



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Programa Institucional de Maestría en Ciencias
Biológicas**

**Área Temática: Interacción Planta-Microorganismo-
Insecto**

**Evaluación de aditivos orgánicos para la
germinación simbiótica y supervivencia *in vitro*
de *Laelia autumnalis*, *Oncidium graminifolium* y
Epidendrum miserum (Orchidaceae).**

Tesis

Para obtener el grado de maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

FERNANDO ESPINOSA BELTRÁN

**Director de tesis:
Dr. Rafael Salgado Garciglia**

**Co-directora de tesis:
Dra. María de los Ángeles Beltrán Nambo**



Morelia, Michoacán a Agosto del 2023

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE BIOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DEL DR. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA Y LA CO-ASESORÍA DE LA DRA. MARÍA DE LOS ANGELES BELTRAN NAMBO, CON EL APOYO DE LA DRA. YAZMÍN CARREÓN ABUD Y DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO Y EL FINANCIAMIENTO DEL CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES, CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONAHCyT).

Superviviente, sí, ¡maldita sea!, Nunca me cansaré de celebrarlo
Joaquín Sabina

Agradecimientos

A mi asesor:

Gracias por su paciencia, apoyo y entusiasmo que me mostró durante la elaboración de este trabajo. Por apoyarme y compartir su sabiduría conmigo.

A mi co-asesora:

Muchas gracias angelitos sin ti, este proyecto no hubiese salido, ni sería el trabajo que es ahorita, también te agradezco tu paciencia, el apoyo y el asesoramiento.

A mis compañeros del laboratorio:

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio por haber hecho mi estadía ahí mucho más placentera, por el apoyo brindado.

Al Dra. Yazmin Carreón Abud:

Le agradezco mucho el haberme permitido trabajar en el laboratorio lo cual me abrió un mundo de posibilidades.

A mis sinodales:

A la mesa de sinodales: Dra. Patricia Ríos Chávez, Dra. Mariela Gómez Romero, Dr. Aarón Giovanni Munguía Rodríguez, por su tiempo para aportar elementos para elementos para que fuera un trabajo exitoso.

Dedicatoria

A mis padres, tíos y abuela:

Una vida no alcanza para agradecerles todo lo que han hecho por mí, pero empiezo con esta tesis que es por y para ustedes, gracias por ser mis pilares de vida. Ustedes me hicieron ser la persona que soy hoy. Han estado allí para escuchar mis ideas, brindarme consejos valiosos y animarme en los momentos de duda. Su fe en mí ha sido mi fuerza impulsadora y su confianza en mis capacidades ha sido mi mayor motivación.

A mis hermanos:

A mis hermanos Ana Paula, Karla, Fernanda, Monse, Julio y Ricardo, en cada etapa de nuestro crecimiento, han estado a mi lado brindándome apoyo incondicional y alentándome a alcanzar mis sueños. Juntos hemos superado obstáculos y celebrado victorias, formando un vínculo indestructible. Gracias por todo.

A mi novia:

Esta tesis no solo es el resultado de mi esfuerzo, sino también un testimonio de nuestro amor y nuestra capacidad para apoyarnos mutuamente en cada paso del camino. Gracias por creer en mí y apoyarme.

A mis amigos:

Los años pasan volando, pero su amistad perdura. Los recuerdos de tantos buenos momentos que hemos compartido, todas las risas, las pachangas, las lágrimas de estrés, todas las horas estudiando o los momentos de apoyo en situaciones difíciles. Son recuerdos que siempre atesorare. Ustedes son la familia que elegí, y les estaré eternamente agradecido por dejarme ser parte de sus vidas.

Índice de contenido

Índice de contenido.....	vi
Índice de figuras.....	viii
Índice de cuadros.....	x
Resumen	xi
Abstract.....	xii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Hongos micorrícicos.....	3
2.2. Tipos de micorrizas.....	3
2.3. Endomicorrizas.....	4
2.3.1. Micorriza orquideoide (MO)	4
2.4. Importancia de la micorriza.....	5
2.4.1. Simbiosis endófitas vs micorrícicas	5
2.4.3. Transferencia de nutrientes de HMO.....	7
2.5. Germinación simbiótica y no simbiótica de semillas de orquídeas	7
2.5.1. Biología de los hongos en asociación.....	8
2.5.2. Producción de fitohormonas.....	9
2.6. Orquídeas (Orchidaceae).....	9
2.6.1. <i>Laelia autumnalis</i> (Lex.) Lindl.....	11
2.6.2. <i>Oncidium graminifolium</i> Lindl.....	12
2.6.3. <i>Epidendrum miserum</i> Lindl.....	13
2.7. Cultivo <i>in vitro</i> de orquídeas	13
3. Justificación	20
4. Hipótesis	22
5. Objetivos	23
5.1. Objetivo general	23
5.1.1. Objetivos específicos.....	23
6. Materiales y métodos.....	24

6.1. Material biológico	24
6.2. Preparación de los medios de cultivo	25
6.2.1. Condiciones generales para la siembra y mantenimiento de las cepas fúngicas	26
6.3. Preparación de las semillas de orquídeas	26
7. Resultados	27
Capítulo 1. Evaluación de metodologías para el establecimiento <i>in vitro</i> simbiótico y germinación de semillas de tres orquídeas (<i>Laelia autumnalis</i>, <i>Oncidium graminifolium</i> y <i>Epidendrum miserum</i>), con la aplicación de cuatro cepas fúngicas y determinación del efecto del crecimiento en condiciones semi <i>in vitro</i>. 27	
Capítulo 2. Comparación de la función de diferentes cepas de hongos micorrícicos y un endófito sobre la germinación, desarrollo y sobrevivencia de plántulas de <i>Laelia autumnalis</i>, <i>Epidendrum miserum</i> y <i>O. graminifolium</i>, bajo cultivo <i>in vitro</i> e <i>in vitro</i> dual.	45
Capítulo 3. Evaluar el efecto de la adición de diferentes aditivos orgánicos a un medio básico en cultivo <i>in vitro</i> e <i>in vitro</i> dual, para la germinación simbiótica y desarrollo de plántulas.	73
8. Discusión General.....	94
9. Conclusión general	96
10. Perspectivas	96
11. Literatura general citada.....	97

Índice de figuras

Figura 1. Floración de las especies de orquídeas mexicanas analizadas.	24
Figura 2. Morfología <i>in vitro</i> de las cepas fúngicas utilizadas durante este proyecto.	25
Figura 3. Mapa de Michoacán con divisiones municipales, resaltando las ciudades desde donde se obtuvieron las semillas.....	30
Figura 4. Fotografías de los diferentes métodos de desinfección de semillas de orquídeas	31
Figura 5. Porcentaje de viabilidad de las semillas de las orquídeas en estudio (<i>Laelia autumnalis</i> , <i>Oncidium graminifolium</i> y <i>Epidendrum miserum</i>)	33
Figura 6. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de <i>L. autumnalis</i>	34
Figura 8. Comparación de la tasa del crecimiento promedio de los diferentes hongos de interés a los 10 días de su inoculación en los diferentes medios de cultivo	36
Figura 9. Comparación de crecimiento de plántulas de <i>L. autumnalis</i> por estadio de desarrollo al momento de su siembra en sistema <i>in vitro</i> dual.	38
Figura 10. Estadios de desarrollo de plántulas de orquídeas, sobre sus primeras etapas de desarrollo (Modificado de Ramsay et al., 1986)	49
Figura 11. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de <i>L. autumnalis</i> , <i>O. graminifolium</i> y <i>E. miserum</i> en medio MBA, con diferentes tratamientos a los 45 días de la siembra	51
Figura 12. Estadios de desarrollo de semillas de <i>L. autumnalis</i> (A), <i>O. graminifolium</i> (B) y <i>E. miserum</i> (C).....	52
Figura 13. Comparación de la supervivencia de plántulas de <i>L. autumnalis</i> (A), <i>O. graminifolium</i> (B) y <i>E. miserum</i> (C) en diferentes tratamientos a los 120 días de la siembra en medio MBA	53

Figura 14. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de <i>L. autumnalis</i> en caja completa y caja dividida en medio MBA	55
Figura 15. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de <i>O. graminifolium</i> en caja dividida y caja completa en medio MBA	55
Figura 16. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de <i>E. miserum</i> en caja dividida y caja completa en medio MBA	56
Figura 17. Estadios de desarrollo de semillas de <i>L. autumnalis</i>	57
Figura 18. Comparación de estadios de desarrollo (día 1 y día 45) de semillas de <i>L. autumnalis</i> en respuesta a compuestos volátiles de las cepas fúngicas.....	58
Figura 19. Estadios de desarrollo de semillas de <i>O. graminifolium</i>	59
Figura 20. Comparación de estadios de desarrollo (día 1 y día 45) de semillas de <i>O. graminifolium</i> en respuesta a compuestos volátiles de las cepas fúngicas	60
Figura 21. Estadios de desarrollo de semillas de <i>E. miserum</i> , en diferentes tratamientos a los 45 días de la siembra en medio MBA	61
Figura 22. Comparación de estadios de desarrollo (día 1 y día 45) de semillas de <i>E. miserum</i> en respuesta a compuestos volátiles de las cepas fúngicas	62
Figura 23. Plántulas de <i>L. autumnalis</i> creciendo en la técnica <i>in vitro</i> dual, con la cepa <i>T. calospora</i> con un comportamiento de parasito invadiendo las plántulas...	63
Figura 24. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de <i>L. autumnalis</i> en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos, con diferentes tratamientos a los 45 días de la siembra.	77
Figura 25. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de <i>O. graminifoulim</i> en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos.....	78
Figura 26. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de <i>E. miserum</i> en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos.....	79
Figura 27. Comparación del índice germinativo de semillas de <i>L. autumnalis</i> en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos.....	80

Figura 28. Comparación del índice germinativo de semillas de *O. graminifoulim* en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos..... **81**

Figura 29. Comparación del índice germinativo de semillas de *E. miserum* en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos..... **82**

Figura 30. Comparación de la supervivencia de los embriones *L. autumnalis* en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos..... **83**

Figura 31. Comparación de la supervivencia de los embriones *O. graminifoulim* en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos..... **84**

Figura 32. Comparación de la supervivencia de los embriones *E. miserum* en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos..... **85**

Figura 33. Fotografía de frascos con el sistema *in vitro* dual con los diferentes tratamientos de interés a una semana de su montaje en cámara de crecimiento. **86**

Índice de cuadros

Cuadro 1. Comparación de crecimiento de plántulas de *L. autumnalis* por estadio de desarrollo al momento de su siembra en sistema *in vitro* dual..... **37**

Resumen

Estudios como el presente trabajo son importantes debido a que permiten determinar la especificidad que existe entre los hongos simbióticos y orquídeas en condiciones de cultivo *in vitro*. El objetivo fue evaluar el efecto de diferentes aditivos orgánicos para la germinación, desarrollo y supervivencia de embriones y plántulas de tres orquídeas endémicas de México (*Laelia autumnalis*, *Oncidium graminifolium* y *Epidendrum miserum*), durante su cultivo *in vitro* e *in vitro* dual. Para abordar esto, se evaluaron diferentes metodologías de desinfección de semillas, las cuales afectan su germinación, encontrando que, con el método de jeringa, promueve el porcentaje de germinación de la orquídea *L. autumnalis*. Además, se evaluó el crecimiento de los hongos en diferentes medios de cultivo, donde se observó que las cepas probadas crecieron en mejor manera que en su medio de cultivo universal (Papa-Dextrosa-Agar, PDA). De igual manera, se estableció una técnica de cultivo de orquídeas (*in vitro* dual) con el fin de facilitar la interacción de planta-hongo, emulando las condiciones naturales, observando el desarrollo de embriones en estadios de desarrollo similares a los que se cultivaron en cultivo *in vitro* tradicional y en un menor tiempo. Además, se determinó la función de las cepas *Tulasnella calospora*, *Tulasnella* sp. y *Serendipita vermifera* y *Morchella* sp. sobre la germinación, desarrollo y supervivencia de plántulas de las tres especies de orquídeas seleccionadas, tanto en cultivo *in vitro* como *in vitro* dual, encontrando una mayor afinidad de *L. autumnalis* y *O. graminifolium* hacia las cepas, presentando porcentajes de germinación más altos que un control asimbiótico en interacción directa. Sin embargo, el efecto positivo se fue perdiendo conforme los embriones se desarrollaban, donde solo *O. graminifolium* con *S. vermifera* y *Morchella* sp. tuvieron un desarrollo por encima del control. Los embriones de *E. miserum*, no presentaron un efecto diferente al control en interacción directa con las cepas. No obstante, en una interacción indirecta, los de la *O. graminifolium*, no se demostró diferencias con el control. En las semillas de *E. miserum* únicamente con *T. calospora*, se promovió la germinación y el desarrollo, respondiendo de manera positiva a la presencia de los hongos, posiblemente por el efecto de los compuestos volátiles producidos por el hongo. Finalmente se evaluó el efecto de aditivos orgánicos al medio básico de avena (MBA) para la germinación simbiótica, desarrollo y supervivencia de las orquídeas seleccionadas durante su propagación *in vitro* e *in vitro* dual, encontrando que los aditivos orgánicos solo tuvieron un efecto positivo en un tratamiento asimbiótico para *L. autumnalis* y *O. graminifolium*. Mientras que, para *E. miserum*, la germinación aumentó en todos los tratamientos comparados con MBA, el desarrollo de las plántulas fue favorecido en todos los tratamientos. El presente estudio representa una contribución a la biología de la interacción entre plantas y hongos, reportando respuestas poco estudiadas como el efecto de los compuestos volátiles derivado el cultivo simbiótico. De la misma manera, la optimización de métodos de cultivo *in vitro*, representa una herramienta clave en las estrategias de propagación y conservación de esta familia de plantas.

Palabras clave: Cultivos *in vitro*, hongos simbióticos, orquídeas, *Tulasnella*, micorrizas.

Abstract

Studies such as the present work are important because they allow to determine the specificity that exists between symbiotic fungi and orchids under *in vitro* culture conditions. The objective of this work was to evaluate the effect of different organic additives for the germination, development and survival of three orchids endemic to Mexico (*Laelia autumnalis*, *Oncidium graminifolium* and *Epidendrum miserum*) during *in vitro* and *in vitro* dual culture. To study this, different seed disinfection methodologies were evaluated, which affect their germination, finding that with the syringe method the germination percentage of the *L. autumnalis* orchid was promoted. In addition, the growth of the fungi in different culture media was evaluated, determining a better growth of the different strains tested in the universal culture medium (Potato-Dextrose-Agar, PDA). Similarly, an orchid culture technique (*in vitro* dual) was established in order to facilitate the plant-fungus interaction, emulating natural conditions, observing the development of embryos in stages of development similar to those grown in *in vitro* culture traditional and in a shorter time. In addition, during the work the function of the strains *Tulasnella calospora*, *Tulasnella* sp. and *Serendipita vermifera* and *Morchella* sp. on the germination, development and survival of seedlings of the three species of orchids selected, both *in vitro* and *in vitro* dual culture, finding a greater affinity with *L. autumnalis* and *O. graminifolium* towards the strains, presenting higher germination percentages than an asymbiotic control in direct interaction. However, the positive effect was lost as the embryos developed, where only *O. graminifolium* with *S. vermifera* and *Morchella* sp. had a development above the control. The embryos of *E. miserum*, did not present a different effect to the control in direct interaction with the strains. However, in an indirect interaction, those of *O. graminifolium*, no differences with the control were demonstrated. In the seeds of *E. miserum* only with *T. calospora*, the germination and development were promoted, responding positively to the presence of the fungi, possibly due to the effect of volatile compounds produced by the fungus. Finally, the effect of organic additives to the MBA medium for symbiotic germination, development and survival of selected orchids during *in vitro* and *in vitro* dual culture was evaluated, finding that organic additives only had a positive effect in an asymbiotic treatment for *L. autumnalis* and *O. graminifolium*. While, for *E. miserum*, germination increased in all treatments compared to the basic oat medium, seedling development was favored in all treatments. The present study represents a contribution to the biology of the *in vitro* interaction between orchid germination and symbiotic fungi, reporting little-studied responses such as the effect of volatile compounds derived from symbiotic cultivation. In the same way, the optimization of *in vitro* culture methods represents a key tool in the propagation and conservation strategies of this family of plants.

