas como 6-bencilaminopurina (BAP), ácido indolebutírico (IBA) o Thidiazuron (TDZ) (Camargo *et al.*, 2015; Castillo-Pérez *et al.*, 2019), dado que estos ayudan en la formación de la parte aérea como brotes, yemas y hojas, aunque debido al costo de estas hormonas cada vez es más común que se utilice sustratos orgánicos como suplementos, tales como, homogenizados de plátano, agua de coco, hidrolizados de peptona, triptona, extracto de levadura y quitosano (Yam *et al.*, 2018), los cuales contienen nutrientes que ayudan al desarrollo de las plántulas y la diferenciación de los tejidos (Teixeira *et al.*, 2012).

Etapa 3: Enraizamiento

El enraizamiento es un paso clave para la propagación de los tejidos vegetales *in vitro*, como lo dice su nombre se realiza la estimulación de las plantas para la generación de raíces viables para su cultivo en el exterior, esta estimulación se realiza generalmente suplementado el medio base con hormonas vegetales, principalmente auxinas (Suman *et al.*, 2017). Se han encontrado resultados positivos con ácido indolbutírico (AIB), ácido naftaleno acético (ANA) (Mirani *et al.*, 2017), también se han encontrado resultados favorables con la utilización de citocininas como dimetilaminopurina (DMAP) y tidiazurón (TDZ) (Yam y Arditti, 2018).

Etapa 4: Aclimatación

En este último paso se definirá si se realizó de manera correcta el proceso de micropropagación, consiste en la adaptación progresiva de las plantas a las condiciones que tendrán en medio externo, dado que las plántulas poseen características fisiológicas incompatibles con el medio ambiente como estomas grandes y achatados que impide el intercambio de gases correctamente (Chandra *et al.*, 2010). Además, las plantas en el cultivo *in vitro* tienen condiciones controladas, mientras que en el exterior estas condiciones son variables, por lo tanto, la planta se debe adaptar al estrés hídrico, al cambio de temperatura y al ataque de los microorganismos (Cruz *et al.*, 2016). La exhibición de las plantas a cambios de luz, de temperatura y de diferentes concentraciones de CO₂ ayudan a la estimulación de movimientos estomáticos y de la fotosíntesis (Sherif *et al.*, 2018), asimismo enfrentar a las plantas a un cambio lento y gradual de humedad relativa permite el crecimiento de raíces no fotosintéticas, capaces de sustraer los nutrientes necesarios del suelo para su desarrollo y permite que las tasas de transpiración disminuyan gradualmente porque la regulación estomática y la pérdida de agua se vuelve más eficaz, además la cutícula desarrolla ceras epicuticulares (Gil-Rivero *et al.*, 2017).

2.6 Tipos de sustrato empleados en el CTV

Los sustratos orgánicos son fundamentales para el soporte de las plantas, principalmente de las orquídeas epifitas. Existe una gran cantidad de diversidad de sustratos empleados solos o en combinación, por lo que se genera una gran complejidad en cuanto a opciones. La importancia de escoger el sustrato adecuado radica en la supervivencia y el desarrollo de las vitroorquídeas en el medio exterior, ya que contribuirá en el crecimiento radicular, a la retención de agua, intercambio de gases, suministro de alimento y tomará el papel de su forofito por un tiempo, en el caso de las orquídeas epifitas (Guato-Jiménez, 2014; Hinsley *et al.*, 2018).

Entre los sustratos más utilizados para orquídeas se tienen corteza de pino, fibra de coco, perlita y carbón vegetal, estos han reportado altos índices de supervivencia

en la aclimatación, teniendo porcentajes mayores a un 85 % (Castañeda *et al.*, 2023).

2.6.1 Corteza de pino

Las cortezas de pinos son un sustrato limitado debido a que se remueve antes del procesamiento de la madera, pese a esto la corteza de pino es el sustrato más utilizado, posee grandes cantidades de carbono disponible para las orquídeas, tiene una gran capacidad de intercambio catiónico, lo que le hace poseer una gran concentración de cationes y amortiguación de pH (Jackson *et al.*, 2009; Altland *et al.*, 2014), ayuda a la retención del agua, lo que aumenta la tasa fotosintética e impacta en el tiempo que las orquídeas pueden resistir al estrés hídrico ambiental (Basiri Jahromi *et al.*, 2020).

2.6.2 Fibra de coco

La fibra de coco es un material obtenido de la cáscara que protege el fruto del coco, esta se troza en pequeñas sesiones, al ser un material de desecho y orgánico es altamente rentable, presenta buenas características como sustrato, dado que permite aireación a las raíces de las plantas, favorece el drenaje y gran retención de agua (Tuckeldoe *et al.*, 2023). Además, se ha encontrado que puede aumentar la altura de los brotes debido a los minerales que este tiene como potasio y fosforo, se ha reportado que también puede actuar como agente gelificante y ayudar en la germinación simbiótica debido a la densidad variable de sus partículas (Mala *et al.*, 2017).

2.6.3 Perlita o agrolita

Es un sustrato mineral a base de silicio que se obtiene a partir de roca volcánica, se prepara triturando estas piedras para aumentar su densidad aparente, presenta partículas de diversos tamaños que proporcionan buena aireación y drenaje, pero

poca retención de agua ayuda a estabilizar el pH, y se ocupa principalmente en mezclas, debido a que puede ser arrastrado por el agua (De, 2020).

2.6.4 Carbón

El carbón se ha utilizado ampliamente en el cultivo *in vitro* de las orquídeas por los grandes beneficios que tiene su implementación, dado que, al oscurecer el medio promueven la aparición de nuevas raíces (Cheruvathur *et al.*, 2010), ayuda a la lenta adsorción de las auxinas y citoquininas promoviendo el desarrollo de tejidos aéreos, aumentan la división celular y la aparición de nuevos brotes (Chin *et al.*, 2019).

2.6.4.1 Tipos de carbón

Los carbones que se utilizan como aditivos durante el desarrollo *in vitro* para las orquídeas son el 1) carbón vegetal este proporciona una textura áspera con porosidades, estimulando el surgimiento de nuevas raíces además almacena poca agua por lo que se tiene una buena aireación de medio, 2) El biochar tiene la capacidad de apoyar en el desarrollo de las orquídeas, retiene el fosforo, nitrógeno (Ukwattage *et al.*, 2020; Uchida *et al.*, 2019), ayuda en la mejora del intercambio catiónico, retiene la cantidad de agua disponible (Ghosh *et al.*, 2020; Kerré *et al.*; 2017). 3) El carbón activado también se utiliza como sustrato en la aclimatación y puede ayudar en la estabilización del pH de medio, adsorbe sustancias no deseadas como el etileno y el amoniaco (Sipayung, 2018), mejora el índice de oxidación de las hojas y las raíces ya que adsorbe el exceso de fenoles que producen esta oxidación-podrición (Souza *et al.*, 2021). Uno de los carbones activados con características interesantes es el F-400 cuenta con 987 m²/g, un volumen de poro 0.59 cm³/g (Hernández Orta *et al.*, 2003) estos valores indican la habilidad tener una gran capacidad de adsorción en fase gaseosa y posiblemente en liquida así se necesita menor volumen para ejecutar las mismas tareas que otros aditivos a base de carbono y además de una mayor eficiencia.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo de hongos

En placas de agar papa dextrosa (PDA) estéril se sembraron los hongos anteriormente aislados de *S. tigrina* por Castillo-Pérez (2018). Los cultivos fúngicos se incubaron 28 ± 1 °C durante aproximadamente cinco días, posteriormente se procedió a observar las colonias y la morfología microscópica para la concordancia de los datos anteriormente recabados.

3.2 Germinación de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *A. thaliana* se desinfectaron mediante gas de cloro acorde a la metodología descrita por Martínez-Soto (2013). Las semillas se colocaron en tubos Eppendorf en un desecador, y dentro se colocó un matraz Erlenmeyer de 200 mL con una solución de 5 mL de ácido clorhídrico concentrado e hipoclorito de sodio de 100 mL; el desecador se mantuvo sellado mediante vacío por 1 hora. Este procedimiento se realizó en una campana de extracción. Posteriormente, se incubaron a 4 °C durante dos días en oscuridad, y se dejaron crecer las plántulas durante cinco días en agar agua, se colocaron las plántulas en el cuarto de cultivo a una temperatura de 25 ± 2 °C con una intensidad lumínica de $40 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ generados con lámparas fluorescentes de luz blanca, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

3.3 Evaluación de cepas fúngicas aisladas de *Stanhopea tigrina* en el desarrollo vegetal de en *A. thaliana*

Evaluación en placa sin división

Se utilizaron placas de Petri con agar MS 1/5 (Murashige y Skoog, 1962) (Phyto-Technology), el cual se preparó disolviendo en 1 L de agua destilada, 0.88 g del medio, enriquecido con 3 g de sacarosa, el pH se ajustó en 5.7 ± 0.2 con NaOH o

HCl 1M, después se añadieron 8 g de agar (Plant TC), se calentó hasta ebullición y se procedió a esterilizar en autoclave (FELISA) por 45 minutos a 15 lb pulg² y 121°C por 30 minutos. En la parte superior de estos medios de cultivo se colocaron seis plántulas de *A. thaliana* (por triplicado) y en el otro extremo se ubicaron tapones miceliales de 0.5 cm (hechos con papel filtro) en los cuales se vertieron 10 µL de cada microorganismo a una concentración de 10⁶ esporas por mililitro (EPM) directamente sobre el medio solidificado. Estos tratamientos se colocaron en la cámara de incubación durante siete días para las cepas de *Trichoderma sp* y *Lasiodiplodia macrospora* y durante 14 días para la cepa de *Penicillium sp*. Estos experimentos se colocaron en las condiciones ambientales del cuarto de cultivo arriba señaladas. Al término de sus respectivos tiempos de incubación se evaluó el peso fresco, longitud de raíz primaria, número de raíces secundarias y longitud de hipocotíleo.

Evaluación en placas con división

Se utilizaron placas de Petri con división, en donde en ambas partes se colocó agar MS 1/5 realizado de la misma forma que en el anterior experimento, posteriormente en solo una de estas secciones se colocaron cinco plántulas de *A. thaliana* y en la otra se colocaron tapones miceliales de 0.5 cm realizados con papel filtro, y se les vertió 10 µL de suspensión de esporas de cada microorganismo directamente sobre el medio solidificado. Estos tratamientos se colocaron en el cuarto de cultivo a una temperatura de 25 ± 2 °C con una intensidad lumínica de 40 mmol m⁻²s⁻¹ y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante siete días para las cepas de *Trichoderma sp*, mientras que para las cepas *Lasiodiplodia macrospora* y de *Penicillium sp* se evaluó durante 10 días. Al culminar el experimento se evaluó longitud de raíz primaria, número de hojas, longitud de hipocotíleo y peso fresco.

3.4 Adsorción de *Lasiodiplodia macrospora* en carbón activado F-400

Se preparó un litro solución de NaCl al 0.9 % para cada uno de los volúmenes de *Lasiodiplodia macrospora*, la cual fue suplementada con 0.5, 1, 2, 3, y 4 mL del hongo a una concentración de 10⁹ EPM. Posteriormente, se colocó cada una de las concentraciones en el reactor y se agregó 1 g de carbón activado F-400 en el vial

de reactor, a continuación, se registró el número de esporas cada 1 hora durante 8 horas, por último, se procedió a realizar las curvas de adsorción, quedando así una curva para cada volumen de hongo que se utilizó, se observó el comportamiento lineal del hongo sobre el carbón.

3.5 Evaluación de la viabilidad de *Lasiodiplodia macrospora* en el carbón activado F-400.

Se preparó una solución de NaCl al 0.9 % la cual fue esterilizada en autoclave FELISA por 45 minutos a 15 lb pulg² a 121 °C, posteriormente, esta solución fue suplementada con el hongo *Lasiodiplodia macrospora* a una concentración de 10⁹ EPM. Adicionalmente, se pesaron distintas cantidades de carbón activado (0.2 ,0.4, 0.6, 0.8, 1, y 2 g). El carbón activado fue previamente esterilizado por calor seco en estufa de convección LINDBERG/BLUE a 200 °C durante 2 horas, después cada una de las cantidades pesadas fueron colocadas en tubos cónicos, y se les agregaron 50 mL de la solución inoculada con el hongo en un ambiente estéril proporcionado por dos mecheros Clipper, una vez hecho esto se procedió a colocar en agitación los tubos durante 24 horas, después de este tiempo se colocaron granos de carbón activado en agar PDA para observar el crecimiento del hongo. Para ello, se midió el crecimiento radial cada día sobre este medio y el tiempo de duración del ciclo de vida de colonia.

3.6 Evaluación de la promoción de crecimiento de protocormos de *Stanhopea tigrina*.

Se utilizaron protocormos de *Stanhopea tigrina* los cuales fueron resembrados en placas Petri con medio MS 1/2, (Murashige y Skoog, 1962) (Phyto-Technology). El medio de cultivo se preparó disolviendo en 1 L de agua destilada, 2 g del medio, enriquecido con 5 g de sacarosa, el pH se ajustó en 5.7 ± 0.2 con NaOH o HCl 1M, después se añadieron 8 g de agar (Plant TC), se calentó hasta ebullición y se procedió a esterilizar en autoclave (FELISA) por 45 minutos a 15 lb pulg² y 121 °C por 30 minutos. Posteriormente, se vació en placas de Petri y en ellas se colocaron

seis protocormos por cada placa (por triplicado), posteriormente se procedió a colocar carbón activado inoculado con *L. macrospora* en el extremo contrario del que se colocaron los protocormos, para no perder la esterilidad se utilizó una espátula previamente esterilizada en autoclave FELISA por 45 minutos a 15 lb pulg² a 121 °C, con ella se colocó una porción de carbón activado. Las placas así preparadas se colocaron en bajo las condiciones ambientales del cuarto de cultivo a una temperatura de 25 ± 2 °C y con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Por último, se procedió a contabilizar el tiempo y el porcentaje de germinación.

3.7 Subcultivo de *S. tigrina* previamente estimulado por *Lasiodiplodia macrospora* en el carbón activado F-400

Se realizó la preparación de agar MS completo (Murashige y Skoog, 1962) (Phyto-Technology), el cual se preparó disolviendo en 250 ml de agua destilada, 1.10 g del medio enriquecido con 3.75 g de sacarosa, 1.25 g de carbón activado, el pH se ajustó entre 5.7 ± 0.2 con NaOH o HCl 1M, después se añadieron 2 g de agar (Plant TC), se calentó hasta ebullición, y se distribuyó en frasco de vidrio. Por último, se esterilizó en autoclave (FELISA) por 45 minutos a 15 lb pulg² y 121 °C por 30 minutos. Una vez solidificados los medios, se procedió a colocar tres plántulas de *S. tigrina* por frasco (anteriormente expuestas al inoculo del carbón activado con *Lasiodiplodia macrospora*), se colocaron los frascos en el cuarto de cultivo a una temperatura de 25 ± 2 °C con una intensidad lumínica de $40 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ generados con lámparas fluorescentes de luz blanca, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

3.8 Determinación de clorofila

Para conocer la cantidad de clorofila en el tejido aéreo de los diferentes tratamientos, se pesaron nueve muestras de hojas por cada tratamiento. Posteriormente se trituraron en 1 mL de acetona absoluta y el extracto se colocó a 4°C durante toda la noche. Transcurrido, este tiempo la muestra se centrifugó a

5000 RPM por 15 minutos. Por último, se determinó la absorbancia a tres longitudes de onda 664.6, 644.8 y 470 nm. Se calculó la cantidad de clorofila tomando como valor de referencia a un 1 g de peso fresco.

3.8 Análisis estadístico

Se utilizó el software estadístico GraphPad Prism en su novena versión para la realización del análisis estadístico y las gráficas, en la cuales se utilizó error estándar al graficar. Para el análisis estadístico de los experimentos de interacción con *A. thaliana* se utilizó el Post hoc Tukey emparejando los datos por ANOVA de una sola vía, teniendo una n= 18 para los sistemas de placa sin división y una n = 15 para los sistemas divididos. En los experimentos de adsorción se utilizó un análisis ANOVA de dos vías en relación entre el porcentaje de absorbancia y el tiempo con Post hoc Sidak.

Durante la germinación simbiótica de protocormos y el subcultivo de *S. tigrina* se utilizó una ANOVA de dos vías para datos agrupados y se realizó una prueba de comparación múltiple de medias de tipo Sidak.

3.9 Diseño experimental

Para el modelo de interacción con *A. thaliana* se siguieron los modelos experimentales de la Tabla 1 y 2.

Tabla 1. Modelo de interacción con *A. thaliana* cepas de rápido crecimiento.

	TRATAMIENTO	ABREVIATURA
PLACAS CON DIVISIÓN	<i>Trichoderma sp.-A</i>	TRS-A
	<i>Trichoderma sp.-B</i>	TRS-B
	Control	CTRL
PLACAS SIN DIVISIÓN	<i>Penicillium sp.</i>	PENS
	<i>Lasidoplodia macrospora</i>	LAM
	Control	CTRL

Tabla 2. Modelo de interacción con *A. thaliana* cepas de lento crecimiento.

	TRATAMIENTO	ABREVIATURA
PLACAS CON DIVISIÓN	<i>Penicillium sp.</i>	PENS
	<i>Lasiodiplodia macrospora</i>	LAM
	Control	CTRL
PLACAS SIN DIVISIÓN	<i>Penicillium sp.</i>	PENS
	Control	CTRL

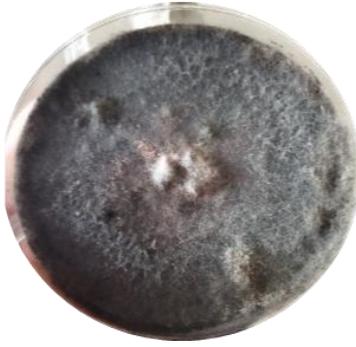
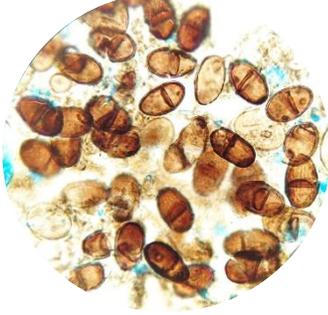
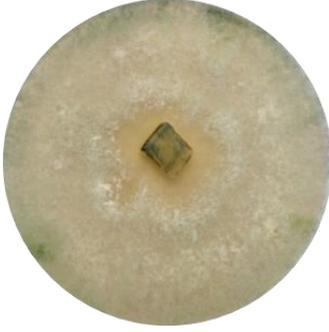
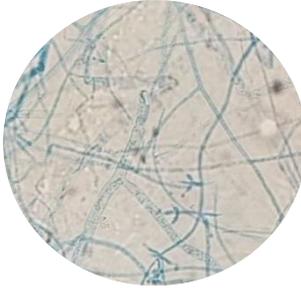
IV. RESULTADOS

4.1 Cultivo de hongos

Se tomaron cepas que anteriormente fueron aisladas de la orquídea *S. tigrina*, resultando en nueve cepas en total, se procedieron a sembrar en agar PDA de tal manera que se pudieron observar las características macroscópicas y microscópicas para su correcta identificación. Se encontró un hongo que aparentemente era *Lasiodiplodia* ya que durante su crecimiento mostraba una colonia blanca y que con el tiempo esta se iba tornando negra, sin embargo, para poder observar los conidios se mantuvo bajo estrés hasta que produjo los picnidios característicos del género (Tabla 3). Posteriormente, se re-caracterizaron dos hongos del género *Trichoderma* los cuales mostraron una colonia blanca con tonalidades verdosas que crecían en cortos periodos de tiempo, al microscopio mostraba las espigas características de los hongos *Trichoderma* (Tabla 3). Por último, se observó un hongo con colonia blanca que pigmentaba el medio de un color amarillo la cual crece de manera no uniforme y de muy lento crecimiento, al microscopio se observaron las conidias características del género *Penicillium* (Figura 3), de estos hongos re-caracterizados solo *Lasiodiplodia* se encontraba anteriormente secuenciado y analizado en la base de datos NCBI, el resto de los hongos anteriormente solo fueron identificados por su morfología, por lo cual solo se conocía la especie de uno solo, esta fue identificada como *Lasiodiplodia macrospora*.

Tabla 3. Recaracterización de hongos endófitos de *Stanhopea. tigrina*.

Nombre Clave	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Identificación
-----------------	----------------------------	----------------------------	----------------

<p>LAM</p>			<p><i>Lasioidiplodia macrospora.</i></p>
<p>TRS-A</p>			<p><i>Trichoderma sp-A</i></p>
<p>TRS-B</p>			<p><i>Trichoderma sp-B</i></p>
<p>PENS</p>			<p><i>Penicillium sp.</i></p>

4.2 Evaluación de *Trichoderma* sp-A, *Trichoderma* sp-B, *Lasiodiplodia macrospora* y *Penicillium* sp. en la promoción de crecimiento en *A. thaliana* en placas divididas

Para conocer las capacidades de las cepas como promotoras de crecimiento se utilizaron plantas de *A. thaliana*, dado que tienen un mayor crecimiento *in vitro* y un ciclo de vida más corto que *S. tigrina*. Para ello, se utilizó un sistema en el que las plántulas tenían un contacto directo con las diversas cepas fúngicas y otro en cual se tenía una división que permitiría identificar si el hongo podía exhibir compuestos volátiles. Debido al comportamiento de crecimiento de las cepas se agruparon en dos secciones: i) de rápido crecimiento, las cuales invadían la placa completamente en 10 días (*Trichoderma* sp-A, *Trichoderma* sp-B) y ii) cepas de lento crecimiento, las cuales invadieron la placa aproximadamente en 14 días (*Lasiodiplodia macrospora* y *Penicillium* sp.,).

4.2.1 Interacción de cepas de rápido crecimiento con *A. thaliana*

Al observar las características fenotípicas de *A. thaliana*, morfológicamente no se encontró una gran diferencia entre el control y los tratamientos (Figura 6), además cuando se observaron los parámetros estadísticos no se visualizó una mejora por parte de los tratamientos sobre el crecimiento o formación de la raíz primaria y peso total (Figura 7A y C). No obstante, se observaron efectos sobre la longitud de hipocótilo, en donde se observó un aumento del doble de su tamaño favorecido por *Trichoderma* sp-B en comparación con *Trichoderma* sp-A y el control (Figura 7B).

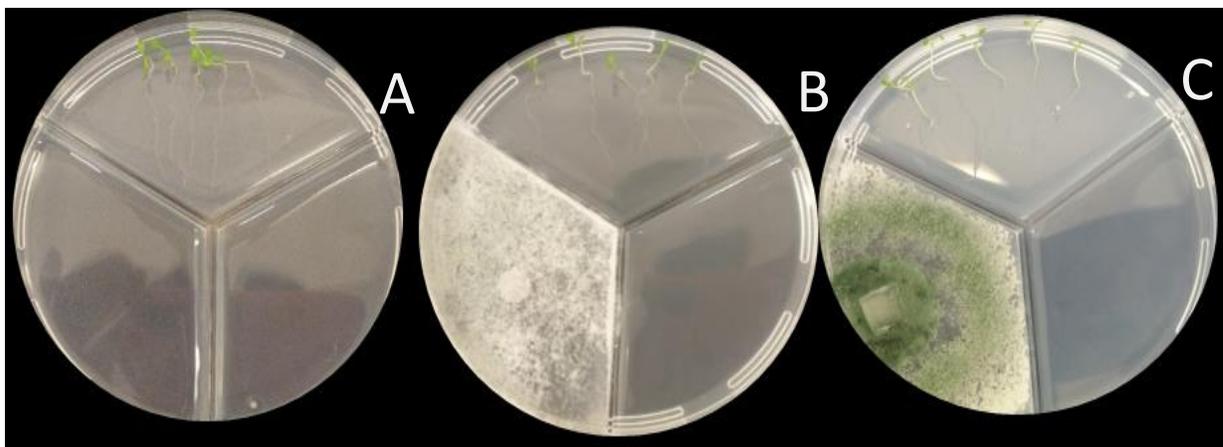


Figura 6. Evaluación del crecimiento de *A. thaliana* después de 10 días de crecimiento A) control B) *Trichoderma sp-A* y C) *Trichoderma sp-B*

Al evaluar el contenido de clorofila en las plántulas expuestas a los tratamientos anteriormente descritos, se encontró que ambos tratamientos (*Trichoderma sp-A* y *Trichoderma sp-B*) aumentaron notablemente la concentración de este parámetro comparado con el control, de la misma manera resultó aumentar el contenido de carotenoides por parte de los tratamientos con los hongos, siendo mayor en las plantas expuestas al hongo *Trichoderma sp-A*, con una media de 0.19 mg Ch/g más del doble que la del control, mientras que el control apenas mostró una media de 0.072 mg Ch/g (Tabla 4)

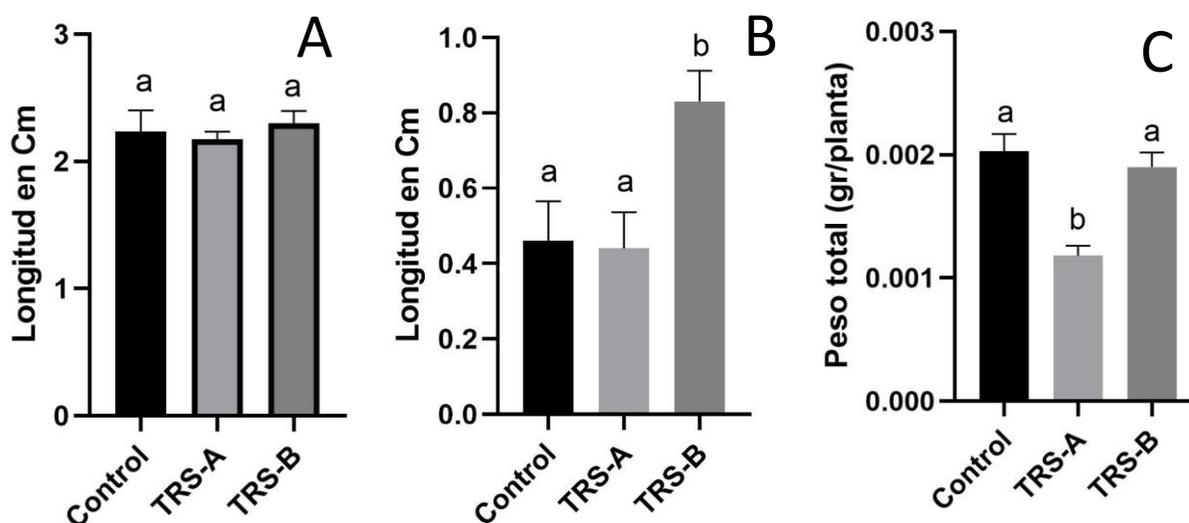


Figura 7. Evaluación de parámetros fenotípicos de *A. thaliana* después de 7 días de interacción con los hongos *Trichoderma sp-A* (TRS-A), *Trichoderma sp-B* (TRS-B). A) Longitud de raíz, B) longitud de hipocótilo y C) peso total.

Se evaluaron la media \pm SEM (n=6) la misma letra señala que no se encontró diferencia estadística ($p < 0.05$) de acuerdo con el análisis Tukey.

4.2.2 Experimento con cepas de lento crecimiento

Se encontró que las cepas *Lasiodiplodia macrospora* y *Penicillium* sp. mostraron un efecto mayor sobre *A. thaliana*, dado que se observaron plantas más grandes de la parte aérea de aproximadamente el doble comparado con el control, con cotiledones más grande en un 50 %, además se encontró que la cepa *Penicillium* sp. no invadió toda la parte de la placa destinada para ella, no obstante el pigmento que produjo si cubrió toda el área de la caja en la raíz de *A. thaliana* expuesta a este tratamiento (Figura 8).