Keywords: *In vitro* culture, symbiotic fungi, *In vitro* culture, orchids, *Tulasnella*

1. Introducción

El riesgo de extinción de muchos géneros de orquídeas (CITES, 2017), ha incrementado la investigación científica, con la finalidad de establecer protocolos para la preservación y conservación efectiva de taxones endémicos o de distribución restringida. Una conservación efectiva, depende de la reintroducción de estas plantas a sus hábitats naturales con la finalidad de reforzar las poblaciones que han sido mermadas por diferentes factores, o bien del desarrollo de programas para su introducción a zonas protegidas (Lando et al., 2016).

En el caso de la familia Orchidaceae, la germinación de semillas es el método preferido para la propagación de especies raras o en riesgo, ya que permite mantener la variabilidad genética (Batty et al., 2006). Dada su alta diversidad tanto en formas como en hábitats, algunos grupos de orquídeas son más difíciles de propagar que otros. Las orquídeas epífitas pueden ser propagadas asimbióticamente en cultivo *in vitro* utilizando medios nutritivos, sin embargo, este método requiere la optimización de los componentes del medio para cada especie y mantener condiciones axénicas, lo que consume tiempo y recursos (Aewsakul et al., 2013). Por otro lado, las orquídeas terrestres, especialmente las especies raras, son casi siempre difíciles de propagar y establecer en el suelo en cantidades suficientes para su conservación, debido a su alta dependencia de hongos micorrícicos para su germinación y subsecuente desarrollo (Fan et al., 2016).

En consecuencia, una alternativa para la germinación de la semilla, puede ser la utilización de hongos micorrícicos y endófitos que han reportado mejores resultados que los métodos asimbióticos para muchas especies de orquídeas (Aewsakul et al., 2013). Sin embargo, debido a la alta especificidad planta-hongo que muestran algunas orquídeas (Kaur et al., 2019), se requiere el análisis de diferentes aislados fúngicos provenientes de cada especie que se desea propagar (Zettler & Corey, 2018). Durante muchos años, se supuso que las orquídeas en su fase adulta o al menos desde que empiezan a realizar la fotosíntesis, no son dependientes de un

hongo simbiote (micorriza) para su supervivencia, sin embargo, Thangavelu y colaboradores (2010) observaron que, en condiciones naturales, las orquídeas mantienen asociaciones simbióticas durante todo su ciclo de vida con los hongos micorrícicos (Bagyalakshmi et al., 2010).

Aunado a esto, a nivel mundial existe muy poca investigación encaminada al establecimiento de plántulas (protocormos) en suelo o sustrato, particularmente en preparación para su traslado a sus sitios naturales y que a la vez, funcionen para preservar a sus hongos asociados, que requieran de poca inversión económica y de tecnologías sencillas que puedan ser aplicadas por las personas que viven cerca de estos sitios.

En diversas investigaciones, se han evaluado diferentes herramientas para inducir o incrementar la germinación de semillas de orquídeas, con cultivos *in vitro* simbióticos, en las que se utilizan cepas fúngicas y varios sistemas de siembra de cultivo *in vitro*. En estos estudios, se ha comparado la función de diferentes cepas de hongos micorrícicos o endófitos sobre la germinación, desarrollo y supervivencia de plántulas de orquídeas tanto epífitas como terrestres (Otero-Ospina y Bayman, 2009). Así mismo, con el propósito de incrementar los procesos de germinación *in vitro*, se ha utilizado también la adición de diferentes aditivos orgánicos a un medio básico en cultivo *in vitro*, como agua de coco y extractos de frutos como plátano, jitomates, entre otros (Flores-Escobar et al., 2008).

En la presente investigación, se evaluó el efecto de aditivos orgánicos para la germinación simbiótica, desarrollo y supervivencia de tres orquídeas endémicas de México (*Laelia autumnalis*, *Oncidium graminifolium* y *Epidendrum miserum*.) durante su cultivo *in vitro* e *in vitro* dual.

2. Antecedentes

2.1. Hongos micorrícicos

La definición de micorriza, que literalmente significa “hongo-raíz”, fue propuesta por Frank en 1885. Esta definición describe la asociación simbiótica, mutualista y no patógena, que se lleva a cabo entre las raíces de la planta y el micelio de hongos especializados, en la cual ambas partes obtienen un beneficio. Los hongos micorrícicos reciben azúcares de manera directa de las plantas, que son indispensables para su desarrollo. A cambio, estos hongos captan nutrientes, minerales y agua del sustrato, y los suministran a sus hospedantes vegetales para su crecimiento y desarrollo posterior (Batty et al., 2002; Honrubia, 2009). Se ha teorizado que los hongos formadores de micorrizas, han evolucionado al mismo tiempo que las plantas terrestres, lo que permitió a este último, colonizar los mismos ambientes que sus hospedantes, las plantas (Brundrett et al., 2003).

2.2. Tipos de micorrizas

Se reconocen distintos tipos de micorrizas (Brundrett & Tedersoo, 2018), que dependen de las especies fúngicas y las especies vegetales con las que establecen la asociación, así como de su estrategia nutricional, que determina si el hongo penetra intracelularmente o no en las células corticales de la raíz de la planta. En cualquier caso, en todos los tipos de micorrizas, esta interacción permite el intercambio bidireccional de nutrientes. En este intercambio, los nutrientes minerales son transferidos disueltos en agua desde el hongo hacia la planta, mientras que la planta cede al hongo los azúcares derivados de su actividad fotosintética. Sin embargo, en algunos casos, como ocurre en ciertas especies de orquídeas y plantas aclorofílicas, el intercambio puede ser unidireccional (Smith & Read, 2008c; Honrubia, 2009; Brundrett & Tedersoo, 2018).

Actualmente, se reconocen cuatro subtipos principales de micorrizas que se diferencian por su morfología, tejido y nivel de raíz que colonizan, así como por los linajes de plantas que colonizan (Brundrett, 2017; Brundrett & Tedersoo, 2018). Dentro de los cuatro subtipos principales existentes de las micorrizas, se encuentran; las micorrizas arbusculares, las ectomicorrizas, las micorrizas ericoides y las micorrizas orquideoides (Brundrett et al., 2017; Brundrett et al., 2018).

2.3. Endomicorrizas

Las micorrizas son referencias a un tipo de simbiosis entre las raíces de las plantas y los hongos. Estas asociaciones se dividen generalmente en dos tipos: ectomicorrizas, donde los hongos no penetran las células del hospedero y endomicorrizas, que pueden encontrarse en estructuras intracelulares (Böhm & Hock, 1997).

Se denomina endomicorrizas, cuando un hongo forma estructuras en las células corticales de la raíz, además de crecer en espacios intracelulares. Por lo tanto, podemos encontrar un interfaz entre los hongos y la membrana de la planta, lo que muestra que la planta y el hongo se encuentran en contacto directo entre sí. Existen varios tipos de endomicorrizas, siendo la más conocida la micorriza arbuscular (HMO), seguida por la micorriza ericoide y por último, la micorriza orquideoide (MO) (Böhm & Hock, 1997; Marschner, 2012).

2.3.1. Micorriza orquideoide (MO)

La MO se caracteriza por la presencia o la formación de enrollamientos hifales (mejor conocidos como pelotones) en las células corticales de los rizoides o en las raíces de las plantas adultas (Smith & Read, 2008b).

Los HMO, difieren de los demás tipos de micorrizas, ya que puede colonizar tanto en las células meristemáticas, como a lo largo de la raíz, además el hongo puede

recolonizar células viejas. Las MO son morfológicamente diferentes de otras micorrizas, además la MO, también se diferencia de las ectomicorrizas y las micorrizas arbusculares vesículo-arbusculares (VAM) en términos de su modo de acción, ya que actúa como una fuente de energía, minerales y nutrientes para la planta hospedera (Rasmussen et al., 1995). Esta asociación fúngica muestra una aparente especialización limitada como hongo micorrízico y evidencia de coevolución con sus hospederos (Sathiyadash et al., 2020).

2.4. Importancia de la micorriza

En diversas investigaciones, se ha demostrado que el beneficio de una inoculación fúngica en las plantas no es necesario (Knudson, 1922), incluso se ha afirmado que en plantas adultas el beneficio es “insignificante”, exceptuando a especies con deficiencia de clorofila (Hadley, 1989; Batty et al., 2002). Sin embargo, otros estudios han mostrado que existen múltiples beneficios que obtienen las orquídeas adultas, y es probable que la mayoría de las orquídeas terrestres estén obligadas a tener micorrizas cuando éstas crecen en su hábitat natural (Batty et al., 2002). Experimentos con fósforo radioactivo, confirmaron que los hongos de las orquídeas pueden transportar fósforo a las raíces (Smith, 1966; Alexander et al., 1984). Gran parte de nuestro conocimiento sobre la especificidad de las asociaciones micorrízicas, proviene de estudios realizados en condiciones estériles, los cuales han sido importantes para comprender la importancia de la asociación fúngica durante la etapa de germinación (Ramsay et al., 1986).

2.4.1. Simbiosis endófitas vs micorrízicas

Para las plantas, las relaciones de simbiosis son especialmente importantes para la obtención de nutrientes. El concepto de micorriza es funcional, donde se describe dicha relación como mutualista, en la cual tanto las plantas como los hongos se benefician (Rasmussen et al., 1995; Cameron et al., 2007; Smith & Read, 2008a). Por otro lado, el concepto de endófitos se refiere a la ubicación de un organismo

dentro de los tejidos de una planta, sin asumir ni excluir la posibilidad de beneficios mutuos (Stone et al., 2000; Batty et al., 2002).

Las micorrizas orquideoides (HMO), son un tipo de simbiosis que se forma entre los hongos y las raíces de las orquídeas, permitiendo a las plantas obtener nutrientes, minerales e incluso agua (Zelmer et al., 1996). Por otro lado, los hongos endófitos se definen como microorganismos que crecen dentro de los tejidos vegetales sin causar síntomas evidentes de daño (Batty et al., 2002; Bayman & Otero, 2006; Stone et al., 2000).

Los informes existentes sobre los hongos endófitos y las micorrizas en orquídeas están estrechamente relacionados entre sí y a menudo es difícil analizar estas asociaciones y sus efectos por separado.

2.4.2. Supervivencia de las orquídeas

La micorriza orquideoide (MO) ha demostrado tener un impacto significativo en el bienestar de las orquídeas, desde la etapa de germinación hasta el desarrollo posterior de los embriones e incluso a lo largo del ciclo de vida de la planta. La alta producción de semillas y su posterior desarrollo puede sugerir que la mortalidad de estas plantas es extremadamente elevada. Las condiciones inadecuadas del sustrato y de un entorno hostil, representan desafíos adicionales para las semillas de orquídeas. Por un lado, las semillas tienen pocas reservas nutricionales (endospermo) y, por otro lado, existe la dificultad de encontrar un micobionte compatible (Rasmussen, 2002; Flores-Escobar et al., 2008).

En el caso de la conservación o restauración de poblaciones de orquídeas, es de suma importancia comprender las condiciones y las interacciones necesarias para su supervivencia, sin limitar ningún criterio durante la germinación. Si no se conocen estas condiciones, es posible que los programas de manejo y traslocación de esta familia de plantas no generen beneficios de conservación a largo plazo (Batty et al., 2006; Da Silva et al., 2018).

2.4.3. Transferencia de nutrientes de HMO

En el caso de las orquídeas, la simbiosis con hongos micorrícicos (HMO) es fundamental para obtener nutrientes durante su germinación y su desarrollo posterior como plántulas (Rasmussen, 1995; Cameron et al., 2006; Rasmussen & Rasmussen, 2009; Sathiyadash et al., 2020).

Los HMO tienen la capacidad de transferir nutrientes como carbono (C), nitrógeno (N), fósforo (P) y otros minerales a las plantas adultas de orquídeas (Zhang et al., 2018). Sin embargo, es importante destacar que la transferencia de nutrientes puede ser unidireccional, es decir, del hongo a la planta (Hadley, 1989), bidireccional, en ambos sentidos (Cameron et al., 2006) o incluso puede ocurrir de manera independiente a la presencia de la micorriza (Sathiyadash et al., 2020).

2.5. Germinación simbiótica y no simbiótica de semillas de orquídeas

Las semillas de las orquídeas extremadamente pequeñas y contienen reservas nutricionales limitadas (Arditti, 1967; Arditti et al., 2000). Usualmente estas semillas no germinarán en un hábitat natural por sí mismas, únicamente lo harán si son colonizadas por algún hongo micorrícico (HM). Cuando una semilla germina, se forma una masa indiferenciada de células llamadas protocormo. El protocormo continuará creciendo durante varias semanas, meses o incluso años, dependiendo de la especie, esto hasta que alcance un estadio de desarrollo que cuente con hojas y raíces.

Mediante la germinación *in vitro*, se reproducen semillas en frascos de vidrio o plástico sobre un medio de agar nutritivo que contiene los azúcares y minerales necesarios para que las semillas germinen y crezcan. Existen de tipos de germinación *in vitro*: simbiótica y asimbiótica.

La germinación *in vitro* simbiótica, implica la inoculación de las semillas con hongos micorrícicos adecuados para que se establezca la asociación simbiótica y las semillas puedan germinar y crecer. Este enfoque permite replicar las condiciones naturales de simbiosis y proporciona un medio óptimo para el desarrollo de las plántulas (Rasmussen, 1995).

Por otro lado, la germinación *in vitro* asimbiótica, se lleva a cabo sin la presencia de hongos micorrícicos. En este caso, se proporcionan los nutrientes y condiciones adecuadas en el medio de agar para que las semillas germinen y desarrollen plántulas sin la necesidad de la simbiosis con los hongos.

2.5.1. Biología de los hongos en asociación

En la naturaleza, las raíces de las orquídeas establecen asociaciones simbióticas con una amplia diversidad de hongos, incluidos algunos denominados "falsas micorrizas". Estos hongos invaden los tejidos de la planta y estimulan su crecimiento, pero no forman las estructuras típicas de una micorriza orquidácea (endófitos) (Bayman et al., 1997; Warcup, 1981). Estos hongos micorrícicos no orquidáceos (HMO) tienen un gran potencial para estimular la germinación de las semillas de orquídeas, mejorar el desarrollo de los protocormos y promover el crecimiento y la fase reproductiva de las plantas adultas (Liu et al., 2010).

Es importante destacar que la especificidad de la asociación entre las orquídeas y los hongos es altamente selectiva, lo que significa que diferentes especies de orquídeas tienen requisitos específicos de hongos para su germinación y desarrollo exitosos. Esta diversidad de asociaciones simbióticas es un factor clave en la adaptación y la diversificación de las orquídeas en diferentes entornos (Pereira et al., 2005).