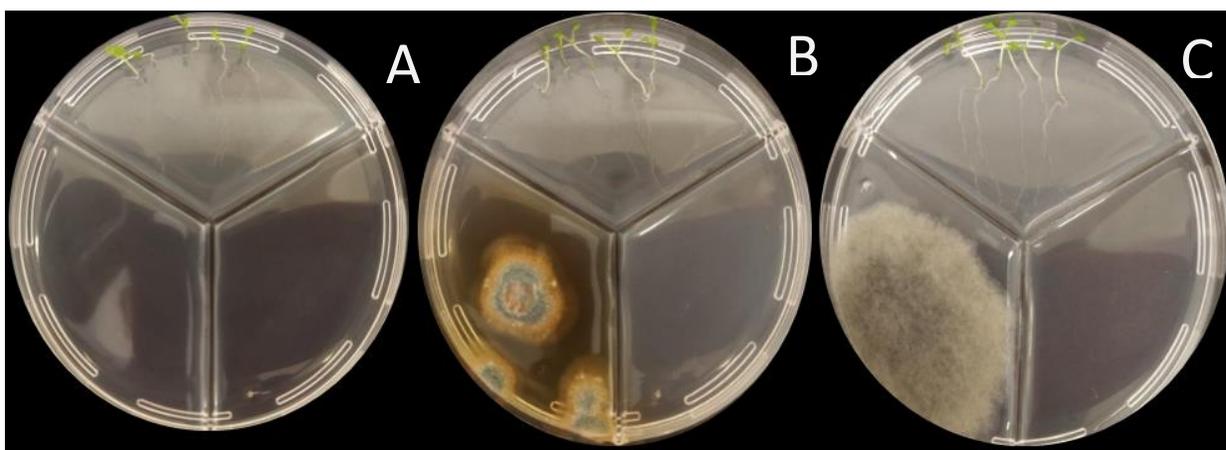


Figura 8. Evaluación del crecimiento de *A. thaliana* después de 14 días de crecimiento A) control B) *Penicillium* sp. y C) *Lasiodiplodia macrospora*.

En cuanto a las características fenotípicas se encontró que las plantas de *A. thaliana* expuestas a la cepa *Penicillium* sp. alcanzaron un peso con una media de 2.5 mg, seguido de las plantas expuestas a *Lasiodiplodia macrospora* con un peso de 2 mg y por último las plantas control con un peso de 1.5 mg (Figura 9C). Por otra parte, al evaluar la longitud de hipocotilo de *A. thaliana*, se encontraron medias muy similares entre los tratamientos inoculados aproximadamente de 0.8 cm mientras que el control se encontraba por debajo con 0.4 cm contando con cerca de la mitad del crecimiento comparado con los tratamientos de los hongos (Figura 9B), en cuestión de raíz primaria se obtuvo un pequeño pero significativo aumento en los

tratamientos con *Penicillium* sp. y *Lasiodiplodia macrospora*, respecto al control (Figura 9A), de tal manera que en todos los parámetros evaluados se encontraron mejores resultados de los parámetros de crecimiento evaluados cuando las plantas se colocaba alguno de los dos hongos.

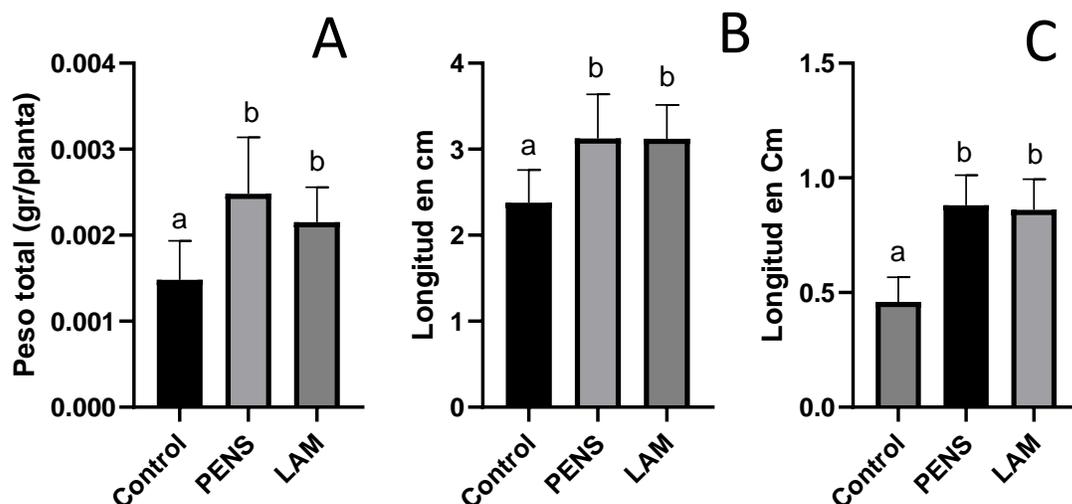


Figura 9. Evaluación de parámetros fenotípicos de *A. thaliana* después de 10 días de interacción con los hongos *Lasiodiplodia macrospora* (LAM) y *Penicillium* sp (PENS). A) Longitud de raíz, B) longitud de hipocótilo y C) peso total.

Se evaluaron la media \pm SEM (n=6) la misma letra señala que no se encontró diferencia estadística ($p < 0.05$) de acuerdo con el análisis Tukey.

A pesar de la evidencia encontrada en los parámetros fenotípicos, al evaluar la cantidad de clorofila y el contenido de carotenoides totales no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control en estos parámetros, se encontró una ligera marchitez en el tratamiento con *Penicillium* sp. que se puede visualizar con la cuantificación de los parámetros fotosintéticos. (Tabla 4)

Tabla 4. Determinación de clorofila del experimento de 7 y 10 días en placas divididas

Tratamiento	Microorganismo	Tiempo de crecimiento (Días)	Clorofila (mg Ch/ g)	Carotenoides (mg/g)
TRS-A	<i>Trichoderma sp.-A</i>	10	6.370± 1.523 ^b	0.4731± 0.2675 ^b
TRS-B	<i>Trichoderma sp.-B</i>	10	3.583± 1.132 ^b	0.1195± 0.07532 ^b
CTRL		10	2.033± 1.523 ^a	0.0500± 0.01190 ^a
PENS	<i>Penicillium sp.</i>	14	2.745± 0.8742 ^a	0.02156± 0.0140 ^a
LAM	<i>Lasiodiplodia macrospora</i>	14	4.873±1.629 ^a	0.02400± 0.0117 ^a
CTRL	-----	14	2.033± 1.523 ^a	0.05000± 0.0119 ^a

A. se evaluaron la media ± SD (n=6) la misma letra señala que no se encontró diferencia estadística (p<0.05) de acuerdo con el análisis Tukey.

B. se evaluaron la media ± SD (n=5) la misma letra señala que no se encontró diferencia estadística (p<0.05) de acuerdo con el análisis Tukey

4.3 Efecto de *Trichoderma sp-A*, *Trichoderma sp-B*, *Lasiodiplodia macrospora* y *Penicillium sp.* en la promoción de crecimiento en *A. thaliana*

La evaluación de crecimiento en placas de Petri sin división se estableció en dos tipos de experimentación dependiendo del tiempo que les tomaba a los hongos invadir toda la placa, estableciéndose dos grupos de hongos: i) uno comprendido por *Trichoderma sp-A*, *Trichoderma sp-B*, *Lasiodiplodia macrospora* y ii) el otro solo por *Penicillium sp.* dado que este último le tomó más tiempo colonizar la totalidad de la placa.

El primer grupo comprendía hongos cuyo crecimiento llenaba la placa en siete días, las plántulas de *A. thaliana* que se colocaron en interacción con el hongo *Lasiodiplodia macrospora* mostraron un tejido radicular más grande que la del control y el resto de los tratamientos (Figura 10). Además, se corroboró con el análisis estadístico teniendo diferentes medias en la longitud de raíz comparada con el resto, asimismo en este tratamiento se observaron plantas con mayor cantidad de peso fresco total (Figura 11 A y C).

Por otra parte, las plantas de *A. thaliana* no exhibieron una gran longitud de hipocófito, sólo en los tratamientos de *Trichoderma* sp-B se observaron beneficios, así como en el incremento del peso total de la planta (Figura 11B).

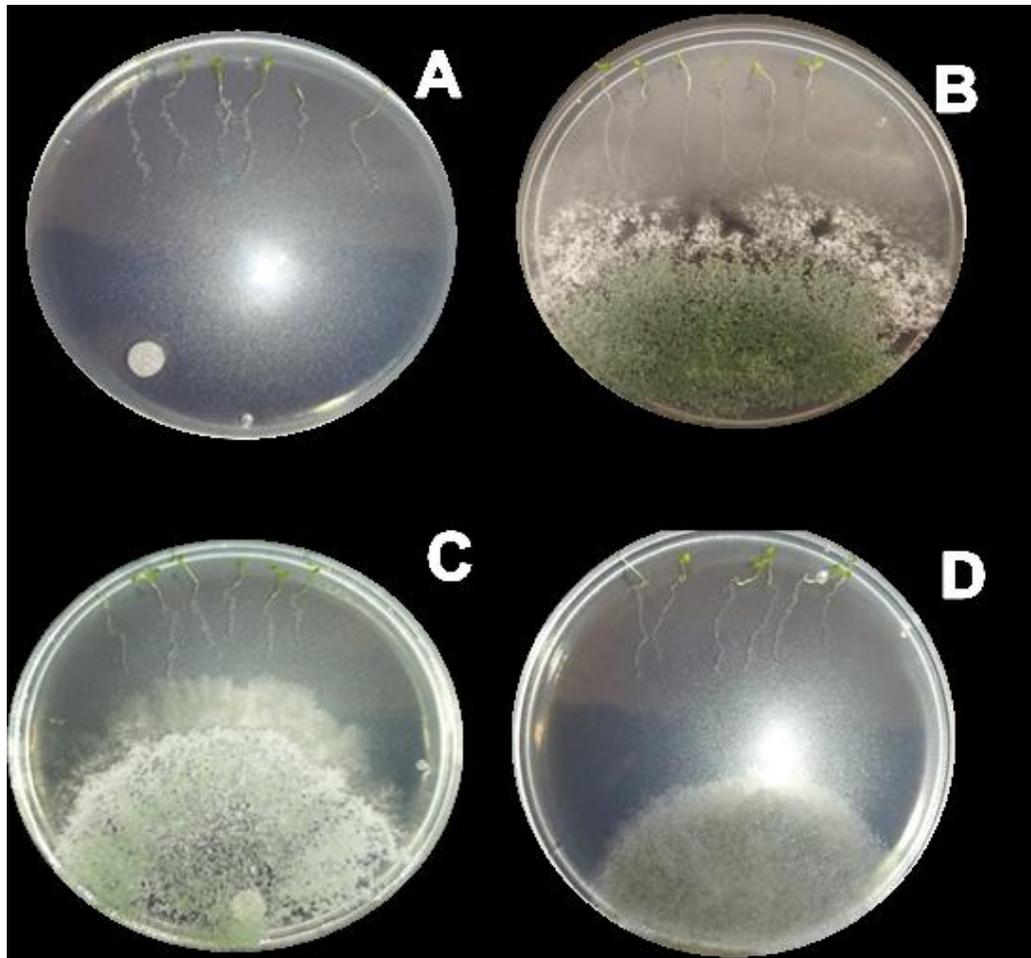


Figura 10. Evaluación del crecimiento de *A. thaliana* después de siete días de crecimiento A) control B) *Trichoderma* sp-A C) *Trichoderma* sp-B D) *Lasiodiplodia macrospora*.

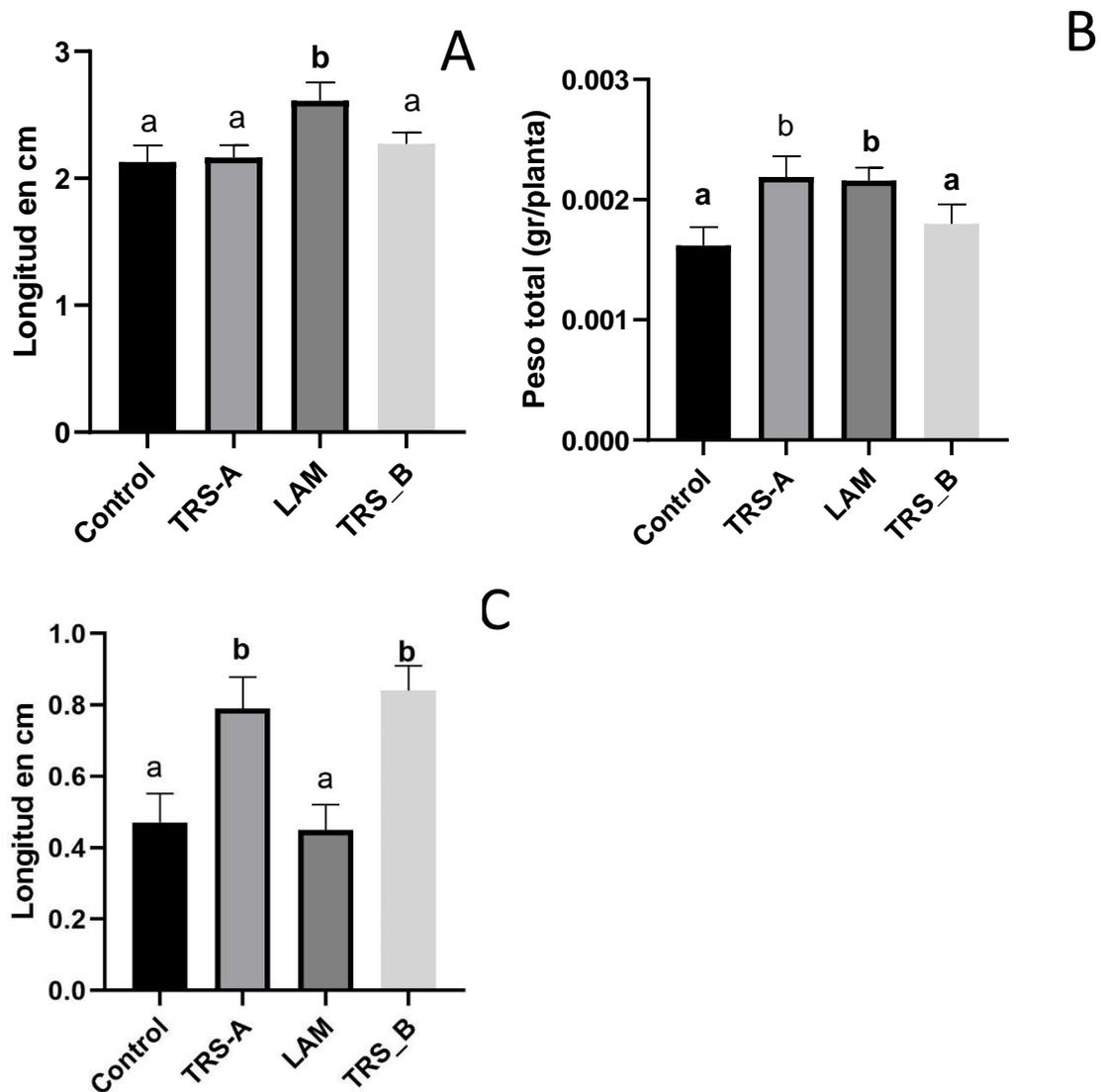


Figura 11. Evaluación de parámetros fenotípicos de *A. thaliana* después de 7s de interacción con los hongos *Trichoderma* sp-A (TRS-A), *Trichoderma* sp-B (TRS-B), *Lasiodiplodia macrospora* (LAM). A) Longitud de raíz, B) longitud de hipocótilo y C) peso total.