2.5.2. Producción de fitohormonas

Otro de los beneficios de estos microorganismos promotores del crecimiento vegetal es la producción de fitohormonas, que son utilizadas por las plantas hospederas para sus mecanismos de crecimientos (Van Loon et al., 2007; Shoresh et al., 2010). Existen reportes de biocompuestos activos que son producidos por los OM (HMO) como el ácido indol acético (AIA), ácido giberélico (GA₃), ácido naftalenacético (ANA), los cuales se han reportado como promotores del desarrollo de diferentes especies de orquídeas (Dan et al., 2012). También se cuenta con reportes de que el ácido giberélico y el ANA, son sintetizados por los HMO y pueden además promover la elongación en las raíces de las algunas orquídeas (Zhang et al., 1999). Aislados fúngicos de cepas de *Tulasnella*, mostraron la producción de AIA en condiciones de cultivo *in vitro* (Robinson et al., 1998). Se han detectado cantidades significativas de esta auxina tanto en el micelio de los hongos como en el medio de cultivo, la cual puede influenciar el proceso de colonización (Barroso et al., 2006). Estudios anteriores han revelado que los HMO, son capaces de producir giberelinas, auxinas, zeatina y ribósido de zeatina (Wu et al., 2002) y estas hormonas promueven el crecimiento de algunas especies de orquídeas (Yang-Lai et al., 2008; Yang-Liu et al., 2008). En el caso de *Gastrodia elata* (Orchidaceae), se ha observado que la germinación de las semillas y el proceso de diferenciación celular son estimulados por las fitohormonas o los productos metabólicos producidos por los hongos (Guo & Xu, 1990). Estos hallazgos destacan la importancia de la interacción simbiótica entre las orquídeas y los hongos micorrícicos, no solo en la provisión de nutrientes, sino también en la producción de fitohormonas que influyen en el crecimiento y desarrollo de las orquídeas.

2.6. Orquídeas (Orchidaceae)

La familia Orchidaceae es una de las familias más numerosas dentro de las angiospermas, contando con alrededor de 25, 000 especies (World checklist of Orchidaceae; Govaerts, 2023). La mayoría de las orquídeas están distribuidas en regiones particulares y pueden estar muy afectadas por el hábitat en comparación

con otras especies (Jacquemyn et al., 2007). Aunque no se han registrado orquídeas en los polos o en zonas desérticas, son muy abundantes en las zonas tropicales (Chase, 2005).

La asociación micorrícica entre los hongos y las orquídeas sirven como una fuente de nutrientes y agua (Zelmer et al., 1996; Sathiyadash et al., 2020). La especialización en su polinización y sus asociaciones simbióticas van de la mano con la diversidad del taxón en la familia Orchidaceae (Cozzolino & Widmer, 2005; Stewart & Kane, 2007). La belleza única de la diversidad de las flores de las orquídeas está directamente relacionada con la disminución de sus poblaciones naturales. Las asociaciones fúngicas permiten a las orquídeas sobrevivir en una gran diversidad de hábitats alrededor del mundo (Sathiyadash et al., 2020). En la naturaleza las semillas no logran germinar en ausencia de un micobionte (Sathiyadash et al., 2020).

El cultivo *in vitro*, ha sido exitoso para la propagación de semillas (Knudson, 1922) y de explantes (Arditti et al., 2008). Sin embargo, muchos de estudios enfocados en la propagación de orquídeas solo se han centrado en una propagación asimbiótica, sin considerar la importancia que tiene la propagación simbiótica. Rasmussen (1995) sugirió que es necesario seguir trabajando con una germinación simbiótica, para lograr una propagación exitosa.

La diversidad de especies de orquídeas se puede apreciar no solo en los ejemplares adultos durante la floración, sino también en la variabilidad de tamaños, formas y patrones de las semillas. Las semillas de las orquídeas son de tamaños muy diminutos que van de los 0.05 a los 6 mm de longitud, y de 0.01 a 0.93 mm de ancho, el peso puede variar de 0.3 a 14 microgramos (Arditti et al., 2000). Las capsulas de las orquídeas pueden contener de 1, 300 a 4 millones de semillas (Arditti, 1967).

Las raíces de las orquídeas pueden diferir en algunos aspectos, dependiendo de su biología de vida (Rasmussen, 1995). Las raíces de las orquídeas epifitas y litófitas son similares al estar expuestas a la luz y el aire. Las raíces aéreas tanto del hábito epifito como litófito son perennes, fotosintéticas con un constante crecimiento a lo largo de los años (Muthukumar et al., 2018). En contraste, las raíces de las orquídeas terrestres generalmente no son fotosintéticas, tienen una vida promedio de tres años y experimentan cambios en su crecimiento y arquitectura según las estaciones (Bayman & Otero, 2006).

En esta investigación estuvieron bajo estudio tres especies de orquídeas (*Laelia autumnalis*, *Oncidium graminifolium* y *Epidendrum miserum*) y a continuación se describen su taxonomía y características principales.

2.6.1. *Laelia autumnalis* (Lex.) Lindl.

Es una especie de orquídea epifita que se encuentra en México y América Central. Es una especie relativamente pequeña, con pseudobulbos de aproximadamente 5 cm de longitud y hojas estrechas y alargadas. Produce una inflorescencia que puede llevar de 2 a 6 flores, cada una de las cuales miden alrededor de 5 cm de diámetro. Las flores de esta especie son de color rosa pálido a blanco, con un labio amarillo en la base. Esta especie fue descrita por primera vez por el botánico alemán Heinrich Gustav Reichenbach en 1854. Desde entonces, ha sido objeto de estudio en diversos aspectos, como su taxonomía, morfología, fisiología y ecología (Halbinger & Soto Arenas, 1997).

En cuanto a su taxonomía, *Laelia autumnalis* pertenece a la familia Orchidaceae, subfamilia Epidendroideae y tribu Epidendreae. Esta clasificación taxonómica nos ayuda a entender su relación con otras especies de orquídeas y su posición dentro de la diversidad de la familia Orchidaceae.

En términos de ecología, *L. autumnalis* es una especie epífita que crece en árboles y arbustos, incluso en lugares rocosos y expuestos donde utiliza sus raíces aéreas para obtener nutrientes y agua. Tiene una distribución geográfica amplia, que abarca desde el sur de México hasta Honduras. Desafortunadamente, en su hábitat natural, esta especie enfrenta amenazas debido a la degradación del hábitat y la recolección ilegal. *L. autumnalis* es una especie popular entre los aficionados debido a su belleza y a su relativa facilidad de cultivo. Se utiliza un sustrato de corteza de pino o de abeto para proporcionar un ambiente adecuado para su crecimiento. Es importante regarla regularmente durante la temporada de crecimiento y asegurar una buena ventilación. Además, requiere una exposición adecuada a la luz para florecer (Dressler, 1993; Halbinger & Soto Arenas, 1997; Soto Arenas, 2005).

2.6.2. *Oncidium graminifolium* Lindl.

Esta orquídea es una especie que se encuentra en América Central y Sudamérica, desde México hasta Brasil. Esta especie es reconocida por sus hojas que se asemejan a la hierba y crecen en forma de roseta basal. Además, destaca por sus inflorescencias largas y ramificadas, que pueden llevar numerosas flores pequeñas y brillantes. La especie fue descrita por primera vez por el botánico alemán Heinrich Gustav Reichenbach en 1862 y desde entonces ha sido objeto de estudio en diversos aspectos, como su taxonomía, morfología, fisiología y ecología (Dressler, 1993; Reis et al., 2000).

O. graminifolium pertenece a la familia Orchidaceae, subfamilia Epidendroideae y tribu Oncidiinae en términos de su taxonomía. Esta especie ha sido sometida a varias revisiones taxonómicas y en la actualidad algunos autores consideran que su posición taxonómica podría ser modificada en el futuro. En cuanto a su ecología, *O. graminifolium* es una especie terrestre o rupícola (no encontré cita sobre reporte generalista) que crece en lugares húmedos y sombreados, como bosques, matorrales y laderas de montañas. Esta especie es polinizada por insectos, especialmente abejas y moscas. Para su cultivo, *O. graminifolium* es apreciada por

los entusiastas de las orquídeas debido a su facilidad de cultivo y sus hermosas flores. Se recomiendan sustratos de corteza de pino o de abeto o con tezontle. El riego debe ser regular durante la temporada de crecimiento y es importante proporcionarle una adecuada ventilación y exposición a la luz, para favorecer su floración (Dressler, 1993; Reis et al., 2000; Drogue et al., 2012).

2.6.3. *Epidendrum miserum* Lindl.

Esta es una orquídea que se encuentra distribuida en América Central y Sudamérica, desde México hasta Bolivia. Esta especie es conocida por sus tallos delgados y erectos, sus inflorescencias largas y ramificadas que llevan flores pequeñas y de colores brillantes. La especie fue descrita por primera vez por el botánico francés Jean Baptiste Christophore Fuseé Aublet en 1775 y desde entonces ha sido objeto de estudio en diversos aspectos, como su taxonomía, morfología, fisiología y ecología (Dressler, 1993; Hágsater & Soto Arenas, 2005).

En cuanto a su taxonomía, *E. miserum* pertenece a la familia Orchidaceae, subfamilia Epidendroideae y tribu Epidendreae. Esta especie al igual que *O. graminifolium* ha sido sometida a revisiones taxonómicas a lo largo de los años por lo que no es raro esperar en que en un futuro sea modificada (Dressler, 1993).

2.7. Cultivo *in vitro* de orquídeas

Durante los últimos años se ha hecho cada vez más relevante el trabajar técnicas *in vitro*, para la propagación por semillas o para la micropropagación de orquídeas. Las orquídeas son un grupo de plantas muy valoradas por su belleza y exótica apariencia, pero muchas de sus especies están en riesgo debido a la pérdida de hábitat y la recolección ilegal (Soto Arenas et al., 2007). En este contexto, la propagación y el cultivo *in vitro* se han convertido en una alternativa muy efectiva para producir nuevas plantas en un ambiente controlado y libre de enfermedades y plagas, lo que puede reducir la necesidad de recolectar plantas silvestres (Castillo, 2004; Ávila-Díaz y Salgado-Garciglia, 2006).

En el artículo "Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas para colaborar en su conservación" se describen los pasos necesarios para la propagación *in vitro* de orquídeas, que incluyen la preparación del medio de cultivo, la desinfección de las plantas y la transferencia de las plántulas a un medio de cultivo adecuado. También se discuten los factores que pueden afectar el éxito de la propagación *in vitro*, como la calidad de las semillas, la temperatura y la iluminación adecuadas. Destacando la importancia del mantenimiento adecuado de las plantas para garantizar su supervivencia a largo plazo. Esto incluye la selección de un sustrato adecuado, la fertilización y el control de las enfermedades y plagas (Ávila-Díaz y Salgado-Garciglia, 2006).

La aplicación de técnicas de propagación y cultivo *in vitro* en la conservación de orquídeas mexicanas, es una alternativa muy prometedora para reducir la presión sobre las poblaciones silvestres de estas plantas y garantizar su supervivencia a largo plazo. En la actualidad existen diversos trabajos que proporciona información útil y detallada sobre los pasos necesarios para llevar a cabo la propagación y el cultivo *in vitro* de orquídeas y puede ser de gran interés para los investigadores, profesionales y aficionados que se dedican a la conservación de estas especies (Batty et al., 2006; Ávila-Díaz y Salgado Garciglia, 2006).

La germinación *in vitro* de semillas de orquídeas en un medio asimbiótico, es decir, sin la presencia de hongos micorrícicos, es un método que se ha utilizado ampliamente en la propagación de esta familia de plantas debido a su eficacia y simplicidad. Sin embargo, la germinación asimbiótica a menudo resulta en plántulas débiles y con menor capacidad de sobrevivir en el medio ambiente natural (Fay, 2010; Rasmussen et al., 2015; Hemanta et al., 2021).

La germinación simbiótica de semillas de orquídeas, que se lleva a cabo en presencia de HMO, es un proceso más lento y complejo que la germinación asimbiótica, pero resulta en plantas más fuertes y sanas que tienen una mayor tasa

de supervivencia al ser reintroducidas al medio ambiente natural (Batty et al., 2002, 2006; Smith & Read, 2008b; Herrera et al., 2017). Esto se debe a que las orquídeas dependen en gran medida de sus hongos micorrícicos para obtener nutrientes y energía durante las primeras etapas de crecimiento. Los hongos proporcionan nutrientes y protección contra patógenos, lo que permite que las semillas germinen y se desarrollen de manera más saludable. Por lo tanto, la germinación simbiótica es una herramienta importante en la conservación de orquídeas y en la producción de plantas de calidad para la reintroducción en la naturaleza (Rasmussen, 2002; Batty et al., 2006; Smith & Read, 2008b; Rasmussen et al., 2015). Es importante tener en cuenta que cada especie de orquídea puede tener una relación simbiótica específica con diferentes especies de HMO, lo que hace que el proceso sea más complejo y requiera de un conocimiento detallado de las interacciones específicas entre las plantas y los hongos para lograr el éxito en la germinación y cultivo de las orquídeas.

Existen trabajos como los de Dearnaley et al. (2010), donde evaluaron el efecto de varias cepas de hongos micorrícicos orquideoides en la germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. Se encontró que la presencia de micorrizas orquideoides mejoró significativamente la germinación y el crecimiento de las plántulas de orquídeas. Estos resultados fueron respaldados por otros estudios, incluyendo el trabajo de (Galdiano et al., 2012), también con el trabajo de Seban et al. (2015) y el de Pant et al. (2017).

La micorrización *in vitro* de semillas de orquídeas, ha sido ampliamente utilizada en la propagación de especies de orquídeas amenazadas. Yagame et al. (2012) demostraron que la micorrización *in vitro* con hongos micorrícicos orquideoides mejoró significativamente la germinación de semillas de orquídeas de la especie *Cephalanthera falcata*. Este hallazgo fue trasladado a otros estudios con diferentes especies, como el de Da Silva et al. (2018) sobre la germinación *in vitro* de semillas de la especie *Oncidium baueri*.

La colonización por parte de los HMO, provoca que las orquídeas adultas crezcan de manera más eficiente, que tengan una tasa reproductiva más alta, mejora los radios en la supervivencia *ex vitro* de las plantas, induce una floración más temprana, mejora la calidad de las flores, y reduce los riesgos de alguna enfermedad (Chang, 2008). Por ejemplo, *Acampe praemorsa* que fue germinada de manera *in vitro* y que fue inoculada con un HMO logro sobrevivir en condiciones *ex vitro* (Sathiyadash et al., 2013).

La micorrización *in vitro*, también ha sido utilizada para mejorar la supervivencia de plántulas de orquídeas en condiciones de campo. En un estudio realizado por Zettler & Corey (2018), evaluaron la efectividad de la micorrización *in vitro* en la supervivencia de plántulas de orquídeas en un hábitat natural. Los resultados mostraron que las plántulas micorrizadas tenían una mejor supervivencia en comparación con las no micorrizadas. Otros estudios, también respaldan la utilidad de la micorrización *in vitro* en la conservación de especies de orquídeas amenazadas (Arditti et al., 1990; Batty et al., 2006).

La micorrización *in vitro* ha demostrado ser efectiva en la mejora de la calidad de las plántulas de orquídeas. Un estudio de Smith et al. en el 2010, evaluó la calidad de las plántulas de orquídeas producidas por germinación *in vitro* con y sin micorrización. Se encontró que las plántulas micorrizadas eran más vigorosas y tenían una mayor capacidad de supervivencia que las no micorrizadas. Además, la micorrización *in vitro* también puede ser utilizada para mejorar la eficiencia de la producción de plántulas de orquídeas. Un estudio de Li et al. (2016) evaluó la producción de plántulas de orquídeas *in vitro* mediante la micorrización con diferentes cepas de hongos micorrízicos orquideoides, se encontraron que la micorrización mejoró significativamente la tasa de supervivencia de las plántulas y aumentando el número de plantas.

Además del uso de HMO para germinar las semillas de orquídeas con fines de micropropagación, existen trabajos sobre con el uso de diferentes aditivos orgánicos

para la germinación de estas semillas. Un ejemplo es el trabajo realizado por Carranza Alvarez *et al.* (2020), en el cual se trabajó con la especie *Vanilla planifolia* Jack. ex Andrews, que es una orquídea de gran importancia económica. El objetivo de dicho trabajo era establecer un protocolo de micropropagación *in vitro* evaluando el efecto de diferentes extractos orgánicos, incluyendo plátano, piña y agua de coco. Los resultados que se obtuvieron mostraron, que en los medios de cultivo enriquecidos se promovió la diferenciación de los brotes de la orquídea. Esto sugiere que no es necesario utilizar reguladores de crecimiento adicionales para estimular el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

Huh *et al.*, (2016), realizaron un estudio con *Cypripedium macranthos* Sw., con el objetivo de encontrar una alternativa para su propagación y utilizaron la germinación *in vitro* a la cual se le añadieron diferentes aditivos al medio de cultivo. Los resultados obtenidos demostraron que al añadir dicho aditivo a un medio de cultivo, se promovió la germinación y el posterior desarrollo de las plántulas, en comparación con aquellas germinadas en un medio comercial.

En el artículo titulado "Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae)" (Menezes Gonçalves *et al.*, 2016), se examinó el efecto de diferentes suplementos orgánicos en el cultivo *in vitro* del híbrido *Laeliocattleya*. El estudio demostró que el uso de suplementos orgánicos en el medio de cultivo, mejora significativamente el crecimiento y la viabilidad de las plántulas germinadas de manera *in vitro*. Los autores también encontraron que el tipo y la concentración de los suplementos orgánicos tuvieron un efecto significativo en el rendimiento de la propagación *in vitro* especialmente el uso de extracto de lentejas y extracto de papa en concentraciones óptimas fue beneficioso para la germinación y el crecimiento de las plántulas. Este estudio tiene importantes implicaciones para la producción en masa de plantas de orquídeas mediante cultivo *in vitro* y demuestra que el uso de suplementos orgánicos, puede mejorar significativamente la eficiencia y la calidad de la propagación *in vitro* de *Laeliocattleya*, con la posibilidad de ser aplicados en otras especies de orquídeas.

El artículo de Flores Escobar et al. (2008) describe un estudio sobre la propagación *in vitro* de una especie de orquídea endémica de México, *Oncidium stramineum* Lindl., que se encuentra en peligro de extinción. El objetivo del estudio fue desarrollar un protocolo de propagación *in vitro* para esta especie que permita su conservación y propagación. Los autores utilizaron diferentes reguladores de crecimiento vegetal, así como agua de coco para inducir la germinación y el crecimiento de las plántulas *in vitro*. Los resultados mostraron que el medio de cultivo MS con agua de coco, influyó de manera positiva en todas las variables evaluadas. Se observaron los mejores resultados en el desarrollo de las plántulas, el tamaño de las hojas y la altura de las plántulas. Estos hallazgos indican que la propagación *in vitro* es una herramienta valiosa para la conservación de especies de orquídeas amenazadas, como el caso de *O. stramineum* Lindl. Además, los protocolos de cultivo *in vitro* desarrollados en este estudio pueden ser útiles para la propagación de otras especies de orquídeas en peligro de extinción.

El estudio "Efecto de los Compuestos Orgánicos en la Propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman (ORCHIDACEAE)" realizado por David Moreno y colaboradores en 2007, investigó los efectos de diferentes compuestos orgánicos en la propagación *in vitro* de *Stanhopea tigrina* Bateman, una especie de orquídea. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el agua de coco y la pulpa de plátano tuvieron los mejores resultados en términos de longitud de las plántulas, número de raíces, formación de pseudobulbos y supervivencia al trasplante. Estos compuestos orgánicos utilizados como suplementos en el medio de cultivo mostraron una influencia positiva en el desarrollo y crecimiento de las plántulas de *Stanhopea tigrina*.

El estudio de Sreeramanan et al. (2009), tuvo como objetivo evaluar diferentes aditivos orgánicos en el medio de cultivo para promover el desarrollo y crecimiento de los PLBs de *Phalaenopsis violacea*. Los resultados mostraron que los aditivos orgánicos tuvieron un impacto positivo en el crecimiento de los PLBs. Se observó un aumento significativo en la multiplicación y en el tamaño de los PLBs cuando se

utilizó pulpa de plátano. Además, los aditivos orgánicos demostraron mejorar la calidad general de los PLBs, con un mejor enraizamiento y desarrollo de las plántulas. Estos hallazgos sugieren que el uso de aditivos orgánicos en el cultivo de *P. violacea* son benéficos para mejorar la propagación *in vitro* de esta especie de orquídea. Los aditivos orgánicos proporcionan nutrientes adicionales y compuestos bioactivos que promueven el crecimiento y desarrollo saludable de los PLBs. Este estudio resalta el uso de aditivos orgánicos, como una estrategia efectiva para mejorar el crecimiento y desarrollo de los PLBs de *P. violacea* en cultivo *in vitro*, teniendo implicaciones importantes para la propagación y conservación de esta especie de orquídea.

Finalmente, el estudio realizado por Salazar-Mercado (2012), se centró en el cultivo *in vitro* de *Cattleya mendelii*, una orquídea endémica de Colombia en peligro de extinción, con el objetivo de su conservación y posible comercialización. Durante la investigación, se evaluó la germinación asimbiótica y el desarrollo de plántulas de las semillas de *C. mendelii* en medios de cultivo *in vitro* enriquecidos. Los resultados obtenidos indicaron que el medio de cultivo Murashige-Skoog con agua de coco fue el más efectivo en términos de porcentaje de germinación en comparación con los medios control y otros tratamientos. Esto sugiere que el uso de este medio enriquecido puede ser una opción altamente efectiva para la conservación de *C. mendelii*.

3. Justificación

En el caso de las orquídeas, existen varios problemas cuando se germinan semillas asimbióticas o simbióticas *in vitro* y se trasladan las plántulas crecidas a suelo como: a) Mortalidad al extraerlas de las cajas de Petri; b) Mortalidad subsecuente de las plántulas debido a fallas en el proceso de aclimatación, causadas por las condiciones de los sustratos; c) Falta de desarrollo adecuado de estructuras para su supervivencia, como suficiente biomasa o raíces fuertes; d) Mortalidad de las plántulas simbióticas debido a un desarrollo descontrolado del socio fúngico; y e) Desconocimiento de muchos de los mecanismos de acción de los hongos asociados y de las condiciones adecuadas para un óptimo establecimiento de la asociación.

En México este tipo de trabajos ha sido escasamente explorado. Por otra parte, se han realizado varios estudios que muestran el beneficio de adicionar diversos aditivos orgánicos de bajo costo, para el desarrollo de orquídeas en condiciones *in vitro* e *in vitro* dual de forma asimbiótica. Estos aditivos incluyen agua de coco, plátano, jugo de tomate, papaya, líquido de café, miel, entre otros. Todos estos como sustituto de productos sintéticos que además representan un mayor gasto económico (Sreeramanan et al., 2009; Velázquez et al., 2016). Sin embargo, la investigación sobre el efecto de estos aditivos en plántulas germinadas simbióticamente en conjunto con los hongos, es escasa. Se menciona que muchos de estos productos orgánicos contienen fitohormonas, compuestos fenólicos y enzimas que promueven la división celular, la elongación de la raíz y el desarrollo de las plantas (Huh et al., 2016). Además, algunos de estos aditivos producen sustancias antifúngicas que en dosis adecuadas podrían ser utilizados para controlar el crecimiento del hongo asociado una vez que se trasladen al sustrato (Cortes et al., 2019).

Es así que este estudio tiene como finalidad: a) Constatar el efecto benéfico de la preinoculación fúngica de semillas de orquídea en medio de cultivo (*in vitro*); b) Analizar el efecto del uso de aditivos orgánicos en el proceso de propagación,

desarrollo y supervivencia durante la transferencia de plántulas provenientes de cultivo axénico y monoxénico en sustrato (*in vitro* dual). La cual consiste en germinar semillas en frascos con medio de cultivo y un sustrato inerte, tratando de emular las condiciones naturales.

4. Hipótesis

El uso de aditivos orgánicos durante el cultivo *in vitro* simbiótico incrementa la germinación en semillas, desarrollo y supervivencia de embriones y plántulas en las orquídeas *Laelia autumnalis*, *Oncidium graminifolium* y *Epidendrum miserum*, lo cual facilita su aclimatación

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de aditivos orgánicos para la germinación simbiótica, desarrollo y supervivencia de tres orquídeas endémicas de México (*L. autumnalis*, *O. graminifolium* y *E. miserum*) durante su cultivo *in vitro* e *in vitro* dual.

5.1.1. Objetivos específicos

- Evaluar diversas metodologías para incrementar la germinación de semillas de tres orquídeas (*L. autumnalis*, *O. graminifolium* y *E. miserum*), desarrollo de cepas fúngicas y sistema de siembra en cultivo *in vitro* dual.
- Determinar el efecto de diferentes cepas de hongos micorrícicos y un endófito sobre la germinación de semillas, desarrollo y supervivencia de plántulas de las tres especies de orquídeas, tanto en cultivo *in vitro* e *in vitro* dual.
- Evaluar el efecto de la adición de diferentes aditivos orgánicos a un medio básico en cultivo *in vitro* e *in vitro* dual, para la germinación simbiótica y desarrollo de plántulas.

6. Materiales y métodos

6.1. Material biológico

Se utilizaron semillas de cápsulas maduras de las orquídeas silvestres con distribución en Michoacán: *Laelia autumnalis*, *Oncidium graminifolium* y *Epidendrum miserum* (Figura 1). Dichas especies han sido reportadas en alguna categoría de riesgo. De igual manera se utilizaron 3 hongos micorrícicos (*Tulasnella calospora*, *Tulasnella* sp. y *Serendipita vermifera*) y un hongo endófito (*Morchella* sp.) como un control positivo, todos aislados de raíces de orquídeas michoacanas (Beltrán-Nambo, 2018) (Figura 2).

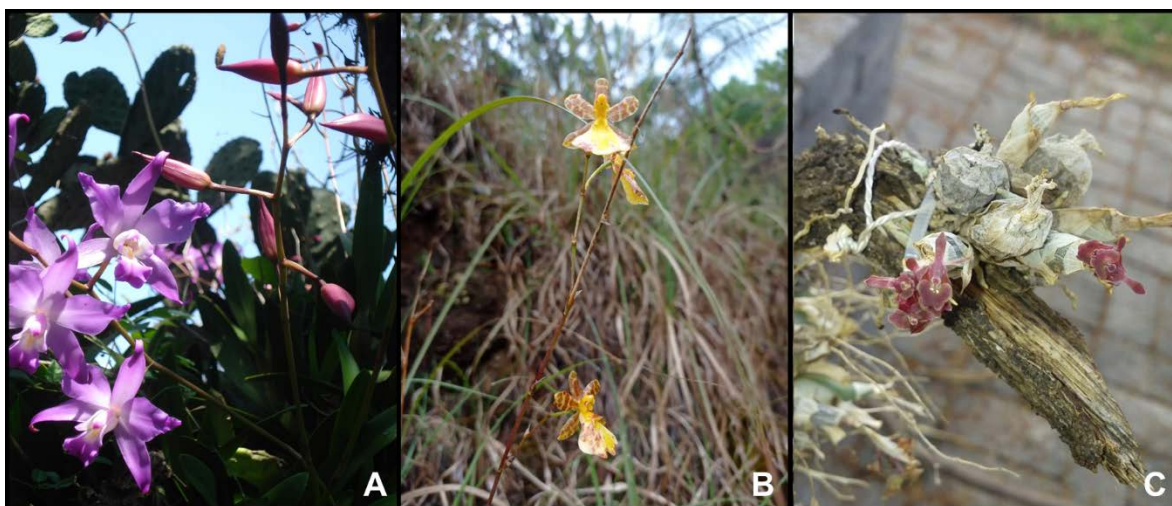


Figura 1. Floración de las especies de orquídeas mexicanas analizadas. A) *L. autumnalis*, B) *O. graminifolium* y C) *E. miserum*. (Foto tomadas de (A) María de los ángeles Beltrán Nambo, (B) Esthela Rodríguez y (C) Daniel Rosas Tinoco).

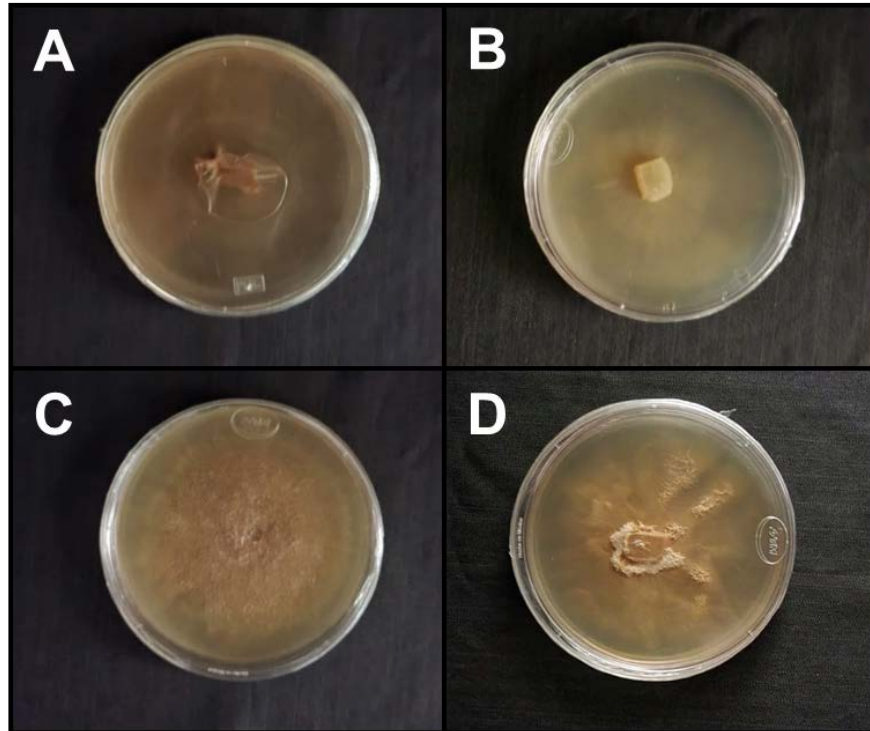


Figura 2. Morfología *in vitro* de las cepas fúngicas utilizadas durante este proyecto. Hongos micorrícicos: *T. calospora* (A), *Tulasnella* sp. (B) y *S. vermifera* (C) y un hongo endófito: *Morchella* sp. (D).

6.2. Preparación de los medios de cultivo

Para el subcultivo de las cepas fúngicas en caja Petri, se preparó medio Papa Dextrosa Agar (PDA), según las instrucciones del fabricante, para luego ajustar el pH de la solución a 6.8 con NaOH 1N. Se esterilizó a 120 °C a una presión de 15 libras por 15 minutos.