Se evaluaron la media \pm SD (n=6) la misma letra señala que no se encontró diferencia estadística ($p < 0.05$) de acuerdo con el análisis Tukey.

En cuanto a la cantidad de clorofila se obtuvo un gran incremento de su concentración en las plantas de *A. thaliana* expuestas a *Trichoderma* sp-A, seguido de *Lasiodiplodia macrospora*, ambos con diferencia estadística significativa en comparación al control. Por otra parte, al determinar la cantidad de carotenoides

totales, se encontró un aumento del triple de la concentración comparado con el control (Tabla 5). Estos experimentos demostraron que el *Lasiodiplodia macrospora* fue el hongo que mostró mayores efectos en la promoción de crecimiento vegetal.

4.3.1 Efecto de cepas de lento crecimiento sobre el crecimiento de *A. thaliana*

En el segundo grupo de hongos (cepas de lento crecimiento) se encontraba el *Penicillium* sp., el cual colonizaba la placa completa con su pigmento hasta después de 14, así que el experimento de interacción con *A. thaliana* se realizó durante ese periodo. Los resultados mostraron marchitamiento de las hojas y un sistema radicular menos complejo en comparación con el control, ya que en el control se observó la aparición de raíces secundarias. Se encontraron diferencias significativas en los parámetros de hipocótilo y peso fresco (Figura 12 A y B) no obstante no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la longitud de la raíz primaria (Figura 12C), y carotenoides totales (Tabla 5), respecto al tratamiento control.

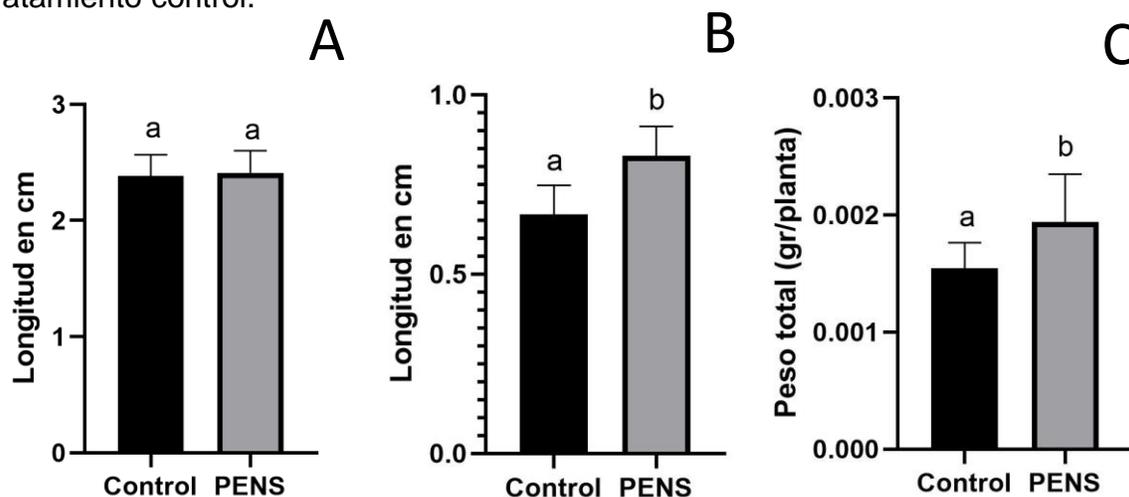


Figura 12. Evaluación de parámetros fenotípicos de *A. thaliana* después de 14 días de interacción con el hongo *Penicillium* sp (PENS) A) Longitud de raíz, B) longitud de hipocótilo y C) peso total.

Se evaluaron la media \pm SD (n=6) la misma letra señala que no se encontró diferencia estadística ($p < 0.05$) de acuerdo con el análisis Tukey.

Tabla 5. Determinación de clorofila del experimento de 7 y 10 días en placas sin dividir

Tratamiento	Microorganismo	Tiempo de crecimiento (Días)	Clorofila (mg Ch/ g)	Carotenoides (mg/g)
TRS-A	<i>Trichoderma sp.-A</i>	7 ^A	6.370± 1.882 ^b	0.473± 0.075 ^b
TRS_B	<i>Trichoderma sp.-B</i>	7 ^A	3.367± 1.283 ^a	0.111± 0.267 ^a
LAM	<i>Lasiodiplodia macrospora</i>	7 ^A	4.873± 0.8742 ^b	0.024± 0.014 ^a
CTRL		7 ^A	2.033±1.523 ^a	0.050±0.011 ^a
PENS	<i>Penicillium sp.</i>	10 ^B	2.033± 1.523 ^a	0.05000± 0.011 ^b
CTRL	-----	10 ^B	2.745± 1.629 ^a	0.02156± 0.011 ^a

A se evaluaron la media ± SD (n=6) la misma letra señala que no se encontró diferencia estadística (p<0.05) de acuerdo con el análisis Tukey.

B se evaluaron la media ± SD (n=5) la misma letra señala que no se encontró diferencia estadística (p<0.05) de acuerdo con el análisis T de Student.

4.4 Evaluación de la germinación de *A. thaliana*

Para evaluar la germinación simbiótica con los diferentes hongos en este estudio, se colocaron semillas de *A. thaliana* en dos sistemas, uno de placas divididas y otro con placas sencillas. En este último sistema se observó un porcentaje de germinación del 75 % en las semillas expuestas a *Trichoderma sp-A* (TRS-A), seguido de un 60 % para las semillas expuestas a *Penicillium sp.* (PENS) y *Lasiodiplodia macrospora* (LAM) y un 40% para las semillas del tratamiento control. El tratamiento con *Trichoderma sp-B* (TRS-B) fue el único que mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al control (Figura 13-A). Por otra parte, al evaluar este parámetro en placas con división se encontraron parámetros similares al sistema de placas sin división, observando un 80% de germinación de las semillas con *Trichoderma sp-A*, seguido de un 60% de germinación para las semillas expuestas a *Penicillium sp.* y *Lasiodiplodia macrospora*. con un 40 % para el tratamiento control (Figura 13-B). El tratamiento de *Trichoderma sp-B* fue el único que mostró diferencias estadísticamente significativas, respecto al control.

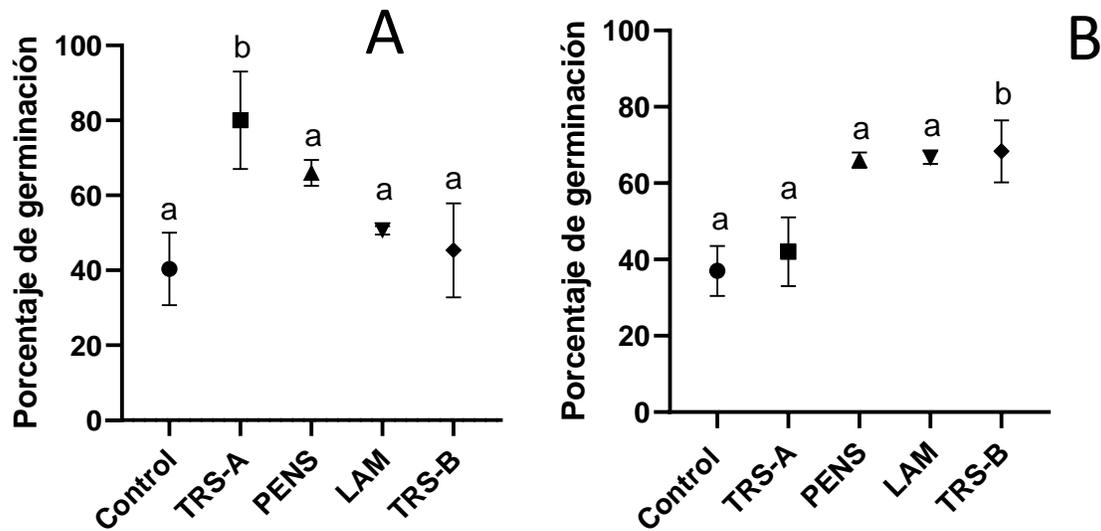


Figura 13. Determinación de la germinación frente a los hongos *Trichoderma* sp-A (TRS-A), *Trichoderma* sp-B (TRS-B), *Lasiodiplodia macrospora* (LAM) y *Penicillium* sp (PENS) A) sistemas de placas divididas y B) sistemas de placas sin división.

4.5 Fijación de *Lasiodiplodia macrospora* en carbón activado

Debido al poco tiempo de vida de *Trichoderma* sp-A sobre el carbón activado F-400 y que los resultados arrojaban poca diferencia entre este y *Lasiodiplodia macrospora* en cuestión de la promoción de crecimiento, se procedió a utilizar el hongo *Lasiodiplodia macrospora* para los experimentos de adsorción.

Se obtuvieron cinco curvas de adsorción a partir de las soluciones utilizadas (0,5, 1 ml, 2 ml, 3 ml y 4 ml), al analizarlas con el coeficiente de Pearson todas demostraron una linealidad negativa indicando que a medida que pasaba el tiempo la concentración de esporas en la solución disminuía, asimismo esta correlación se observó también en la cantidad de horas en las que se detenía el proceso de adsorción cuando se aumenta su concentración solución, ya que con 0.5 ml se detenía a las siete horas mientras que a 1 ml se detenía a las cinco horas este fenómeno se observa con cada aumento de concentración de la solución hasta las 4 ml que se detenía a las tres horas (Figura 14), estos datos nos indican que las esporas están siendo adsorbidas por el carbón activado F-400 aun así se realizó la corroboración de la viabilidad de esto hongo, sembrando granos del carbón en agar PDA, al pasar 48 horas se observó el crecimiento de la cepa H28 con sus características fenotipas típica como colonia algodonosa y pigmentación del medio negra (Figura 15).

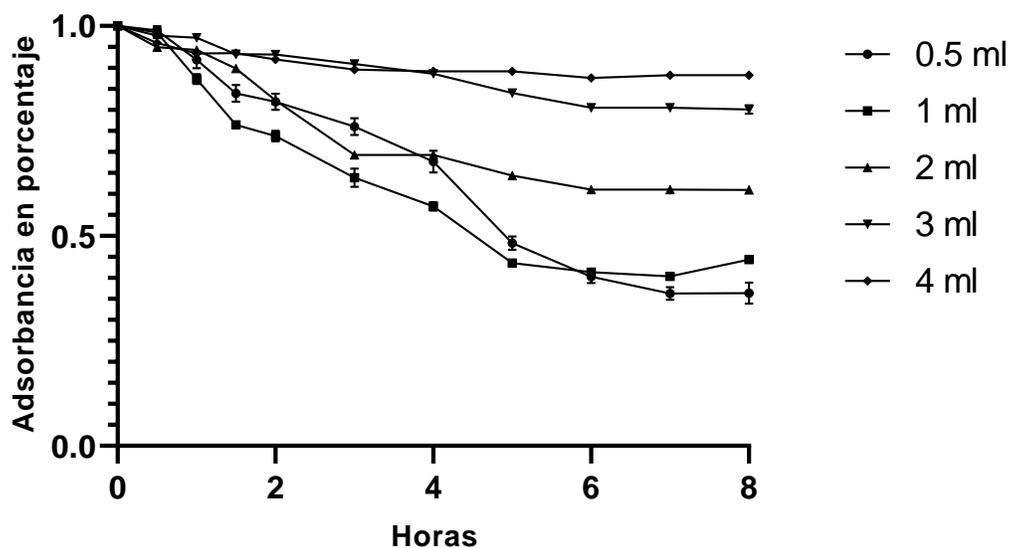


Figura 14. Determinación de curvas de adsorción de *Lasiodiplodia macropora* a distintos volúmenes.

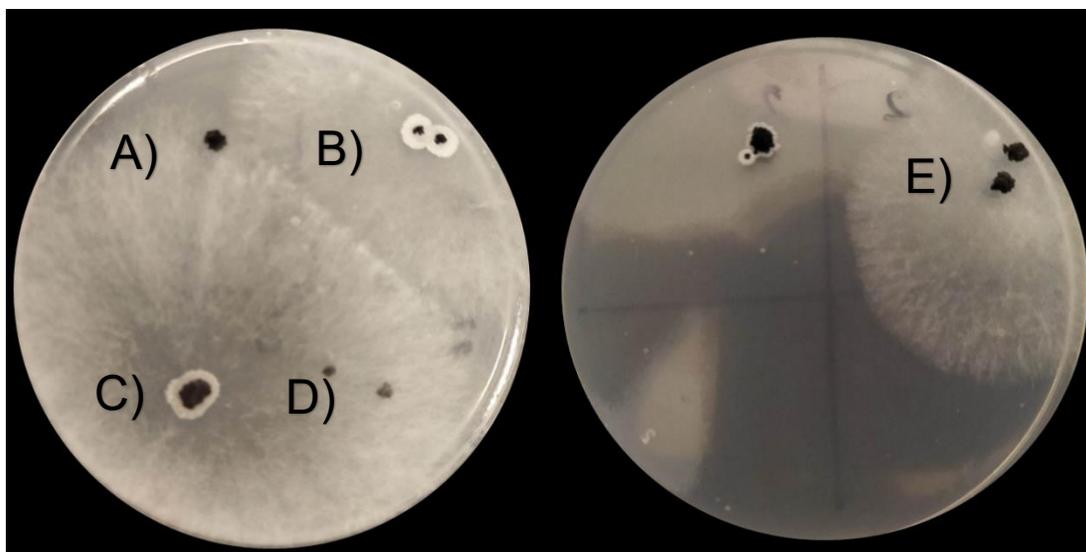


Figura 15. Crecimiento de *Lasiodiplodia macropora* después de haber sido fijado en distintos volúmenes A) 4 mL B) 3 mL C) 2 mL D) 1 mL y E) 0.5 mL.