Para cumplir los objetivos se preparó medio básico de avena (MBA), según la metodología de Beltrán Nambo (2010) con algunas modificaciones (se adicionó 10 g de agar bacteriológico) y se ajustó el pH a 5-5.5. Para los objetivos uno y dos se utilizaron 4 variantes del mismo medio de cultivo. MBA con un incremento en la concentración de avena (7g). Medio MBA adicionado con 100 g de pulpa de plátano (variedad Musa AAB Simmonds), medio MBA más 100 ml de líquido de café orgánico (Marca La Lucha® procedente de la región de Uruapan y preparado a una

concentración de 10 g/100 ml) y al último medio se le agregó MBA + 200 ml de agua de coco (*Cocos nucifera* L.) por cada litro de medio. Todos los medios se esterilizaron a una temperatura de 120 °C, a una presión de 15 libras por 15 minutos. Para el objetivo tres a los medios anteriores se les adicionó una capa de arena de sílice estéril.

6.2.1. Condiciones generales para la siembra y mantenimiento de las cepas fúngicas

Se realizó la siembra de los inóculos fúngicos en placas con medio PDA con ayuda de un sacabocado de 1 mm de diámetro, previamente esterilizado en campana de extracción de flujo laminar. Una vez realizada la siembra del hongo se selló con una película plástica para después colocar las placas en una incubadora a 25.6 °C en completa oscuridad.

6.3. Preparación de las semillas de orquídeas

La preparación de las semillas para realizar pruebas de desinfección y escarificación con la finalidad de incrementar la germinación fue la siguiente:

El primer método consistió en elaborar sobres de 4 cm de largo por 4 cm de ancho de papel filtro (No. 1), en donde se colocaron las semillas de las especies de orquídeas a analizar, se utilizó un sobre por cada caja Petri a inocular para todos los tratamientos (60 sobres en total por las 3 orquídeas). Mientras que para el segundo método se utilizó una jeringa de 5 ml en la que se colocaron de 1 a 1.5 mg de semillas de cada una de las orquídeas a estudiar.

7. Resultados

Capítulo 1. Evaluación de metodologías para el establecimiento *in vitro* simbiótico y germinación de semillas de tres orquídeas (*Laelia autumnalis*, *Oncidium graminifolium* y *Epidendrum miserum*), con la aplicación de cuatro cepas fúngicas y determinación del efecto del crecimiento en condiciones semi *in vitro*.

Resumen

Es importante continuar investigando y adaptando metodologías para la conservación de orquídeas, ya que se ha observado que estas plantas son muy susceptibles a las técnicas utilizadas para este fin. En este capítulo, se realizaron pruebas con diferentes metodologías con el objetivo de establecer una técnica adecuada para realizar el establecimiento *in vitro*, mediante la comparación de métodos de desinfección reportados para tres especies de orquídeas (*Laelia autumnalis*, *Epidendrum miserum* y *O. graminifolium*), donde se observó que el método con jeringa es uno de los más eficiente y estimula la germinación, así como el desarrollo de los protocormos en menor tiempo en comparación con el método del sobre, por lo que el método de jeringa se utilizó en toda esta investigación. Además, se llevó a cabo la reactivación de las cepas fúngicas (*Tulasnella calospora*, *Tulasnella* sp., *Serendipita. vermifera* (C) y *Morchella* sp.) debido a que habían sido almacenadas, utilizando un medio básico de avena con y sin aditivos orgánicos. Estos medios se compararon con el medio universal del cultivo de hongos (PDA), encontrando que todos los medios probados promovieron el crecimiento de los hongos, incluso mejor que el medio PDA. Las tres cepas fueron utilizadas durante el cultivo simbiótico. Por último, se intentó establecer una metodología *in vitro* dual que emulaba las condiciones naturales y favorecía la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas, mejorando incluso la transición al medio *ex vitro*. Durante este trabajo, se observó que esta técnica generaba buenos resultados, con el desarrollo de embriones hacia la producción de protocormos o plántulas, en menos tiempo que los germinados con la técnica tradicional (asimbiótico) y en un estado fenológico similar. Es necesario continuar probando y ajustando esta técnica de cultivo *in vitro* dual para adaptarla a las necesidades de las orquídeas mexicanas y seguir avanzando en la conservación de estas especies.

Palabras claves: Cepas fúngicas, desinfección, germinación, orquídeas, metodología.

Introducción

El establecimiento de una metodología es esencial para el éxito de cualquier experimento, sin embargo, cuando se tiene múltiples reportes de diferentes metodologías, es necesario compararlos para concluir a que técnica responden de mejor manera las especies seleccionadas (Santos Pérez et al., 2019). En caso de no contar con una metodología establecida, es importante probar diferentes técnicas que se ajusten a las necesidades del experimento (Batty et al., 2006). Es así que en este capítulo se probaron diferentes metodologías reportadas y otras se adaptaron con la final de obtener mejores resultados.

El manual de la SAGARPA (2006), propone dos técnicas para la desinfección de las semillas de orquídeas, las cuales se compararon para determinar su efectividad en la escarificación de las semillas. La escarificación es un proceso que consiste en dañar mecánicamente la cubierta exterior de las semillas, con el fin de permitir que el agua y los nutrientes penetren más fácilmente en su interior para promover su germinación. Este procedimiento es especialmente útil en semillas que tienen una cubierta dura o gruesa que impide el intercambio de gases y nutrientes, lo que dificulta su germinación y su posterior desarrollo (Colombo et al., 2000). En el caso de las orquídeas, esto es necesario ya que la semilla tiene una cubierta protectora que es difícil de romper naturalmente. Sin la escarificación, el embrión morirá debido a que no podrá romper la testa (Rasmussen, 1995). Por lo tanto, la elección de la técnica de desinfección influye en la eficacia de la escarificación de las semillas de orquídeas.

Asimismo, durante este trabajo se probaron diferentes medios enriquecidos con la finalidad de reactivar las cepas. Los medios probados tenían grandes fuentes de carbono y nitrógeno los cuales son indispensables para el desarrollo de las cepas (Puerta Quintero et al., 2011; Huh et al., 2016; Menezes Gonçalves et al., 2016;). Finalmente, se adaptó la técnica de cultivo *in vitro* dual propuesto por Batty et al. en

el 2005, donde se tratan de emular las condiciones naturales, con la finalidad de facilitar el traslado a condiciones *ex vitro*, lo cual representa una herramienta muy eficiente para la reintroducción de orquídeas en sus hábitats naturales con fines de conservación. Sin embargo, es necesario seguir trabajando y probando esta técnica para ajustarla a las necesidades de las orquídeas, así como la de los inóculos fúngicos.

Materiales y métodos

Obtención de las semillas y pruebas de viabilidad

Se obtuvieron cápsulas de las tres especies de orquídeas en estudio, en comunidades de Michoacán. Se colectaron cinco cápsulas de *O. graminifolium* de Uruapan de una zona dedicada a la producción de aguacate, además de esta ciudad se obtuvo una cápsula de la especie *L. autumnalis*. De Tacámbaro se nos facilitaron dos cápsulas de *E. miserum* de una colección privada (Figura 3).



Figura 3. Mapa de Michoacán con divisiones municipales, resaltando las ciudades desde donde se obtuvieron las semillas (mapa tomado de www.descargamapas.net).

A las cápsulas obtenidas se les procedió a realizar la prueba de viabilidad con el compuesto cloruro 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (CTT), con la finalidad de conocer la cantidad de semillas a inocular para garantizar una cantidad suficiente de embriones germinados para el montaje de los experimentos. Los embriones se observaron al microscopio para detectar la viabilidad por cambio de coloración. La viabilidad se reportó como porcentaje de embriones teñidos de un aproximado de 40 semillas por cápsula.

Comparación de dos métodos de desinfección y escarificación de semillas

Se probaron dos métodos diferentes de desinfección y escarificación de la testa con semillas de *L. autumnalis*, con la finalidad de observar si existe una diferencia significativa en el porcentaje de semillas germinadas y el posterior desarrollo entre ambos métodos.

- Método 1, sobre: Los sobres con semilla previamente preparados según lo explicado en párrafos anteriores fueron colocados en recipientes de vidrio (20 sobres por cada recipiente) y se les agregó etanol al 96%, durante 5 minutos con una agitación suave y constante en termoblock. Posteriormente se retiró el alcohol y se adicionó hipoclorito de sodio al 20% de lo que marca la etiqueta (marca Cloralex verde) por 7 minutos con agitación manual suave y constante. Finalmente, se enjuagaron tres tiempos con agua destilada estéril y los sobres se mantuvieron en imbibición en agua estéril hasta su siembra (aproximadamente 20-30 min) (Figura 4B).
- Método 2, jeringa: A la jeringa se le adicionó un volumen proporcional de hipoclorito de sodio al 20% (preparado como el método anterior), para cubrir las semillas por un periodo de 15 minutos con agitación manual suave y constante. Finalmente, se enjuagaron en cinco tiempos con agua destilada estéril. Las semillas se mantuvieron embebidas en el agua hasta su siembra

(aproximadamente 20-30 min). Se utilizaron tres gotas de la jeringa por caja de Petri para asegurar un promedio de 30 a 50 semillas por cajas (Figura 4A).

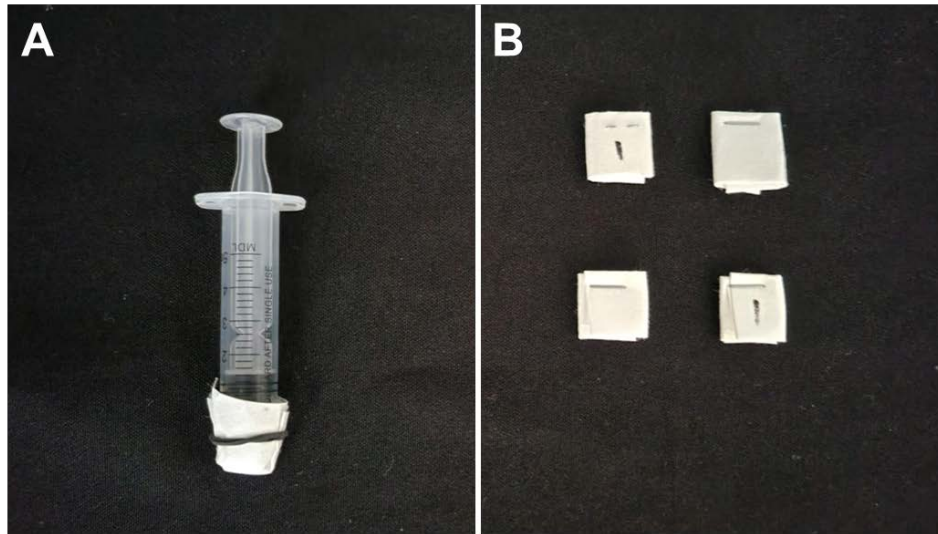


Figura 4: Fotografías de los diferentes métodos de desinfección de semillas de orquídeas (A: jeringa y B: sobres).

El experimento se mantuvo por un periodo de 77 días. El porcentaje de semillas germinadas se calculó a los 45 días de su germinación, considerando un aproximado de entre 80-100 semillas por réplica y el índice germinativo se obtuvo a los 77 días, graficando valores promedios de 6 réplicas por cada tratamiento. Las semillas se germinaron en cajas de Petri con medio MBA.

Pruebas de reactivación de cepas fúngicas

Debido a que las cepas fúngicas fueron aisladas y mantenidas en almacenamiento por 5 años se hicieron pruebas con diferentes medios de cultivo con la finalidad de estimular la activación y crecimiento de los hongos. Para ello, se dejaron crecer los hongos a utilizar (t2: *Tulasnella calospora*, t3: *Tulasnella* sp., t4: *Serendipita vermifera* y t5: *Morchella* sp.) en los siguientes medios de interés: a) MBA, b) MBA + Agua de coco, c) MBA + Pulpa de plátano y d) MBA + líquido de café, preparados de acuerdo al procedimiento explicado antes, además de medio PDA (marca Bioxon) que es de uso universal para cultivo de hongos. El experimento se mantuvo durante 10 días, concluido este periodo se calcularon tasas de crecimiento de los

hongos midiendo el crecimiento radial de la colonia y reportando valores promedio de los datos obtenidos por medio de cultivo.

Pruebas de traslado a condiciones *in vitro* Dual

Para analizar la mejor etapa de desarrollo de los embriones para su traslado a condiciones *in vitro* dual se montó la siguiente metodología:

Para la transferencia a condiciones *in vitro* dual de protocormos y plántulas germinadas de forma simbiótica y asimbiótica en cajas Petri, se utilizaron frascos de vidrio de 250 ml resistentes al calor (10 cm de alto x 5 cm de diámetro). Se agregaron aprox. 50 ml de MBA a cada frasco y se sellaron con tapa de aluminio para esterilizar en autoclave a 121° C durante 20 min. Una vez que el agar solidificó se agregó una capa de 10 mm de arena de sílice blanca previamente esterilizada (40 a 50 gr. aprox) grano fino (0.2mm) y grano medio (0.5 mm) a una proporción 1:1, que se humedecieron para el proceso de esterilización en autoclave.

El experimento consistió en lo siguiente: se seleccionaron embriones en tres estadios diferente de desarrollo (estadios 0 semillas sin germinar, 3 protocormos verdes y estadio 6 plántulas con al menos la primera hoja bien formada) con la finalidad de analizar su supervivencia y desarrollo en el sistema semi *in vitro* diseñado. Se trasladaron un promedio de tres embriones por réplica de cada condición y se contó con dos réplicas. Los frascos con plántulas se incubaron a 22-25° C con 16 h luz. Al final del experimento se determinó porcentaje de supervivencia y número de hojas. Y se documentó con toma de fotografías.

Resultados

Se colectaron cuatro cápsulas de la orquídea *Oncidium graminifolium* de las cuales sólo una de ellas no presentó embriones viables al aplicar la prueba con CTT, mientras que para el caso de *Epidendrum miserum*, se colectaron dos cápsulas,

ambas con semillas viables. De *L. autumnalis* se obtuvieron semillas de una capsula viable. Las semillas de todas las especies presentaron una viabilidad mayor al 70% (Figura 5).

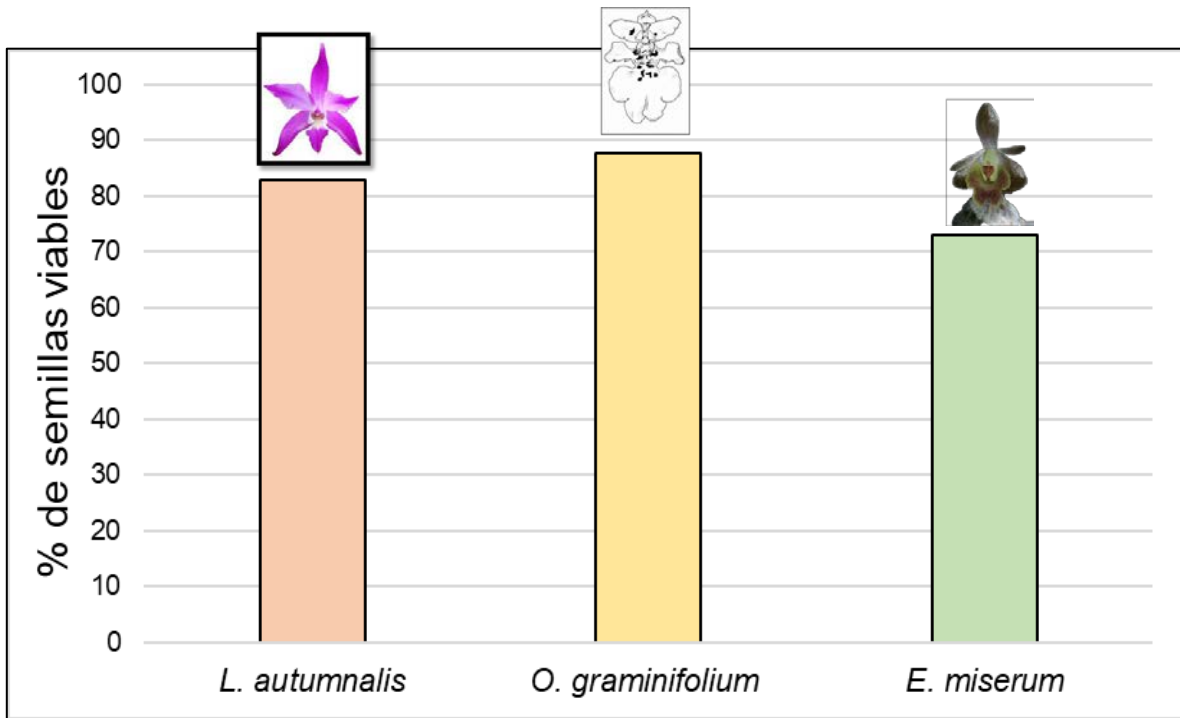


Figura 5: Porcentaje de viabilidad de las semillas de las orquídeas en estudio (*Laelia autumnalis*, *Oncidium graminifolium* y *Epidendrum miserum*), a una semana de su colecta.

Comparación de dos métodos de desinfección y escarificación de semillas

Debido a que la semilla de orquídea presenta una testa con alto grado de impermeabilidad y resistencia, se probaron dos métodos para asegurar una correcta desinfección y favorecer el desarrollo del embrión por escarificación de la testa. Tanto con el método de jeringa, como con el método de sobre hubo semillas germinadas de *L. autumnalis*, a las cuales se les analizó el porcentaje germinativo y el índice germinativo (que señala el desarrollo del embrión) tanto de manera asimbiótica como simbiótica.

El porcentaje de germinación se determinó a los 45 días posteriores a la siembra.

Se pudo observar que en los tratamientos simbióticos con el método de jeringa, resultó ser más eficiente para la escarificación de la semilla permitiendo probablemente una pronta colonización fúngica, ya que presentaron un mayor porcentaje de germinación con respecto al control (Figura 6) y con respecto al método de desinfección en sobre, en el cual únicamente el tratamiento control y en interacción con *Morchella* sp. (t5) presentaron un mayor porcentaje germinativo (Figura 6).

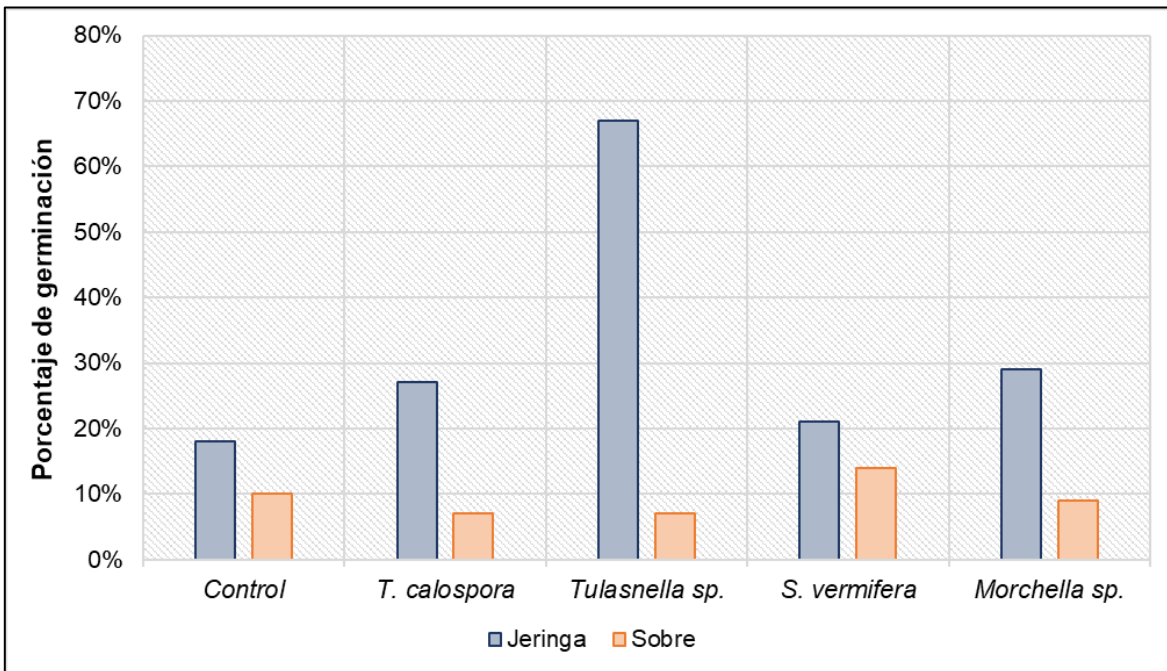


Figura 6. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de *L. autumnalis* en los diferentes métodos de desinfección (jeringa A; sobre B), con diferentes tratamientos, a los 45 días de la siembra.

Para el caso del índice germinativo que se calculó a los 77 días de la siembra, se puede observar que el método de desinfección y escarificación por jeringa (Fig.7) presenta mayor número de embriones con estadios superiores de desarrollo comparados con el método de sobre (Figura 7), lo cual que se refleja en los valores del índice germinativo que son mayores en todos los tratamientos del método de jeringa con respecto al método de sobre. Evidenciando su relación con la pronta germinación debido a una mejor escarificación de las semillas.

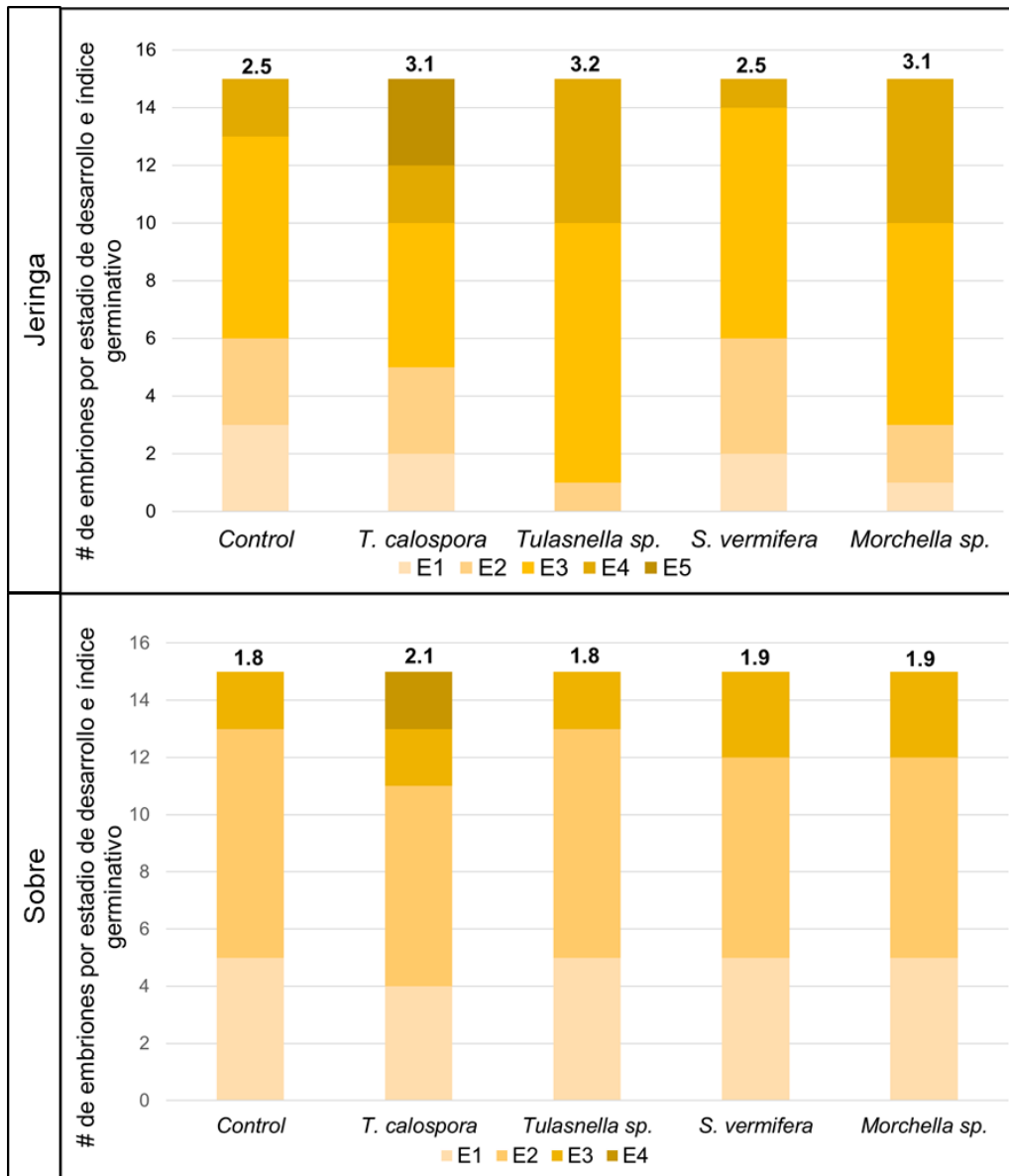


Figura 7. Gráficas de comparación del índice germinativo de semillas de *L. autumnalis* con los diferentes métodos de desinfección (jeringa A; sobre B), con diferentes tratamientos fúngicos a los 45 días de la siembra.

Comparación de medios de cultivo para la reactivación de cepas fúngicas.

Para analizar el efecto del medio PDA y diferentes variantes del medio MBA sobre la reactivación de las cepas fúngicas a utilizar en este trabajo, se midieron las tasas de crecimiento de los hongos en los medios PDA (universal para hongos), MBA y tres

variantes de MBA (MBA + agua de coco, MBA + Pulpa de plátano y MBA + líquido de café). Las tasas de crecimiento fueron tomadas cada 2 días durante 10 días de la inoculación.

Tulasnella sp. (t3) fue incapaz de crecer en el medio PDA durante la duración del experimento, sin embargo, con todos los demás medios probados se reactivó su crecimiento y para *Tulasnella calospora* (t2) fueron más efectivos que el medio PDA (Figura 8). Para las dos cepas de *Tulasnella* (t2 y t3), el tratamiento que mejor funcionó para su crecimiento fue el medio MBA sin aditivos orgánicos, mientras que para *S. vermifera* (t4) y *Morchella* sp. (t5), la reactivación y crecimiento resultaron favorecidos con los aditivos orgánicos. *Morchella* sp. (t5), presentó menor crecimiento en el medio MBA que es el más pobre en nutrientes, lo que sugiere que estas dos últimas especies tienen mayores requerimientos nutritivos que las cepas de *Tulasnella* (t2 y t3) que crecieron mejor en este medio.

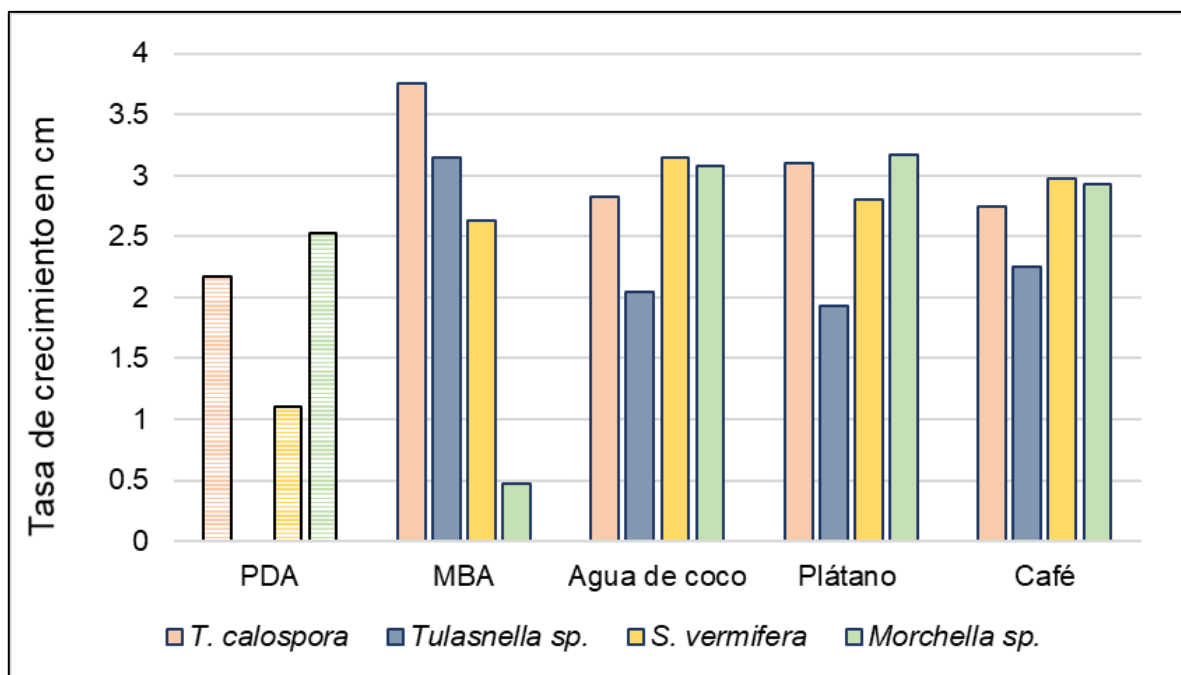


Figura 8. Comparación de la tasa del crecimiento promedio de los diferentes hongos de interés a los 10 días de su inoculación en los diferentes medios de cultivo.

Montaje de sistema *in vitro* dual

En este sistema se probó la supervivencia de embriones en diferente estadio de desarrollo de la especie *L. autumnalis* trasladados a condiciones *in vitro* dual. Los estadios que se consideraron fueron 0, 3 y 6, razón por la cual se introdujeron en simbiosis con *Tulasnella* sp. con la finalidad de asegurar la germinación del estadio 0 (Figura 9). Los resultados obtenidos mostraron una supervivencia del 100% en los embriones de todos los estadios de desarrollo trasladados y su desarrollo fue proporcional al estadio al que se trasladaron observando mayor desarrollo en las que se trasladaron en estadio 6, en el caso de los estadios 0 y 3 no se encontró diferencia en cuanto a su desarrollo (cuadro 1). Sin embargo, los tiempos que duraron los embriones en cultivo *in vitro* señalan que es mejor germinar directamente la semilla en sistema *in vitro* dual, ya que el desarrollo de las plantas fue igual a los embriones en estadio 3, pero el tiempo es menor (semillas 5 meses en sistema *in vitro* dual, y embriones en estadio 3 y 6 cuatro meses en sistema *in vitro* y 5 meses en sistema *in vitro* dual).

Cuadro 1. Comparación de crecimiento de plántulas de *L. autumnalis* por estadio de desarrollo al momento de su siembra en sistema *in vitro* dual.