4.6 Características de crecimiento de *Lasiodiplodia macropora* en el carbón activado F-400

Se realizaron algunos ensayos para observar que características de crecimiento se encuentran diferentes al incorporar *Lasiodiplodia macrospora* en el carbón activado F-400 (H28-F), se evaluó si al variar el peso de carbón activado en la misma concentración de esporas cambiaba el proceso de crecimiento, se encontró que desde el día uno la cantidad de placa colonizada por el microorganismo era significativamente menor por parte de cada uno de los tratamientos comparados con el control, no obstante al tercer día de crecimiento esta diferencia solo se encontraba por parte del tratamiento con 0.2 g de carbón activado, se puede afirmar que el tratamiento con 0.2 g retarda el crecimiento de *Lasiodiplodia macrospora* (Figura 16).

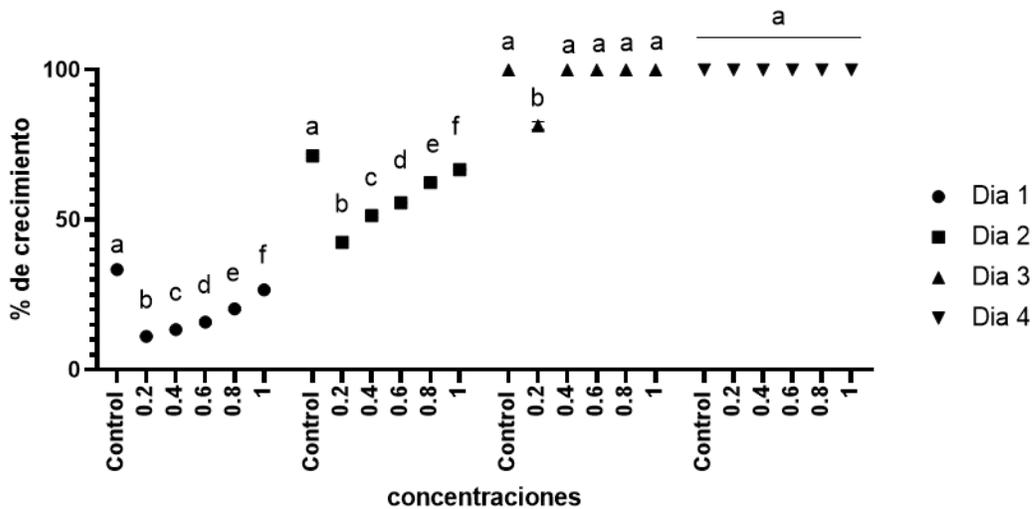


Figura 16. Determinación del porcentaje de crecimiento de *Lasiodiplodia macropora* a distintas concentraciones.

Al monitorear quincenalmente el tiempo de vida del microorganismo en medio PDA se observó que, este es capaz de permanecer viable hasta tres meses (Tabla 6), no obstante, al pasar el tiempo el microorganismo va perdiendo la capacidad de dar su pigmentación característica.

Tabla 6. Evaluación de tiempo de vida de *Lasiodiplodia macrospora* en CA F-400

TIEMPO	PRESENCIA	EVIDENCIA
1 SEMANA	+	
2 SEMANAS	+	



4.7 Germinación y desarrollo simbiótico de protocormos de *Stanhopea tigrina* Bateman.

Durante la germinación simbiótica de *S. tigrina* se encontró que los protocormos comenzaban a germinar a los siete días de crecimiento tanto en el tratamiento como en control no obstante el tratamiento con el hongo *Lasiodiplodia macrospora* (LAM-F) era mejor comparado con el control desde los 14 días de co-cultivo con el hongo, teniendo al término del experimento un total de 95 % de germinación, mientras que el control denotaba solo un 27 % de germinación al finalizar del experimento (Figura 17-18), en este experimento se encontraba diferencias significativas en la segunda y última medición de los valores de germinación por parte del tratamiento con el hongo (LAM-F).

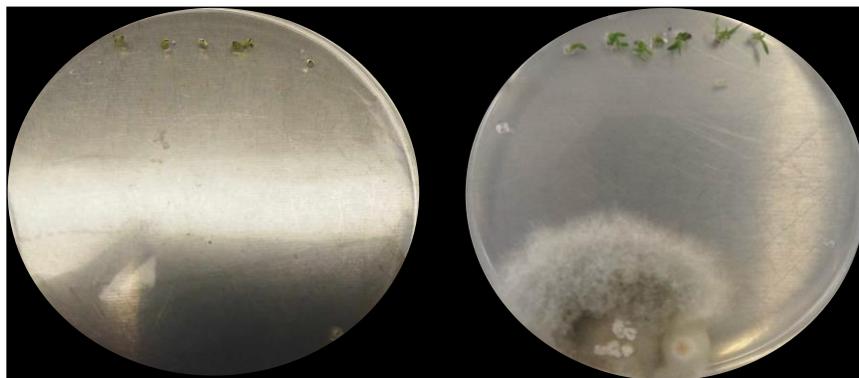


Figura 17. Evaluación de germinación de *Stanhopea tigrina* después de 22 días de interacción con *Lasiodiplodia macrospora*

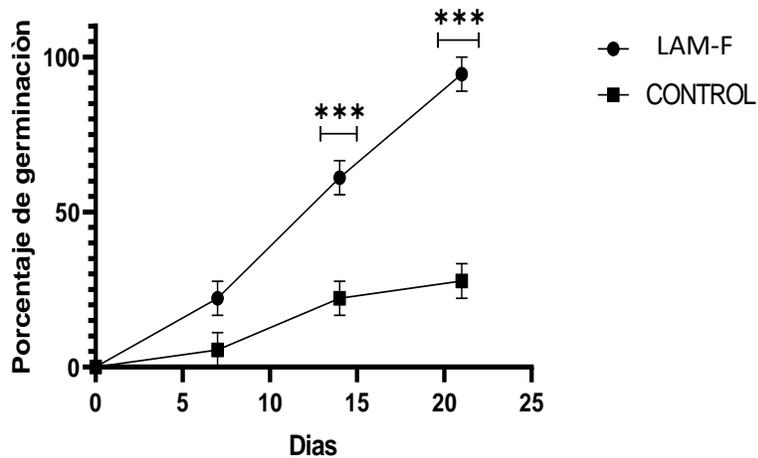


Figura 18. Evaluación de germinación de *Stanhopea tigrina* cada 5 días durante 22 días de interacción con *Lasiodiplodia macrospora*.

LAM-F *Lasiodiplodia macrospora* adsorbido en carbón activado F-400

Después del subcultivo de *S. tigrina* se encontraron respuestas positivas posterior a la interacción con el microorganismo, se observó un aumento del triple en el número de hojas comparada con el control, y al final del experimento se encontró una diferencia significativa de hasta una confianza del 99 % (Figura 20), resultados similares se encontraron en el desarrollo de brotes, ya que a partir de la tercera semana se encontró un incremento de hasta tres veces más el número de brotes exhibida por el control, mientras que al finalizar el ensayo se observó un aumento significativo comparado con el control de hasta cuatro veces el número de brotes (Figura 21), mostrando que *Lasiodiplodia macrospora* no solo es capaz de ayudar a la germinación de *S. tigrina* si no que este puede ayudar a su promoción de crecimiento (Figura 19).

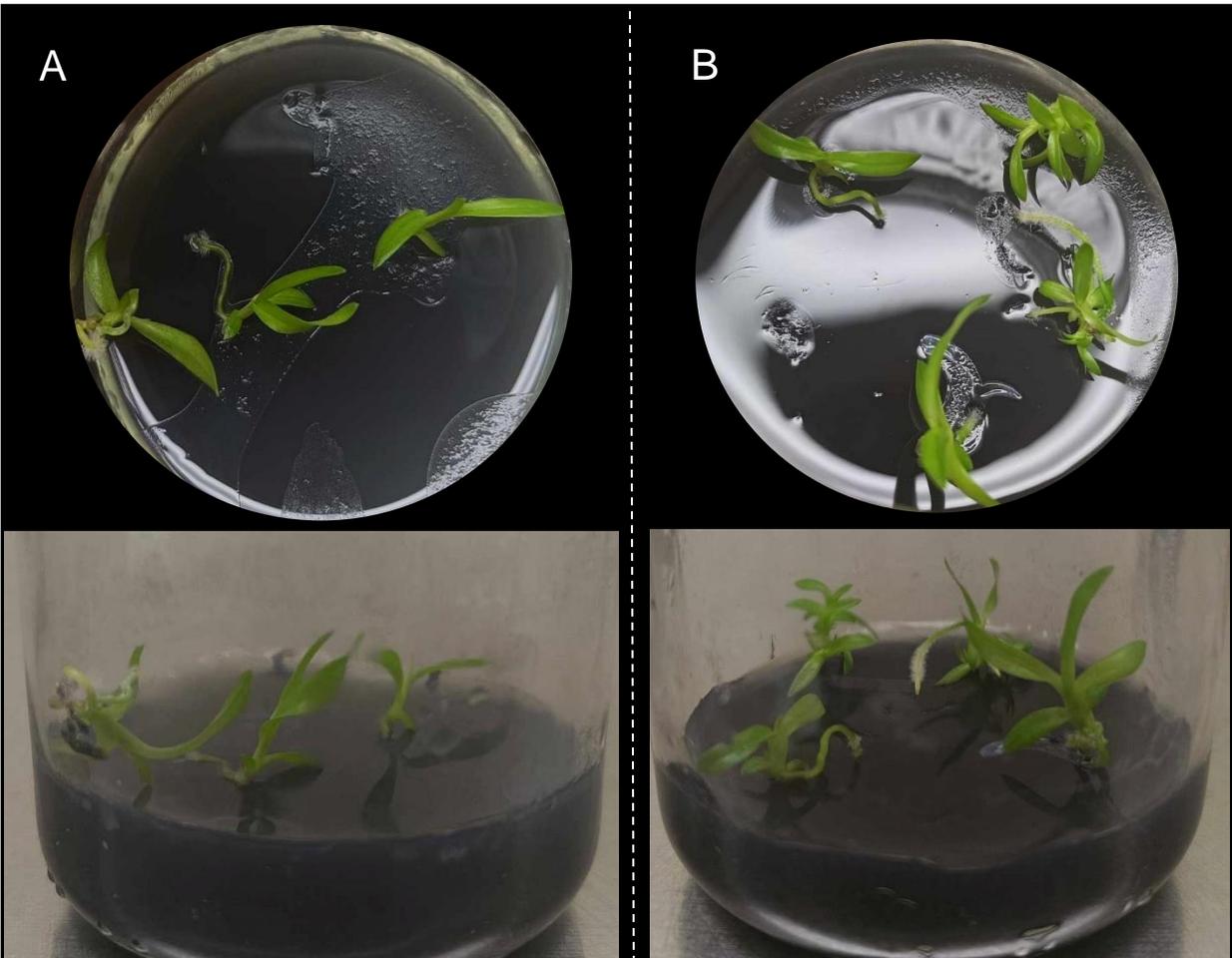


Figura 19. Evaluación del desarrollo de *S. tigrina* después de 4 semanas de interacción con *Lasiodiplodia macrospora* A) se muestra el crecimiento de la planta control B) se ilustra el crecimiento del tratamiento con *Lasiodiplodia macrospora*.

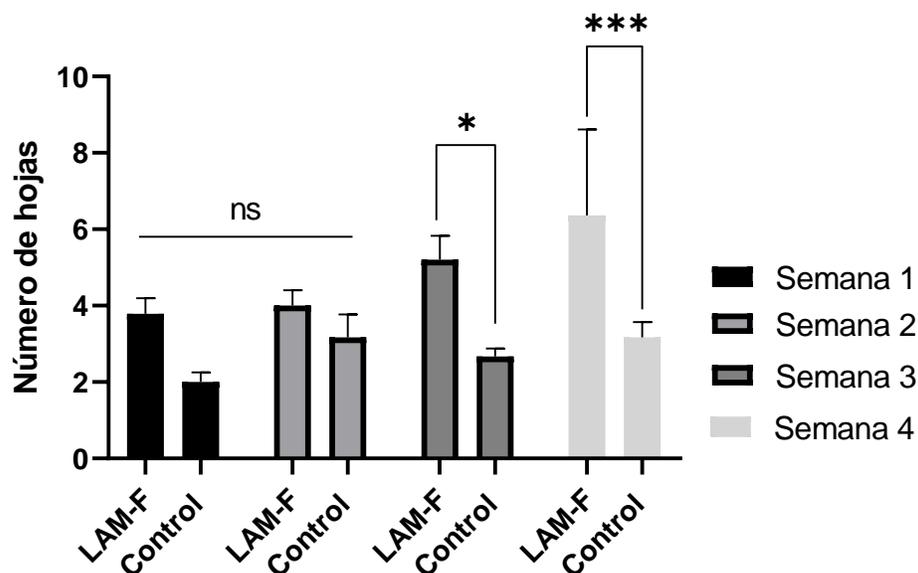


Figura 20. Evaluación del número de brotes *S. tigrina* después de 4 semanas de interacción con *Lasiodiplodia macrospora*. LAM-F (*Lasiodiplodia macrospora* incorporado en carbón activado F-400).