Estadio de desarrollo	# de hojas	# de raíces	Tamaño de la planta (cm)
6	5	3	1.33
3	3	1	0.5
0	3	1	0.5

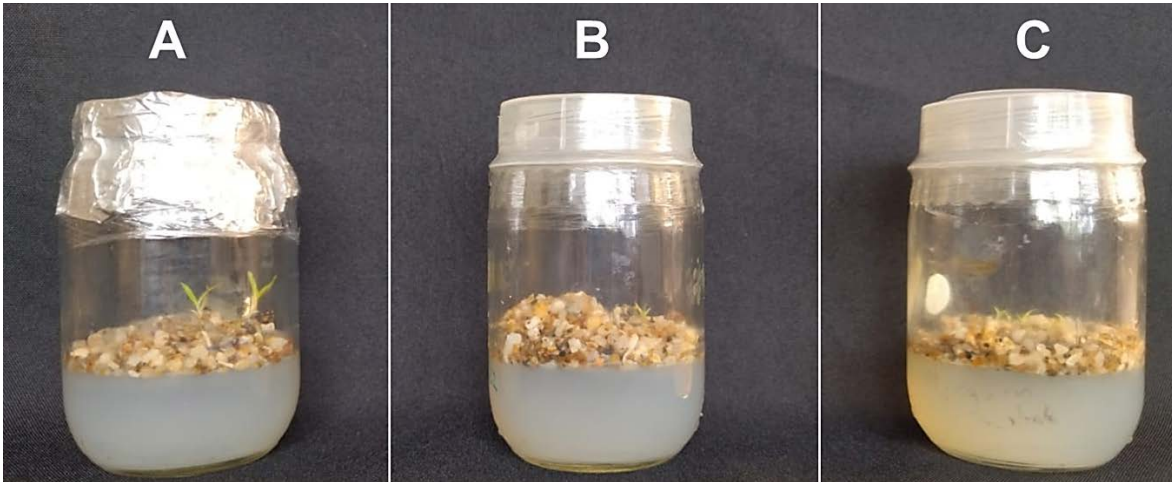


Figura 9. Comparación de crecimiento de plántulas de *L. autumnalis* por estadio de desarrollo al momento de su siembra en sistema *in vitro* dual. A) plántulas trasladadas en estadio 6, B) plántulas trasladadas en estadio 3 y C) plántulas trasladadas en estadio 0. Desarrollo a los 5 meses en el sistema.

Transcurridos los 5 meses, a las plántulas obtenidas de la prueba anterior se les hizo una prueba de aclimatación, las cuales fueron trasladadas a un sustrato preparado: a) fibra de coco, b) sustrato comercial para orquídeas y c) carbono vegetal (1:1:0.5) (Aewsakul et al., 2013). Sin embargo, ninguna plántula sobrevivió pasados los dos meses.

Discusión

La familia Orchidaceae, es una de las familias más diversas, pero también una de las más vulnerables, múltiples factores han desencadenado pérdidas de poblaciones naturales (Ávila Diaz et al, 2006). Es necesario seguir generando y mejorando las herramientas que con lleven a un manejo sustentable de las orquídeas mexicanas como las técnicas *in vitro*. Se puede proceder con el experimento con una viabilidad arriba del 70%, ya que se considera que esta tasa de viabilidad, es lo suficientemente alta como para asegurar resultados significativos y reproducibles. En condiciones naturales los porcentajes de germinación oscilan entre el 2% y 3% (Luan et al., 2006).

Con semillas de *L. autumnalis*, se probaron dos métodos de desinfección, observando que existen diferencias en las diferencias entre métodos a pesar de utilizar mismos compuestos. Diversos trabajos han demostrado que los métodos de desinfección pueden afectar la germinación (Santos Pérez et al., 2019). Se ha reportado que el hipoclorito de sodio y de calcio no solo sirven para contaminantes de las semillas, sino que también llegan a estimular la germinación por medio de la escarificación de las semillas (Lindén, 1980; Waes et al, 1986). Sin embargo, estos efectos pueden variar, las concentraciones de las sustancias afectan de diferente manera variando para cada especie (Harvais et al., 1967; Alvarez-Pardo et al., 2006).

Se ha reportado que el hipoclorito de sodio tiene una influencia moderadamente fuerte en la viabilidad de semillas de *Cattleya mendelii*, esto después de haber sido sometidas a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.6%, 3%) teniendo mayor efecto en concentraciones del 1% y de menor proporción en los tratamientos de mayor concentración de este compuesto (Salazar-Mercado, 2012). Otros trabajos como el de Pierik (1990), señalan que se necesitan diferentes tiempos de esterilización de la semilla o la cápsula, encontrando los tiempos óptimos para especies de los géneros como *Bulbophyllum* y *Calanthe* entre 3 y 4 minutos mientras que orquídeas de los géneros *Paphiopedillum* y *Vanda* requiere de 10 a 20 minutos.

Durante esta prueba, el mayor porcentaje de germinación se obtuvo con el método de jeringa, donde la exposición solo fue al hipoclorito de sodio al 20% durante más tiempo, obteniendo un porcentaje de germinación cercano al 20% a los 45 días de su siembra. Durante el trabajo de (Segundo Campos, 2016) se compararon diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio a diferentes tiempos de exposición con la especie de *L. autumnalis*, encontrando que un periodo mayor a 10 min perjudica la germinación de esta orquídea y que las concentraciones mayores al 5% con el método del sobre fueron menos eficientes inhibiendo la

germinación. Tanto la concentración como el tiempo afectan de manera significativa el porcentaje de germinación, altas concentraciones o con tiempos prolongados afecta la germinación; por otra parte, bajas concentraciones o periodos cortos de esterilización pueden causar la contaminación tal como lo demuestran los trabajos de (Vasudevan et al., 2010). Por lo que se considera que la germinación de esta podría aumentar en concentraciones más bajas de hipoclorito de sodio en un periodo de tiempo menor a 10 min con el método de la jeringa.

Por otro lado, se realizó la reactivación de las cepas fúngicas, debido a que los hongos cuando están aislados sufren estrés por el cambio de las condiciones en las que se encontraban. Por lo que fue necesario hacerlos crecer en un medio con una gran cantidad de nutrientes favorecieran su crecimiento (Tanner et al., 2007). Se ha reportado que una de las mayores necesidades para crecer cepas de microorganismos es necesario considerar las fuentes de carbono, nitrógeno, nutrientes, fosfatos, magnesio y calcio. Incluso se considera que las fuentes de carbono y nitrógeno son primordiales para poder hacer crecer los hongos. Algunos factores fisicoquímicos que influyen para el crecimiento de estos microorganismos son la temperatura, pH, oxígeno, y salinidad (Tanner et al., 2007; Preusser et al., 2019).

Durante este trabajo, las cepas crecieron en menor tiempo en los todos medios enriquecidos probados comparado con el medio tradicional de cultivo de hongos (PDA). El agua de coco, la pulpa de plátano y el líquido de café tiene reportes de poseer altas concentraciones carbohidratos, así como compuestos nitrogenados (Puerta Quintero et al., 2011; Huh et al., 2016; Menezes Gonçalves et al., 2016). Lo que generó el crecimiento anormal de las cepas fúngicas probadas.

En el presente trabajo se adaptó la técnica propuesta de Batty et al. 2006 de germinación *in vitro*, la cual trata de emular las condiciones naturales de la planta para poder facilitar su germinación y su etapa de aclimatación. Durante dicho trabajo se reportó que una germinación simbiótica aumenta el número de semillas

germinadas en menor tiempo que los controles (asimbióticos) y con una mayor biomasa. Lo cual se comprobó durante este trabajo, ya que semillas obtuvieron los mismos resultados que plántulas con 45 días de edad, las cuales fueron resemebradas en esta técnica. Se ha reportado que las plantas de la familia Orchidaceae germinadas de manera *in vitro* son incapaces de desarrollar resistencia contra patógenos, estrés de tipo biótico o abiótico. Causado por las condiciones controladas en las que germinan y se desarrollan, que se caracterizan por las condiciones axénicas, las bajas variaciones de temperatura, la humedad relativa de la planta, la alta disponibilidad de nutrientes en el medio y las bajas concentración de dióxido de carbono (CO₂) (Teixeira da Silva et al., 2015). Durante la aclimatación la mayoría de las plantas germinadas en sistemas asimbióticos *in vitro* no sobreviven. Una alternativa, es germinar las semillas con un hongo micorrícico. Este método esta reportado mejores resultados que una germinación asimbiótica para un gran número de orquídeas (Rasmussen et al., 1990; Johnson et al., 2007; Nontachaiyapoom et al., 2011). No obstante, para las fases siguientes no se obtuvieron resultados favorables. Esto debido a que los medios presentan concentraciones altas de compuestos ricos en carbono, lo que genero un crecimiento acelerado de las cepas fúngicas tomando un papel antagónico.

Conclusiones

El método con jeringa demostró ser más eficiente, promoviendo la germinación y desarrollo de los embriones de *L. autumnalis* y en menor tiempo que el método con sobre.

Las cepas son capaces de crecer de mejor manera y en menos tiempo en diferentes medios, que el medio de cultivo universal de los hongos.

El medio MBA promueve el desarrollo a cepas pertenecientes al género *Tulasnella*, en menor tiempo que el medio PDA. Mientras que, cepas *S. vermifera* y *Morchella*

sp. se desarrollan de mejor manera en el medio MBA enriquecidos con cualquiera de los aditivos orgánicos.

Con base en los resultados, se demostró que la técnica de *in vitro* dual es una alternativa viable para la propagación de las orquídeas. Teniendo mayor desarrollo de embriones en menor tiempo que una técnica *in vitro* convencional. Es necesario seguir modificando esta técnica para poder ser utilizada para conservación y la reintroducción de las orquídeas.

Literatura citada

Alvarez-Pardo, V. M., Ferreira, A. G., & Nunes, V. F. (2006). Seed disinfection methods for *in vitro* cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. *Horticultura Brasileira*, 24(2), 217–220. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362006000200019>

Àvila Diaz, I., & Salgado Garciglia, R. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *BIOLÓGICAS*, 8, 138–149.

Batty, A. L., Brundrett, M. C., Dixon, K. D., & Sivasithamparam, K. (2006). New methods to improve symbiotic propagation of temperate terrestrial orchid seedlings from axenic culture to soil. *Australian Journal of Botany*, 54, 367–374.

Colombo Speroni, F., & De Viana, M. L. (2000). Requerimientos de escarificación en semillas de especies autóctonas e invasoras. *Ecología Austral*, 10(2), 123–131.

Harvais, G., & Hadley, G. (1967). the development of *Orchis purpurella* in asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytologist*, 66(2), 217–230. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1967.tb06000.x>

Huh, Y., Lee, J., Nam, S., Paek, K., & Suh, G. (2016). Improvement of asymbiotic seed germination and seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw. with organic additives. *Journal of Plant Biotechnology*, 43, 138–145. <https://doi.org/10.5010/JPB.2016.43.1.138>

Johnson, T. R., Stewart, S. L., Dutra, D., Kane, M. E., & Richardson, L. (2007). Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)—preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90(3), 313–323. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9270-z>

Lindén, B. (1980). Aseptic germination of seeds of Northern Terrestrial orchids. *Annales Botanici Fennici*, 17(2), 174–182. <http://www.jstor.org/stable/23726159>

Luan, V., Thien, N., Khiem, D., & Nhut, D. (2006). *In vitro* germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. *Biotechnology in Agriculture*, 175–177.

Menezes Gonçalves, L., Manchado P.S., M. F., Ballesta, P., Mora, F., Milaneze Gutierre, M. A., & Aparecida Mangolin, C. (2016). Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). *IDESIA*, 34(1), 47–54.

Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S., & Manoch, L. (2011). Symbiotic seed germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume and *Dendrobium draconis* Rchb. f., native orchids of Thailand. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 303–308. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.040>

Pierik, R. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. *Mundi-Prensa*.

Preusser, S., Poll, C., Marhan, S., Angst, G., Mueller, C. W., Bachmann, J., & Kandeler, E. (2019). Fungi and bacteria respond differently to changing environmental conditions within a soil profile. *Soil Biology and Biochemistry*, 137, 107543. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107543>

Puerta Quintero, G. I. (2011). Composición química de una taza de café. *Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé)*, 414, 1–12.

Rasmussen, H. N. (1995). Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plants. *Cambridge University Press*, 433.

Rasmussen, H. N., Andersen, T. F., & Johansen, B. (1990). Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant Cell and Environment*, 13, 171–177.

Salazar-Mercado, S. A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). In *Acta Agronómica* (Vol. 61, pp. 69–78). scieloco.

Santos Pérez, U. I., Pedraza Santos, M. E., Salgado Garciglia, R., Martínez Palacios, A., Chávez Bárcenas, A. T., & González Arnao, M. T. (2019). Efectividad de métodos para desinfectar semillas de *Laelia autumnalis* para la conservación en nitrógeno líquido. *Nova Scientia*, 11(23), 143–164. <https://doi.org/10.21640/ns.v11i23.1855>

Segundo Campos, R. (2016). Pruebas de germinación simbiótica y asimbiótica de orquídeas, desarrollo y supervivencia de plántulas, *in vitro* y *ex vitro*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis de Licenciatura.

Tanner, R. S. (2007). Cultivation of Bacteria and Fungi. In *Manual of Environmental Microbiology* (pp. 69–78). Wiley. <https://doi.org/10.1128/9781555815882.ch6>

Teixeira da Silva, J. A., Tsavkelova, E. A., Zeng, S., Ng, T. B., Parthibhan, S., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Rao, M. V. (2015). Symbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*, 242(1), 1–22. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2301-9>

Vasudevan, R., & Van Staden, J. (2010). *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Scientia Horticulturae*, 123(4), 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.11.010>

Waes, J. M., & Debergh, P. C. (1986). *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*, 67(2), 253–261. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb02452.x>

Capítulo 2. Comparación de la función de diferentes cepas de hongos micorrícicos y un endófito sobre la germinación, desarrollo y supervivencia de plántulas de *Laelia autumnalis*, *Epidendrum miserum* y *O. graminifolium*, bajo cultivo *in vitro* e *in vitro* dual.

Resumen

En la naturaleza, las semillas de orquídeas germinan solo después de una colonización por una micorriza. En el presente estudio, se evaluó el efecto de 3 hongos micorrícicos y un endófito, sobre la germinación, desarrollo y supervivencia de las plántulas de tres especies de orquídeas nativas de Michoacán: *L. autumnalis*, *O. graminifolium* y *E. miserum* nativas de Michoacán. Se emplearon métodos de cultivo asimbióticos (control) y métodos simbióticos (*Tulasnella calospora* (t2), *Tulasnella* sp. (t3) y *Serendipita vermifera* (t4) y *Morchella* sp. (t5)), utilizando medio MBA, MS y PDA, en contacto directo e indirecto. Se determinaron los porcentajes de germinación a los 45 días de su siembra, el desarrollo de los embriones representando por índice germinativo se calculó hasta los 120 días en caja completa y 77 días en caja dividida, y se registró la supervivencia de las plantas. Los resultados mostraron que las semillas de *L. autumnalis* y *O. graminifolium*, tuvieron mayor germinación cuando se cultivaron con alguna cepa fúngica en comparación con el control. No obstante, el efecto positivo en la germinación se vio disminuido en el posterior desarrollo de las plántulas siendo solo la orquídea *O. graminifolium* con *Serendipita vermifera* (t4) y *Morchella* sp. (t5) los únicos tratamientos con mayor desarrollo que el control. En cuanto a la supervivencia de las plantas, los simbioses tuvieron diferentes efectos en cada especie de orquídea. En el caso de *E. miserum*, no se observó un efecto diferente al control en interacción directa con las cepas. Sin embargo, en caja dividida, la especie de *L. autumnalis* incrementó la germinación presentando hasta 6 veces más semillas germinadas con los hongos que el control y las semillas germinadas presentaban el doble de desarrollo que el control. Mientras que en *E. miserum* su germinación fue de un 100%, 9 veces más que el control y con *Tulasnella calospora* (t2) se duplicó su desarrollo. En cuanto a *O. graminifolium* la interacción en caja dividida no funcionó como se esperaba. Estos resultados demuestran un comportamiento selectivo de las orquídeas hacia los inóculos fúngicos, dependiendo del tipo de interacción, estado fenológico y especie de hongo. Es importante tener en cuenta estos factores al diseñar estrategias de conservación y propagación de orquídeas, ya que las interacciones simbióticas pueden tener un impacto significativo en la germinación y desarrollo de las plántulas.