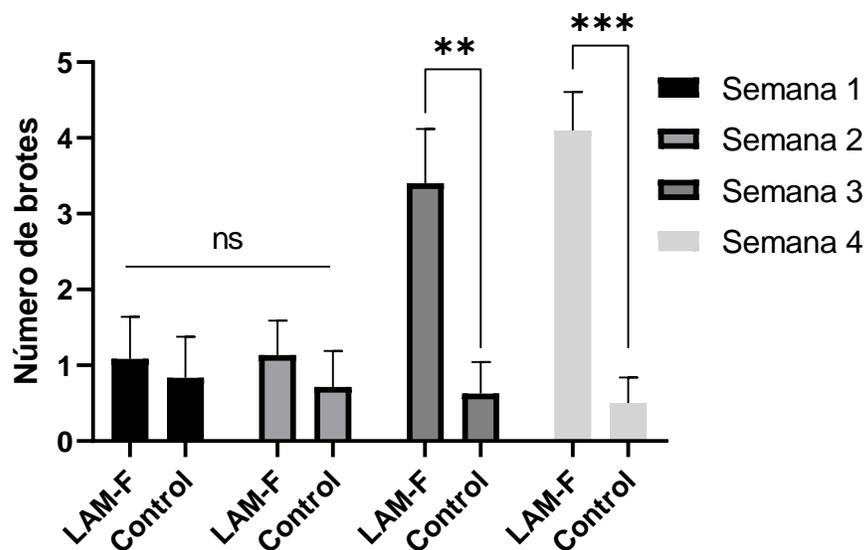


Figura 21. Evaluación del número de hojas de *S. tigrina* después de 4 semanas de interacción con *Lasiodiplodia macrospora*. LAM-F (*Lasiodiplodia macrospora* incorporado en carbón activado F-400).

V DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se conoce ampliamente que los hongos se encuentran involucrados en el desarrollo y el crecimiento de las orquídeas, no obstante, se han planteado distintas hipótesis de cómo se da esta interacción, la más aceptada es la existencia de dos grupos de hongos: los micorrícicos y los endófitos, los cuales interactúan con las orquídeas de distintas maneras como protegiéndolas de agentes patógenos o solubilizando nutrientes para su rápida asimilación (Tyc *et al.*, 2017; Pujasatria *et al.*, 2020; Selosse *et al.*, 2022;). No obstante, en estudios recientes se ha señalado que estas relaciones no son fijas, están en constante cambio y son capaces de realizar redes micorrícicas entre los distintos árboles para intercambiar nutrientes e información, además pueden resultar que distintos hongos son mejores apoyando en diferentes etapas del desarrollo (Petrolli *et al.*, 2022). En la presente investigación se observó este fenómeno ya que al evaluar la interacción entre los hongos anteriormente aislados de *S. tigrina* y la planta modelo *A. thaliana* se encontró que al utilizar sistemas de placa sencilla y con división, el hongo *L. macrospora* mejoró algunos de los parámetros de crecimiento como longitud de raíz, peso fresco y longitud de hipocótilo, no obstante, al evaluarlos directamente en la germinación no se encontraban cambios significativos comparado con el control. Por otra parte, resultaron ser los mejores en esta etapa del desarrollo *Trichoderma sp-A* y *Trichoderma sp-B*. El género *Trichoderma* es comúnmente conocido como promotor de crecimiento en distintas especies de plantas como en *Handroanthus serratifolius* en donde se encontró un aumento de hasta 76 % en la geminación cuando se dio la interacción con *Trichoderma* (Dos Santos *et al.*, 2020), asimismo Castillo-Pérez (2018) al evaluar *Trichoderma hamatum* encontró un 100 % de germinación en *Phaseolus vulgaris* en tan solo 10 días de cultivo. Por otra parte, al utilizar *A. thaliana* se ha encontrado que *Trichoderma harzianum* aun a pesar de someter las semillas a estrés salino fue posible la germinación de ellas, denotando una gran similitud con nuestros resultados; por otra parte el género de hongos *Lasioidiplodia* no es comúnmente catalogado como benéfico sino todo lo contrario, se ha reportado que causa clorosis, manchas necróticas y decoloración vascular (Ali *et al.*, 2020; Yang,

2021), aunque otras investigaciones han encontrado que puede ser promotor de crecimiento por ejemplo Srivastava *et al.* (2012), demostró que este género tiene la capacidad de mejorar la longitud da raíz, numero de hojas, brotes y peso seco de la planta de guisantes y de arroz respuesta semejante a la encontrada en esta investigación, esto puede ser debido al aumento de las temperaturas que ayudaron en la adaptabilidad de este género para colonizar especies vegetales y a que posiblemente el hongo al estar en un ambiente controlado donde el estrés es nulo, no este activando genes de patogenia que no necesita en ese momento y le requerirían de un mayor gasto de energía por parte del microorganismo (Aschehoug *et al.*, 2012; Delaye *et al.*, 2013;). Además, se complementa con el hecho de que los investigadores como Salvatore *et al.* (2020), han realizado metaanálisis encontrando que *Lasiodiplodia* en 160 casos de endofismos de los cuales 21 fueron de orquídeas indicando una alta adaptación de estos hongos, otro hongo que destaco en menor medida fue el hongo *Penicillium* sp., demostró resultados positivos en el aumento de los caracteres fenotípicos observados no obstante en valores asociados al metabolismo no se encontraron diferencias significativas comparadas, además se encontró marchites en los cotiledones por lo cual se cree que es un hongo necrótico capaz de aprovecharse de metabolismo de la planta para obtener sus nutrientes y causando la muerte de distintos tejidos hasta todo el tejido de las plantas (Delaye *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2023).

Debido a las características mostradas por *L. macrospora* y *Trichoderma* sp sobre la promoción de crecimiento vegetal además de los beneficios del uso del carbón activado en el cultivo *in vitro* de orquídeas, se evaluó la adsorción de dichos hongos sobre el carbón activado F-400, no obstante, debido a la a la poca sobrevivencia de *Trichoderma* sp-A sobre este material solo se realizaron los ensayos con *Lasiodiplodia macrospora* (Tabla 8). El uso de carbón activado como medio de soporte para el crecimiento de microorganismos ha sido poco estudiado, pero en esta investigación fue evaluado para contar con un soporte enriquecido que permitiera la investigación de las propiedades de hongo generalmente clasificado como patógeno. Usualmente, se utiliza biochar, como en el caso de Hammer *et al.* (2014), que utilizo un biochar de corteza de árbol, encontrando una viabilidad de la cepa

Rhizophagus irregularis de hasta 10 semanas, mientras que en nuestro caso se encontró una actividad de hasta 12 semanas utilizando el carbón activado F-400. El hecho de que se utiliza biochar para la implementación del hongo es debido a que comúnmente se piensa que al ser un residuo agroindustrial o que se pueda partir desde un desecho para realizarlo es menos costoso. No obstante, en un metaanálisis hecho por Alhashimi *et al.* (2017) comparando los precios y los beneficios que la implementación que estos mostraban no había evidencia de diferencias significativas en el costo, mas no así en los beneficios de utilizar carbón activado. El carbón activado que se utilizó en el presente estudio fue el F-400 que tiene características notables en comparación de biochars, por ejemplo posee un área específica 987 m²/g y un volumen de poro de 0.59 cm³/g (Ramos, 2017), mientras que en la Tabla 9 se presentan distintos biochars y sus respectivas áreas específicas notándose que el más alto es de tan solo 302 m²/g teniendo así el F-400 hasta un 300 % de mayor área de superficie dándole la capacidad de poder tener mayor número de esporas agrupadas en su superficie lo que resulta en poder agregar una menor cantidad de carbón activado al suelo minimizando el impacto que podría tener en el ciclo del carbono (Gujre *et al.*, 2021). Este aumento de la vida útil del microorganismo puede ser debido a que el carbón activado puede servir como fuente de nutrientes para el hongo (Zheng *et al.*, 2018), además la estructura porosa del carbón activado aumenta la superficie que puede colonizar el hongo retardando el tiempo en que le toma colonizar la placa (Ruan *et al.*, 2019).

Los experimentos realizados con el carbón activado demostraron que es un buen medio de soporte para el hongo *Lasiodiopodia macrospora*, asimismo al realizar experimento de interacción con su hospedero natural se encontraron respuestas positivas en la etapa de germinación de protocormos de *S. tigrina*, encontrándose un porcentaje del 95 % de germinación, la formación de hojas y tallo a los 22 días de cultivo. Dichos resultados fueron superiores a los encontrados por Moreno-Martínez y Menchaca-García (2007), quienes utilizaron sustratos orgánicos para la estimulación de la geminación de esta misma orquídea obteniendo un 90 % de germinación a los 60 días y a los 30 días posteriores a la formación del protocormo, encontraron diferenciación de tejidos vegetales. En otra investigación realizada por

Castillo-Pérez *et al.* (2021), utilizaron semillas de *S. tigrina* con la adición de sustratos orgánicos suplementados con la hormona 6-bencilaminopurina (BAP), se observó la formación de protocormos a los 35 días, y posteriormente la formación de tejidos. En el presente estudio se pudo observar que la utilización de *L. macrospora* incorporado en el carbón activado es capaz de aumentar el porcentaje de germinación y acortar el tiempo de la diferenciación de los tejidos comparado con otras metodologías, ya que las orquídeas requieren de condiciones simbióticas para poder germinar en el medio ambiente natural dado que no son capaces de tomar los nutrientes por sí solas en condiciones ambientales (Pujasatria *et al.*, 2020) y generalmente es necesaria la presencia de algún hongo benéfico que le solubilice los nutrientes para su desarrollo (Nikabadi *et al.*, 2014; Valadares *et al.*, 2020). Además, la adición del carbón activado F-400 apoya en la captación de etileno y volátiles nocivos en exceso como amoníaco que las orquídeas expulsan durante su metabolismo (Chen *et al.*, 2017).

El uso de aditamentos orgánicos como el carbón activado, musgo de turba y cortezas tiene características importantes en el desarrollo de las orquídeas (Chin *et al.*, 2019; Basiri Jahromi *et al.*, 2020), no obstante existen pocas investigaciones donde se utilizan aditamentos orgánicos en la fase *in vitro* con la adición de microorganismos, por ejemplo Mala *et al.* (2017), utilizaron musgo de turba suplementado con *Tulasnella deliquescens* en orquídeas del género *Dendrobium* en las cuales obtuvieron un 67.8 % y 82.4% de plantas germinadas teniendo diferencia significativa frente al control. Mala *et al.* (2017), describieron que posiblemente la falta de ventilación en los frascos afectó las tasas de germinación, por otra parte, el carbón activado tiene una gran capacidad como agente adsorbente por lo cual podría almacenar estas sustancias en su superficie y minimizando los impactos negativos de los exudados de las orquídeas (Sipayung, 2018; Souza *et al.*, 2021;).

Al realizar el subcultivo de las plantas para observar si el estímulo realizado por *L. macrospora* tenía una acción prolongada sobre el desarrollo de *S. tigrina* se encontró que, en efecto, se encontraba un estímulo del desarrollo aun cuando el

hongo no se encontraba junto a la orquídea. Se obtuvo una media de 4.2 brotes y 6.1 hojas al cabo de 4 semanas mientras que Castillo-Pérez *et al.* (2021), en su mejor tratamiento obtuvo medias de 1.25 brotes y 2.65 cm de tamaño de hojas después de 4 semanas utilizando sustratos orgánicos. Esto demuestra que la adición del hongo al carbón activado incrementa la formación de nuevos brotes en las plántulas de *S. tigrina*. El fenómeno de la promoción de crecimiento después de realizar el subcultivo sin el hongo puede ser debido a que este haya secretado alguna regulador de crecimiento que desencadeno una respuesta en el metabolismo y así promover su crecimiento y minimizar el estrés causado por el cambio de medio (Mandal, 2010; Shah *et al.*, 2022;), además el hongo al ser endófito de la orquídea puede lograr interactuar con los fitoquímicos que le permitirían ser reconocido como propio y no desencadenar respuestas inmunes por parte de la planta (Zeng *et al.*, 2018), asimismo se ha encontrado otra especie de *Lasiodiopodia* que también es endófito y fue capaz de producir ácido jasmónico (Tsukada *et al.*, 2010), por lo que es posible que la cepa estudiada en este proyecto tenga la capacidad de sintetizar algún regulador de crecimiento.

VI. CONCLUSIONES

De los hongos aislados de *Stanhopea tigrina* se encontraron dos con características de promoción de crecimiento: *Trichoderma sp-A* y *Lasiosiplodia macrospora* que fueron capaces de favorecer el desarrollo de crecimiento en la planta modelo *A. thaliana*. *Trichoderma sp-A*, aumento el tamaño del hipocotílo dos veces el control, la cantidad de clorofila en más del triple. Además, incremento el porcentaje de germinación en placas divididas en un 40% mientras que *Lasiosiplodia macrospora* en un 30 % la longitud de raíz en un 10 %, el peso fresco en un 50 % y la cantidad de clorofila en un 200 %.

Trichoderma sp-A favoreció el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*, no obstante, demostró poca compatibilidad con el carbón activado F-400, por lo tanto, se descartó para los experimentos de adsorción y características sobre el carbón activado

Se estableció un sistema de adsorción del hongo *Lasiodiplodia macrospora* sobre carbón activado F-400, demostrando una viabilidad de este durante 3 meses, además aumento la latencia del hongo de 5 a 7 días.

El carbón activado F-400 con *Lasiodiplodia macrospora* favoreció la germinación en un 95 % y el desarrollo de hojas y brotes en más del triple en *S. tigrina*.

VII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Los resultados generados en la presente investigación contribuyen a un mejor entendimiento de cómo se relacionan los hongos endófitos con *Stanhopea tigrina*, y a su vez apoyar en la conservación de dicha orquídea, debido a que actualmente se encuentra amenazada y se han tenido problemas para su germinación, así como su desarrollo a través de explantes, se sugiere seguir investigando el potencial de cepas endófitas para el correcto desarrollo de las vitro-orquídeas.

El uso de *Lasiodiplodia macrospora* demostró que cepas catalogadas como perjudiciales podrían no serlo o haber generado endofismo en orquídeas, por lo tanto, se recomienda no descartar cepas a pesar de antecedentes de patogenia en otro de plantas.

El carbón activado F-400 demostró la capacidad de ser medio de reserva para *Lasiodiplodia macrospora* maximizando su vida útil, y mejoró la eficiencia de su uso, no obstante, *Trichoderma sp-A* no fue compatible con este carbón activado por lo cual es imperativo conocer que características de los hongos que están implicadas en la interacción del hongo y el carbón activado.

Por último, la interacción entre el hongo *Lasiodiplodia macrospora* y el carbón activado F-400 demostró ser capaz de estimular la germinación y el desarrollo de *S. tigrina*, el hecho de que el carbón activado no haya minimizado el impacto del hongo sobre la orquídea demuestra que no ha intervenido en la interacción de la planta y el hongo por lo cual sería interesante evaluar si este mecanismo se da de manera *ex vitro*, lo cual sería muy importante para la conservación de *Stanhopea tigrina*.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackerman, J. D., Phillips, R. D., Tremblay, R. L., Karremans, A., Reiter, N., Peter, C. I., Y Liu, H. (2023). Beyond the various contrivances by which orchids are pollinated: global patterns in orchid pollination biology. *Botanical Journal of the Linnean Society*.

Altland, J. E., Locke, J. C. y Krause, C. R. (2014). Influencia del tamaño de partícula de la corteza de pino y el pH en la capacidad de intercambio catiónico. *HortTechnology*, 24(5), 554-559.

Altpeter F., Springer N. M., Bartley L. E., Blechl A. E., Brutnell T. P., Citovsky V., Conrad L., Gelvin S. B., Jackson D., Kausch A. P., Lemaux P. G., Medford J. I., Orozco-Cardenas M., Tricoli D., VanEck J., Voytas D. F., Walbot V., Wang K., Zhang Z. J., Stewart C. N. (2016) Advancing crop transformation in the era of genome editing. *Plant Cell*, 28, 1510–1520.

Baguette, M., Bertrand, J. A., Stevens, V. M., & Schatz, B. (2020). Why are there so many bee-orchid species? Adaptive radiation by intra-specific competition for mnesic pollinators. *Biological Reviews*, 95(6), 1630-1663.

Basiri Jahromi, N., Fulcher, A., Walker, F., & Altland, J. (2020). Optimizing substrate available water and coir amendment rate in pine bark substrates. *Water*, 12(2), 362.

Brenes, A. A., Castillo, M. R., y Gómez, A. L. (2015). Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (*Vaccinium* spp.) a partir de segmentos foliares de dos procedencias. *Agronomía Costarricense*, 39, 7-23

Brennan, A., Jiménez, E. M., Albuquerque, J. A., Knapp, C. W. y Switzer, C. (2014). Effects of biochar and activated carbon amendment on maize growth and the uptake and measured availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and potentially toxic elements (PTEs). *Environmental pollution*, 193, 79-87.

Burd, M., Stayton, C. T., Shrestha, M. y Dyer, A. G. (2014). Distinctive convergence in Australian floral colours seen through the eyes of Australian birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1781).

Camargo, S. S., Rodrigues, D. B., Rodrigues, C. M., de Assis, A. M., de Faria, R. T., y Schuch, M. W. (2015). Phytoregulators and light spectrum in micropropagation *Oncidium baueri* Lindl./Fitorreguladores e espectros de luz na micropropagacao de *Oncidium baueri* Lindl. *Ciência Rural*, 45(11), 2007-2013.

Castañeda, N. B., Barrera, C. A. C., & Perez, M. M. (2023). Revisión sistemática sobre tipos de sustratos utilizados en la propagación de orquídeas bajo invernadero. *Revista Mutis*, 13(1), 1-18.

Castillo-Pérez, L. J., Martínez-Soto, D., Fortanelli-Martínez, J. y Carranza-Álvarez, C. (2021). Germinación asibiótica de semillas, desarrollo in vitro de plántulas y aclimatación simbiótica de la orquídea mexicana amenazada *Stanhopea tigrina*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 146, 249-257.

Castro, J. B. y Singer, R. B. (2019). A literature review of the pollination strategies and breeding systems in *Oncidiinae* orchids. *Acta Botanica Brasilica*, 33, 618-643.

Chand, K., Shah, S., Sharma, J., Paudel, M. R., & Pant, B. (2020). Isolation, characterization, and plant growth-promoting activities of endophytic fungi from a wild orchid *Vanda cristata*. *Plant signaling & behavior*, 15(5).

Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnol Lett*, 32, 1199–1205

Chen, J., Liu, S. S., Kohler, A., Yan, B., Luo, H. M., Chen, X. M., & Guo, S. X. (2017). iTRAQ and RNA-Seq analyses provide new insights into regulation mechanism of symbiotic germination of *Dendrobium officinale* seeds (Orchidaceae). *Journal of proteome research*, 16(6), 2174-2187.

Cheruvathur, M. K.; Abraham, J.; Mani, B. y Thomas, T. D. Adventitious (2010).shoot induction from cultured intermodal explants of *Malaxis acuminata* D. Don, a valuable

terrestrial medicinal orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 101, n. 2, p. 163-170.

Chin, C. K., Lee, Z. H., Mubbarakh, S. A., Antony, J. J. J., Chew, B. L., & Subramaniam, S. (2019). Effects of plant growth regulators and activated charcoal on somaclonal variations of protocorm-like bodies (PLBs) of *Dendrobium Sabin* Blue orchid, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22.

Chodak, M., Chokheli, V. A., Dmitriev, P. A., Rajput, V. D., Bakulin, S. D., Azarov, A. S., Varduni, T. V., ... & Minkina, T. M. (2020). Recent development in micropropagation techniques for rare plant species. *Plants*, 9(12), 1733.

Chowdappa, S., Jagannath, S., Konappa, N., Udayashankar, A. C. y Jogaiah, S. (2020). Detection and characterization of antibacterial siderophores secreted by endophytic fungi from *Cymbidium aloifolium*. *Biomolecules*, 10(10), 1412.

Çiğ, A., D Durak, E., & İşler, S. (2018). In vitro symbiotic germination potentials of some *Anacamptis*, *Dactylorhiza*, *Orchis* and *Ophrys* terrestrial orchid species. *Ecology and Environmental RESEARCH*, 16(4):5141-5155.

CORTEZ, S. Z. (2021). Efecto del tamaño del explante en la propagación in vitro de *Stanhopea tigrina* (Orchidaceae) (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO).

Cruz, S. M., Aguirre, J. M. L., Félix, J. M. E., y Torres, S. M. S. (2016). Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero. *Dominio de las Ciencias*, 2, 63-89.

De, 2020. Organic Nutrient Solutions for Commercial Cultivation of Orchids. *Research Today*, 2(5),214- 217.

Debnarh M., Malik C. P., Baisen P. S. (2006) Micropropagation:a tool for the production of high quality plant based medicines. *Curr Pharm Biotechnol*, 7, 33–49.

Delaye, L., García-Guzmán, G. y Heil, M. (2013). Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens—are fungal lifestyles evolutionarily stable traits?. *Fungal Diversity*, 60(1), 125-135.

Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A. y García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Plants*, 248, 1–18

Faleiro, F. V., Nemésio, A. y Loyola, R. (2018). Climate change likely to reduce orchid bee abundance even in climatic suitable sites. *Global Change Biology*, 24(6), 2272-2283.

Fan, D., Gilbert, E. J., & Fox, T. (2017). Current state of in situ subsurface remediation by activated carbon-based amendments. *Journal of environmental management*, 204, 793-803.

Favre-Godal, Q., Gourguillon, L., Lordel-Madeleine, S., Gindro, K. y Choisy, P. (2020). Orchids and their mycorrhizal fungi: an insufficiently explored relationship. *Mycorrhiza*, 30, 5-22.

Fay, M. F. (2018). Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century?. *Botanical studies*, 59, 1-6.

Félix, C.; Libório, S.; Nunes, M.; Félix, R.; Duarte, A. S.; Alves, A. y Esteves, A. C. (2018). *Lasiodiplodia theobromae* como productor de enzimas biotecnológicamente relevantes. *Int. J. Mol.* 19, 29.

Gale, N. V., Halim, M. A., Horsburgh, M., & Thomas, S. C. (2017). Comparative responses of early-successional plants to charcoal soil amendments. *Ecosphere*, 8(10).

Gaskett, A. C. (2011). Orchid pollination by sexual deception: pollinator perspectives. *Biological Reviews*, 86(1), 33-75.

Ghosh, D., Masto, R. E., & Maiti, S. K. (2020). Ameliorative effect of Lantana camara biochar on coal mine spoil and growth of maize (*Zea mays*). *Soil Use and Management*, 36(4), 726-739.

Gilmour, C., Bell, T., Soren, A., Riedel, G., Riedel, G., Kopec, D., ... & Ghosh, U. (2018). Activated carbon thin-layer placement as an *in situ* mercury remediation tool in a Penobscot River salt marsh. *Science of The Total Environment*, 621, 839-848.

Gil-Rivero, A. E., López-Medina, S. E., y López-Zavaleta, A. (2017). Aclimatación de plántulas in vitro de *Saintpaulia ionantha* H. Wendl.(Gesneriaceae)" violeta africana" a condiciones de invernadero. *Arnaldoa*, 24, 343-350.

Gołębiewski, M., Morawska-Płoskonka, J., Kuduk, K., y Niklińska, M. (2015). Soil chemical properties affect the reaction of forest soil bacteria to drought and rewetting stress. *Annals of microbiology*, 65, 1627-1637.

Gómez, O. C., Moreira, D. M. B., y Luiz, J. H. H. (2021). Medicinal potentialities and pathogenic profile of *Lasiodiplodia* genus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37, 1-12.

Govaerts, R., Nic Lughadha, E., Black, N., Turner, R. y Paton, A. (2021). The World Checklist of Vascular Plants, a continuously updated resource for exploring global plant diversity. *Scientific Data*, 8(1), 215.

Guato Jiménez, L. J. (2014). Influencia de cuatro tipos de sustratos en la fase inicial de desarrollo de dos especies de orquídeas (*Dendrobium earsakul* y *Dendrobium sky blue*), obtenidas por cultivo in vitro (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).

Gujre, N., Soni, A., Rangan, L., Tsang, D. C., & Mitra, S. (2021). Sustainable improvement of soil health utilizing biochar and arbuscular mycorrhizal fungi: A review. *Environmental Pollution*, 268.

Hariyanto, S., Jamil, A. R., y Purnobasuki, H. (2019). Effects of plant media and fertilization on the growth of orchid plant (*Dendrobium sylvanum* rchb. F.) in acclimatization phase. *Planta Tropika: Jurnal Agrosains (Journal of Agro Science)*, 7(1), 67-72.

Hartanto, A., Munir, E., Basyuni, M., Saleh, M. N., Hastuti, L. D. S., Yurnaliza, Y., ... & Lutfia, A. (2023). Antifungal activity of volatile organic compounds (VOC) by an endophytic fungus, *Lasiodiplodia avicenniae* P2P4 FROM *Avicennia alba* AGAINST *Fusarium oxysporum*. *Rasayan Journal of Chemistry*, 16(1).

Hassler, Michael (2004 - 2023): World Orchids. Synonymic Checklist and Distribution of the Orchids of the World. Version 15.4; last update June 1st, 2023. - www.worldplants.de/orchids/. Last accessed 06/09/2023.

Hernández Orta, M.M.G., J. Mendoza Barrón, R.M. Guerrero Coronado y R. Leyva Ramos. Rev. Int. Contam. Ambient.,2003, 19(3), 135-142

Herrera H., Valadares R., Oliveira G. (2018) Adaptation and tolerance mechanisms developed by mycorrhizal *Bipinnula fimbriata* plantlets (Orchidaceae) in a heavy metal-polluted ecosystem. Mycorrhiza 28:651–663. <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0858-4>

Higashi, Y., y Saito, K. (2019). Lipidomic studies of membrane glycerolipids in plant leaves under heat stress. Progress in lipid research, 75.

Hinsley, A., Nuno, A., Ridout, M., John, F. A. S., y Roberts, D. L. (2017). Estimating the extent of CITES noncompliance among traders and end-consumers; lessons from the global orchid trade. Conservation Letters, 10(5), 602-609.

Hou, X. Q., & Guo, S. X. (2009). Interaction between a dark septate endophytic isolate from *Dendrobium* sp. and roots of *D. nobile* seedlings. Journal of integrative plant biology, 51(4), 374-381.

Huang, J., Xu, J., Wang, Z., Khan, D., Niaz, S. I., Zhu, Y., ... & Liu, L. (2017). New lasiodiplodins from mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia* sp. 318#. Natural product research, 31(3), 326-332.

Hussain, A., Qarsh, I. A. I., Nazir, H. y Ullah I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. Recent Advances in Plant In Vitro Culture via Intech Open Access,1, 1-28.

Idris, N. A., Zuhir, Z. M., Radzuan, N. A. M., Muda, N. S. Y Rosli, R. I. (2019). Respuesta in vitro de hongos aislados de orquídeas en BRIS, Humedal Setiu y manglar en Morib, a diferentes concentraciones de plomo. Biología aplicada de Malasia, 48(1), 229-233.

Intriago, R. A. (2020). *Chysis bractescens* Lindl. perspectivas para su micropropagación: Revisión de literatura.

Jackson, B. E., Wright, R. D., y Alley, M. M. (2009). Comparison of fertilizer nitrogen availability, nitrogen immobilization, substrate carbon dioxide efflux, and nutrient leaching in peat-lite, pine bark, and pine tree substrates. *HortScience*, 44(3), 781-790.

Jain, A., Sarsaiya, S., Chen, J., Wu, Q., Lu, Y., y Shi, J. (2021). Changes in global Orchidaceae disease geographical research trends: recent incidences, distributions, treatment, and challenges. *Bioengineered*, 12(1), 13-29.

Jersakova, J., & Johnson, S. D. (2006). La falta de néctar floral reduce la autopolinización en una orquídea polinizada por mosca. *Ecología*, 147, 60-68.

Jersáková, J., Johnson, S. D., y Kindlmann, P. (2006). Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological reviews*, 81(2), 219-235.

Jersáková, J., Johnson, S.D. (2006). Lack of floral nectar reduces self-pollination in a fly-pollinated orchid. *Oecologia* 147, 60–68.

Jing Quan Y. (2016). Effect of the addition of activated charcoal to the nutrient solution on the growth of tomato in hydroponic culture. Faculty of Agriculture, Shimane University, Matsue, Japan

Kerré, B., Willaert, B., Cornelis, Y., & Smolders, E. (2017). Long-term presence of charcoal increases maize yield in Belgium due to increased soil water availability. *European Journal of Agronomy*, 91, 10-15.

Kumar, A. (2019). Effect of *Trichoderma* spp. in plant growth promotion in chilli. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, 8, 1574–1581.

Kumar, A. y Verma, J. P. (2018). Does plant—microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review?. *Microbiological research*, 207, 41-52.

Kumar, R., Kumari, K., Hembram, K. C., Kandha, L. y Bindhani, B. K. (2019). Expression of an endo α -1, 3-Glucanase gene from *Trichoderma harzianum* in rice

induces resistance against sheath blight. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 28, 84-90.

Kwiatkowska-Malina, J. (2018). Functions of organic matter in polluted soils: The effect of organic amendments on phytoavailability of heavy metals. *Applied Soil Ecology*, 123, 542-545.

Lakshman Chandra De (2020). Morphological diversity in orchids. *International Journal of Botany Studies*, 5, 229-238.

Lallemand F, Martin-Magniette M-L, Gilard F *et al* (2019) In situ transcriptomic and metabolomic study of the loss of photosynthesis in the leaves of mixotrophic plants exploiting fungi. *Plant J*, 98, 826– 841.

Lefèvre, E., Bossa, N., Gardner, C. M., Gehrke, G. E., Cooper, E. M., Stapleton, H. M. y Gunsch, C. K. (2018). Biochar and activated carbon act as promising amendments for promoting the microbial debromination of tetrabromobisphenol A. *Water research*, 128, 102-110.

Leitão, A. L. y Enguita, F. J. (2016). Gibberellins in *Penicillium* strains: challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. *Microbiological research*, 183, 8-18.

Liu, N., Jacquemyn, H., Liu, Q., Shao, S. C., Ding, G., & Xing, X. (2022). Effects of a dark septate fungal endophyte on the growth and physiological response of seedlings to drought in an epiphytic orchid. *Frontiers in Microbiology*, 13.

Lu, H., Wei, T., Lou, H., Shu, X. y Chen, Q. (2021). A critical review on communication mechanism within plant-endophytic fungi interactions to cope with biotic and abiotic stresses. *Journal of Fungi*, 7(9), 719.

Mala, B., Kuegkong, K., Sa-Ngiaemsri, N. y Nontachaiyapoom, S. (2017). Effect of germination media on in vitro symbiotic seed germination of three *Dendrobium* orchids. *South African Journal of Botany*, 112, 521-526.

Mala, B., Kuegkong, K., Sa-Ngiaemsri, N., & Nontachaiyapoom, S. (2017). Effect of germination media on in vitro symbiotic seed germination of three *Dendrobium* orchids. *South African Journal of Botany*, 112, 521-526.

Mandal S.M., Chakraborty D. y Dey S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signal Behav.* 5, 359–68.

Marsh, H.; Reinoso, F.R. *Carbón Activado*; Elsevier: Ámsterdam, Países Bajos, 2006.

Martén-Rodríguez S, Fenster C.B., Agnarsson I., Skog L.E., y Zimmer E.A. (2010) Evolutionary breakdown of pollination specialization in a Caribbean plant radiation. *New Phytol.* 188, 403–417.

McCormick M.K., Whigham D.F., Sloan D. (2006). Orchid-fungus fidelity: a marriage meant to last? *Ecology* 87:903–911.

Meng Y.Y., Zhang W.L., Selosse M.A y Gao J.Y (2019) Are fungi from adult orchid roots the best symbionts at germination? A case study. *Mycorrhiza*.

Mirani, A. A., Abul-Soad, A. A., & Markhand, G. S. (2017). In vitro rooting of *Dendrobium nobile* Orchid: Multiple responses to auxin combinations. *Notulae Scientia Biologicae*, 9(1), 84-88.

Moraga, E. Q. (2020). Entomopathogenic fungi as endophytes: their broader contribution to IPM and crop production. *Biocontrol. Sci. Techn.* 1, 1–14.

Moreno Martínez, D. y Menchaca García, R. A. (2007). Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación in vitro de *Stanhopea Tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Foresta Veracruzana*, 9(2), 27- 32.

Mukherjee, P. K., Mendoza-Mendoza, A., Zeilinger, S., y Horwitz, B. A. (2022). Mycoparasitism as a mechanism of Trichoderma-mediated suppression of plant diseases. *Fungal Biology Reviews*, 39, 15-33.

Murashige T (1974) Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 135-166.

Nicoletti, R. y Fiorentino, A. (2015) Metabolitos bioactivos de plantas y fármacos producidos por hongos endófitos de Spermatophyta. *Agricultura*, 5, 918–970

Nikabadi, S., Bunn, E., Stevens, J., Newman, B., Turner, S. R., y Dixon, K. W. (2014). Germination responses of four native terrestrial orchids from south-west Western Australia to temperature and light treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118, 559-569.

Astuti, P. y Wahyono, O.A. Nababan Actividades antimicrobianas y citotóxicas de hongos endófitos aislados de *Piper crocatum* (2014) Ruiz & Pav *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 4.

Park, M. J., Back, C. G., y Park, J. H. (2020). *Colletotrichum cymbidiicola* Causing Anthracnose on Cymbidium Orchids in Korea. *Mycobiology*, 48(4), 321-325.

Pascale, A., Vinale, F., Manganiello, G., Nigro, M., Lanzuise, S., Ruocco, M., ... & Lorito, M. (2017). *Trichoderma* and its secondary metabolites improve yield and quality of grapes. *Crop protection*, 92, 176-181.

Phillips A.J.L., Alves A., Abdollahzadeh J., Slippers B., Wingfield M.J., Groenewald, J., Zand Crous P.W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51-167.

Pujasatria, G. C., Miura, C., y Kaminaka, H. (2020). In vitro symbiotic germination: a revitalized heuristic approach for orchid species conservation. *Plants*, 9(12), 1742.

Pujasatria, G. C., Miura, C., & Kaminaka, H. (2020). In vitro symbiotic germination: A revitalized heuristic approach for orchid species conservation. *Plants*, 9(12), 1742.

Qi C., Zhou Q. y Yuan Z. (2018). Kinsenoside: a promising bioactive compound from *Anoectochilus* species. *Curr Med Sci* 38:11–18.

Reddy, J. (2016). Nutrient media used for micropropagation of orchids: a research review. *World J Pharm Res*, 5, 1719-1732.

Rodríguez-Gálvez, E., Guerrero, P., Barradas, C., Crous, P. W., y Alves, A. (2017). Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal biology*, 121(4), 452-465.

Sahoo, H. R. y Gupta, N. (2018). Diversity of endophytic phosphate solubilising fungi associated with *Pomatocalpa decipiens* (Lindl.) JJ Smith—an endangered orchid in Barbara forest of Odisha, India. *Studies in Fungi*, 3(1), 84-99.

Salazar-Cerezo, S., Martinez-Montiel, N., Cruz-Lopez, M. D. C., y Martinez-Contreras, R. D. (2018). Fungal diversity and community composition of culturable fungi in *Stanhopea trigrina* cast gibberellin producers. *Frontiers in microbiology*, 9, 612.

Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 787-799.

Selosse, M. A., Petrolli, R., Mujica, M. I., Laurent, L., Perez-Lamarque, B., Figura, T., ... y Martos, F. (2022). The Waiting Room Hypothesis revisited by orchids: were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes?. *Annals of Botany*, 129(3), 259-270.

Shah, S., Shah, B., Sharma, R. *et al.* La colonización con hongos endófitos cultivables no micorrícicos mejora el crecimiento de las orquídeas y la producción de ácido acético indol. *BMC Microbiol* 22, 101 (2022).

Shah, S., Shah, B., Sharma, R., Rekadwad, B., Shouche, Y. S., Sharma, J., y Pant, B. (2022). Colonization with non-mycorrhizal culturable endophytic fungi enhances orchid growth and indole acetic acid production. *BMC microbiology*, 22(1), 1-13.

Shah, S., Shah, B., Sharma, R., Rekadwad, B., Shouche, Y. S., Sharma, J., y Pant, B. (2022). Colonization with non-mycorrhizal culturable endophytic fungi enhances orchid growth and indole acetic acid production. *BMC microbiology*, 22(1), 1-13.

Shaheen, S. M., y Rinklebe, J. (2015). Impact of emerging and low cost alternative amendments on the (im) mobilization and phytoavailability of Cd and Pb in a contaminated floodplain soil. *Ecological Engineering*, 74, 319-326.

Sharma, S. (2019). *Trichoderma: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications*. In: Yadav, A., Mishra, S., Singh, S., Gupta, A. (eds) *Recent*

Advancement in White Biotechnology Through Fungi. Fungal Biology. Springer, Cham.

Sherif, N. A., Franklin Benjamin, J. H., Senthil Kumar, T., y Rao, M. V. (2018). Somatic embryogenesis, acclimatization and genetic homogeneity assessment of regenerated plantlets of *Anoectochilus elatus* Lindl., an endangered terrestrial jewel orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132, 303-316.

Shrestha, M., Burd, M., Garcia, J. E., Dorin, A., & Dyer, A. G. (2019). Colour evolution within orchids depends on whether the pollinator is a bee or a fly. *Plant Biology*, 21(4), 745-752.

Shrestha, M., Dyer, A. G., Dorin, A., Ren, Z. X., & Burd, M. (2020). Rewardlessness in orchids: how frequent and how rewardless?. *Plant Biology*, 22(4), 555-561

Sipayung, P., Matanari, J., Lafau, M. B., Sulastri, Y. S., Ginting, B. B., Sihombing, D. R., ... & Giawa, T. (2018). The effect of activated charcoal dose and benzyl amino purine concentration on the growth of orchid plantlets in murashige and skoog media in vitro. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.

Slippers, B., Boissin, E., Phillips, A. J. L., Groenewald, J. Z., Lombard, L., Wingfield, M. J., & Crous, P. W. (2013). Phylogenetic lineages in the Botryosphaerales: a systematic and evolutionary framework. *Studies in mycology*, 76(1), 31-49.

Sood, M., Kapoor, D., Kumar, V., Sheteiwiy, M. S., Ramakrishnan, M., Landi, M., ... & Sharma, A. (2020). Trichoderma: The “secrets” of a multitalented biocontrol agent. *Plants*, 9(6), 762.

Souza, D. M. S. C., Fernandes, S. B., Molinari, L. V., Avelar, M. L. M., y Brondani, G. E. (2021). Activated charcoal application for the micropropagation of *Cattleya crispata* (Thunb.) Van den Berg. *Nativa*, 9(4), 352-358.

Srivastava, S., Kadooka, C., & Uchida, J. Y. (2018). Fusarium species as pathogen on orchids. *Microbiological research*, 207, 188-195.

Suman, S. (2017). Plant tissue culture: A promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana. *Biochem. Cell. Arch*, 17(1), 1-26.

Suman, S. (2017). Plant tissue culture: A promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana. *Biochem. Cell. Arch*, 17(1), 1-26.

Taticharoen, T., Matsumoto, S., Chutteang, C., Srion, K., Malumpong, C., Abdullakasm, S. (2023). Response and acclimatization of a CAM orchid, *Dendrobium Sonia* 'Earsakul'to drought, heat, and combined drought and heat stress. *Scientia Horticulturae*, 309.

Teixeira da Silva, J. A., Shen, M., & Yu, X. (2012). Tissue culture and micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 15, 159-168.

Thorpe, T.A. Historia del cultivo de tejidos vegetales (2007). *Mol Biotechnol* 37, 169–180

Toghueo, R. M. K. (2020). Bioprospecting endophytic fungi from *Fusarium* genus as sources of bioactive metabolites. *Mycology*, 11(1), 1-21.

Tsukada, K., Takahashi, K., y Nabeta, K. (2010). Biosynthesis of jasmonic acid in a plant pathogenic fungus, *Lasiodiplodia theobromae*. *Phytochemistry*, 71(17-18), 2019-2023.

Tuckeldoe, R. B., Maluleke, M. K. y Adriaanse, P. (2023). The effect of coconut coir substrate on the yield and nutritional quality of sweet peppers (*Capsicum annuum*) varieties. *Scientific Reports*, 13(1), 2742.

Tyc O, Song C, Dickschat JS, Vos M, Garbeva P (2017). The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends Microbiol* 25(4):280–292.

Uchida, Y., Moriizumi, M., & Shimotsuma, M. (2019). Effects of rice husk biochar and soil moisture on the accumulation of organic and inorganic nitrogen and nitrous

oxide emissions during the decomposition of hairy vetch (*Vicia villosa*) mulch. *Soil Science and Plant Nutrition*, 65(4), 409-418.

UICN (2023) Red plant list de especies amenazadas de la UICN. 2023-2. <http://www.iucnredlist.org/>. Consultado el 31 de mayo de 2023

Ukwattage, N. L., Li, Y., Gan, Y., Li, T., y Gamage, R. P. (2020). Effect of biochar and coal fly ash soil amendments on the leaching loss of phosphorus in subtropical sandy ultisols. *Water, Air, & Soil Pollution*, 231, 1-10.

Valadares, R. B., Perotto, S., Lucheta, A. R., Santos, E. C., Oliveira, R. M., & Lambais, M. R. (2020). Proteomic and transcriptomic analyses indicate metabolic changes and reduced defense responses in mycorrhizal roots of *Oeceoclades maculata* (Orchidaceae) collected in nature. *Journal of Fungi*, 6(3), 148.

Yam, T. W., & Arditti, J. (2018). Orchid micropropagation: an overview of approaches and methodologies. *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols*, 151-178.

Yang, E. F., Karunarathna, S. C., Tibpromma, S., Stephenson, S. L., Promputtha, I., Elgorban, A. M., ... & Chomnunti, P. (2023). Endophytic Fungi Associated with Mango Show In Vitro Antagonism against Bacterial and Fungal Pathogens. *Agronomy*, 13(1), 169.

Yuan Y, Jin X, Liu J *et al* (2018). The *Gastrodia elata* genome provides insights into plant adaptation to heterotrophy. *Nat Commun*, 9, 1615.

Zeng, T., Holmer, R., Hontelez, J., te Lintel-Hekkert, B., Marufu, L., de Zeeuw, T., Wu, F., Schijlen, E., Bisseling, T. y Limpens, E. (2018). Host- and stage-dependent secretome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Planta J*, 94: 411-425.

Zhelezova, A., Cederlund, H., y Stenström, J. (2017). Effect of biochar amendment and ageing on adsorption and degradation of two herbicides. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228, 1-13.

Zhu, Z. X., & Zhuang, W. Y. (2015). *Trichoderma* (Hypocrea) species with green ascospores from China. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 34(1), 113-129.

Zin, N. A., & Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168-178.