Palabras clave: *Orquídeas endémicas, germinación de semillas, hongos rizosfericos.*

Introducción

Las orquídeas son una de las familias más diversas y fascinantes de plantas, con alrededor de 25 000 especies conocidas en todo el mundo (World checklist of Orchidaceae; Govaerts, 2023). Aunque se encuentran en una amplia variedad de hábitats, las orquídeas tienen una característica común: la mayoría de ellas dependen de hongos micorrícicos para sobrevivir (Brundrett et al., 2003). La interacción simbiótica entre las raíces de las orquídeas y los hongos micorrícicos, se ha demostrado que mejora la absorción de nutrientes, así como la obtención de agua (Zelmer et al., 1996; Batty et al., 2002; Honrubia, 2009). En esta familia de plantas, dicha interacción es particularmente importante debido a la falta de un sistema de raíces eficiente (Peterson et al., 1998; Smith & Read, 2008) y a la dependencia de las semillas de orquídeas con los hongos para germinar y establecerse (Arditti et al., 1967; Arditti et al., 2000).

Aunado a esto, existen reportes donde se demuestra que esta asociación beneficia la supervivencia de las plantas ya que mejoran la germinación de sus semillas, así como el posterior desarrollo de las mismas, también mejoran la resistencia de las orquídeas a condiciones ambientales adversas (Batty et al., 2006; Da Silva et al., 2018). Sin embargo, la especificidad en la asociación entre las orquídeas y los hongos micorrícicos es sorprendentemente alta (Ramsay et al., 1986). Cada especie de orquídea tiende a asociarse con un conjunto particular de hongos micorrícicos y a su vez, cada especie de hongo micorrícicos puede estar asociado con una o varias especies de orquídeas (Flores-Escobar et al., 2008; Sathiyadash et al., 2020).

Esta alta especificidad en la asociación hace que sea importante investigar y comprender las interacciones específicas entre las orquídeas y los hongos micorrícicos. Otra respuesta poco estudiada dentro de la interacción entre orquídeas y HMO, es la producida por los compuestos volátiles de los HMO. Los volátiles producidos por este grupo de hongos tienen un efecto significativo en las

semillas de orquídeas, ya que pueden estimular la germinación y el desarrollo de las plántulas de orquídeas. Complementariamente, las semillas de orquídeas son capaces de detectar y responder a estos compuestos volátiles, lo que les permite reconocer y seleccionar los hongos adecuados para establecer la simbiosis.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizaron semillas de las orquídeas Mexicanas *L.autumnalis*, *O. graminifolium* y *E. miserum* (Figura 1) Donde también se utilizaron 3 hongos micorrícicos (*Tulasnella calospora* (t2), *Tulasnella* sp. (t3) y *Serendipita vermifera* (t4)) y un hongo endófito (*Morchella* sp.(t5)) como un control positivo, todos aislados de raíces de orquídeas michoacanas (Beltrán Nambo, 2018).

Preparación de medios

Para cumplir los objetivos planteados para este capítulo, se preparó medio MBA según la metodología de Beltrán Nambo (2010), modificando únicamente la cantidad la cantidad de agar bacteriológico a 10 gramos por litro de medio. Para la prueba en caja dividida se utilizó medio PDA, cuya preparación se especificó en el apartado de metodología general. De igual manera para dicha prueba también se utilizó medio Murashige y Skoog (MS). Siguiendo las indicaciones del fabricante para su preparación, ajustando el pH a 7 con NaOH 1N o con HCl 1N para bajar el mismo. Todos los medios se esterilizaron siguiendo lo mencionando en la metodología general.

Inoculación fúngica en cultivos *in vitro*.

Para los experimentos en interacción directa se contó con 5 tratamientos por especie de orquídea (t1: asimbiótico (control), t2: *T. calospora*, t3: *Tulasnella* sp. t4:

S. vermifera, y t5: *Morchella* sp.). Los inóculos fúngicos para los tratamientos simbióticos se sembraron con un sacabocado (0.8 mm de diámetro) en el centro de las cajas de Petri con medio MBA, contando con 6 réplicas por tratamiento, que se dejaron en incubación a 25.6 °C en oscuridad durante 3 días, después de lo cual se realizó la siembra de un aproximado de 10 a 30 semillas de todas las especies de orquídeas por caja, mismas que fueron previamente esterilizadas con el método que presentó los mejores resultados para la desinfección y escarificación. Contando con un total de 30 cajas por especie.

De igual manera, para los experimentos en caja dividida se contaron con los mismos cinco tratamientos por especie de orquídea descritos en la parte de arriba. Los inóculos fúngicos para los tratamientos simbióticos se sembraron con un sacabocado (0.8 mm de diámetro) de uno de lados de las cajas divididas de Petri con medio PDA contando con dos réplicas por tratamiento. Transcurridos tres días se procedió a realizar la siembra de las semillas de orquídeas teniendo una aproximado de entre 10 y 30 semillas por caja.

Condiciones generales de crecimiento de las plantas.

Una vez realizada la siembra, se continuo con el mantenimiento general requeridos por las cajas descrito en la parte de arriba. Esto durante un lapso de tiempo de entre 77 a 120 días dependió de la especie. En este lapso las orquídeas alcanzan al menos el estadio 3 de desarrollo.

Las variables que se evaluaron fueron porcentaje germinativo, índice germinativo y porcentaje de sobrevivencia. Los resultados se graficaron reportando valores promedio de cada tratamiento.

Porcentaje germinativo

El porcentaje germinativo se obtuvo mediante el conteo al azar, de 100 semillas por réplica de cada tratamiento (6 réplicas de cada tratamiento) a los 45 días de la

siembra; a partir del número de embriones hinchados/sanos y con rompimiento de testa.

Índice germinativo

El índice germinativo es un valor que indica el estado de desarrollo del embrión posterior a la siembra y se calculó utilizando técnica sugerida por Tupac (2004), considerando los 6 estadios de desarrollo propuestos por Ramsay et al. (1986), en donde el alargamiento del pre-embrión, producción de tricomas y primordios foliares será el criterio para determinar el término del proceso germinativo (Figura 10). Cada 15 días se contabilizaron 15 embriones por réplica de cada tratamiento (6 réplicas/tratamiento).

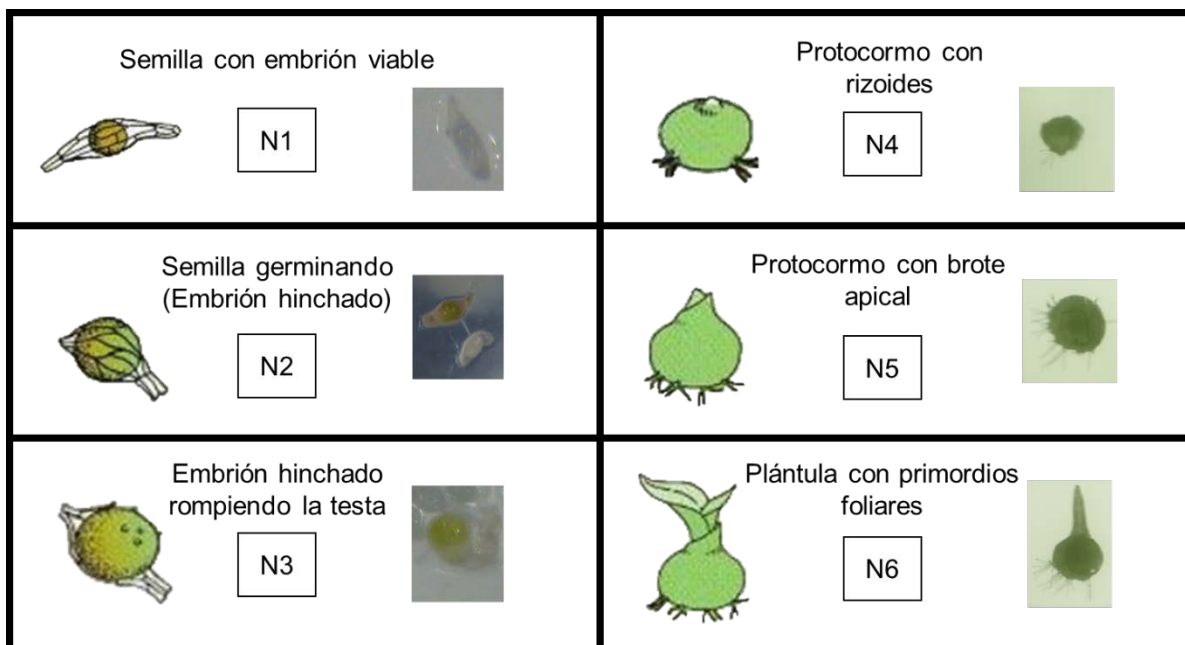


Figura 10. Estadios de desarrollo de plántulas de orquídeas, sobre sus primeras etapas de desarrollo (Modificado de Ramsay et al., 1986).

Porcentaje de supervivencia

Al final del experimento anterior (77 días a 120 días dependiendo de la especie), se calculó el porcentaje de supervivencia a partir del total de embriones germinados en el sistema *in vitro* para cada tratamiento.

Inoculación fúngica en cultivos *in vitro* dual.

Los embriones que llegaron al estadio 3 como mínimo fueron resemebrados a condiciones *in vitro* dual. Se tuvieron suficientes embriones provenientes del cultivo *in vitro* de los 5 tratamientos por especie. Los inóculos fúngicos para los tratamientos simbióticos se sembraron con un sacabocado (0.8 mm de diámetro) en el centro de frascos de vidrio de 250 ml con medio MBA y arena de sílice de acuerdo a la metodología de la fase 1, contando con 3 réplicas por tratamiento, que se dejaron en incubación a 25.6 °C en oscuridad durante 3 días, se contó con 3 embriones por frascos.

Resultados

Efecto de las cepas fúngicas sobre la germinación de la semilla en medio MBA en cultivo *in vitro*

Para entender la función específica del efecto de las diferentes cepas fúngicas en la germinación de las semillas de las orquídeas de interés, se realizó una observación a los 45 días después de la siembra. Donde *O. graminifolium* presentó la mejor respuesta con respecto a las demás orquídeas, con un porcentaje de germinación mayor en los tratamientos simbióticos, observando la mejor respuesta en los tratamientos con el endófito *Morchella* sp. (t5) y el micorrícico *S. vermifera* (t4) (Figura 11). De igual manera *L. autumnalis* presentó un porcentaje de germinación ligeramente mayor en los tratamientos simbióticos, teniendo como mejores respuestas los tratamientos con *Tulasnella* sp. (t3) y *Morchella* sp. (t5)

(Figura 11). En el caso de *E. miserum* no todos los tratamientos simbióticos promovieron la germinación, observando un efecto positivo únicamente con los tratamientos de *S. vermifera* (t4) y *Tulasnella* sp. (t3) (Figura 11).

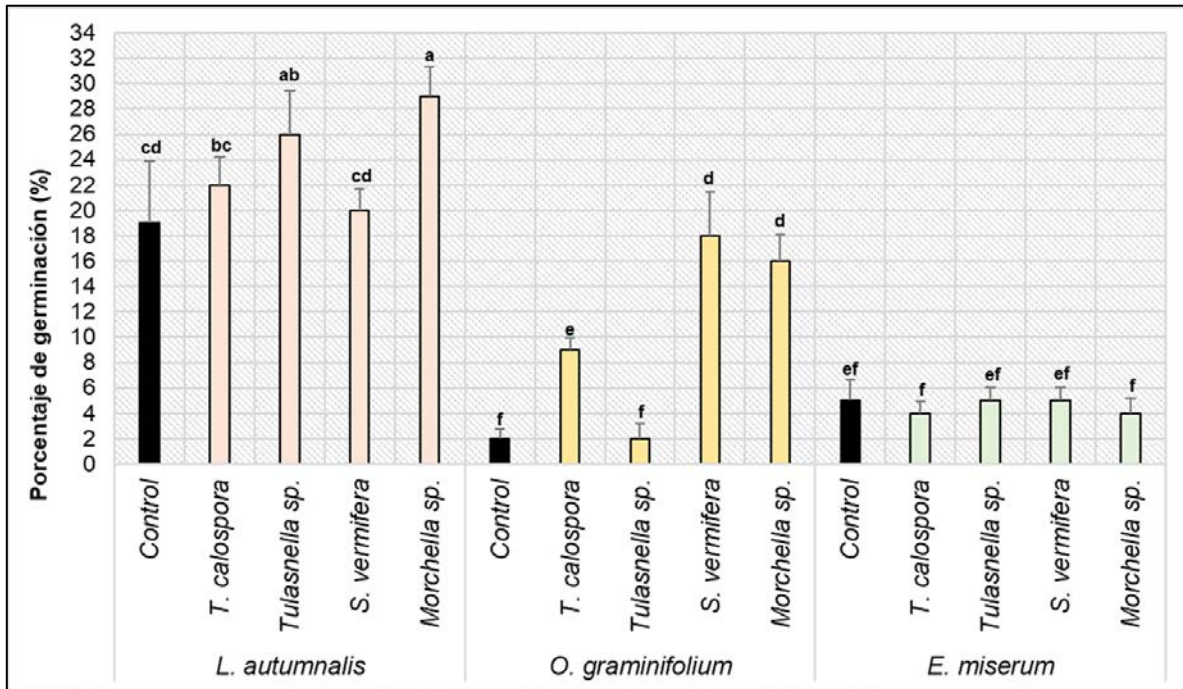


Figura 11. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de *L. autumnalis*, *O. graminifolium* y *E. miserum* en medio MBA, con diferentes tratamientos a los 45 días de la siembra. Letras diferentes indican diferencias significativas (P=0.05, Tukey).

Efecto de las cepas fúngicas sobre el desarrollo del embrión en medio MBA

Para analizar la eficiencia en la etapa germinativa de las cepas reactivadas se realizaron observaciones del desarrollo del embrión cada 15 días. Los resultados acumulados (120 días después de la siembra) demuestran que los hongos presentan mejor desempeño en la especie de la cual se extrajeron (*L. autumnalis*) y con *O. graminifolium*. Esta especie presentó mayor número de embriones en estadios de desarrollo superiores a 2.4 y también es la especie que posee los valores del índice germinativo superiores comparada con *L. autumnalis* y *E. miserum* (Figura 12). Para *L. autumnalis* solo el tratamiento con *Morchella* sp. (t5)

presento índices germinativos por arriba del control (Figura 12). Para el caso de *O. graminifolium* se puede observar que los tratamientos que poseen un índice germinativo mayor al control es *Morchella* sp. (t5) y *S. vermifera* (t4) con embriones más desarrollados (Figura 12). Mientras que en el caso de *E. miserum* ninguna cepa fúngica potenció el desarrollo del embrión ya que sus índices germinativos son prácticamente iguales al control y el número de embriones con estadios de desarrollo del embrión 2 y 3 es apenas ligeramente mayor (Figura 12).

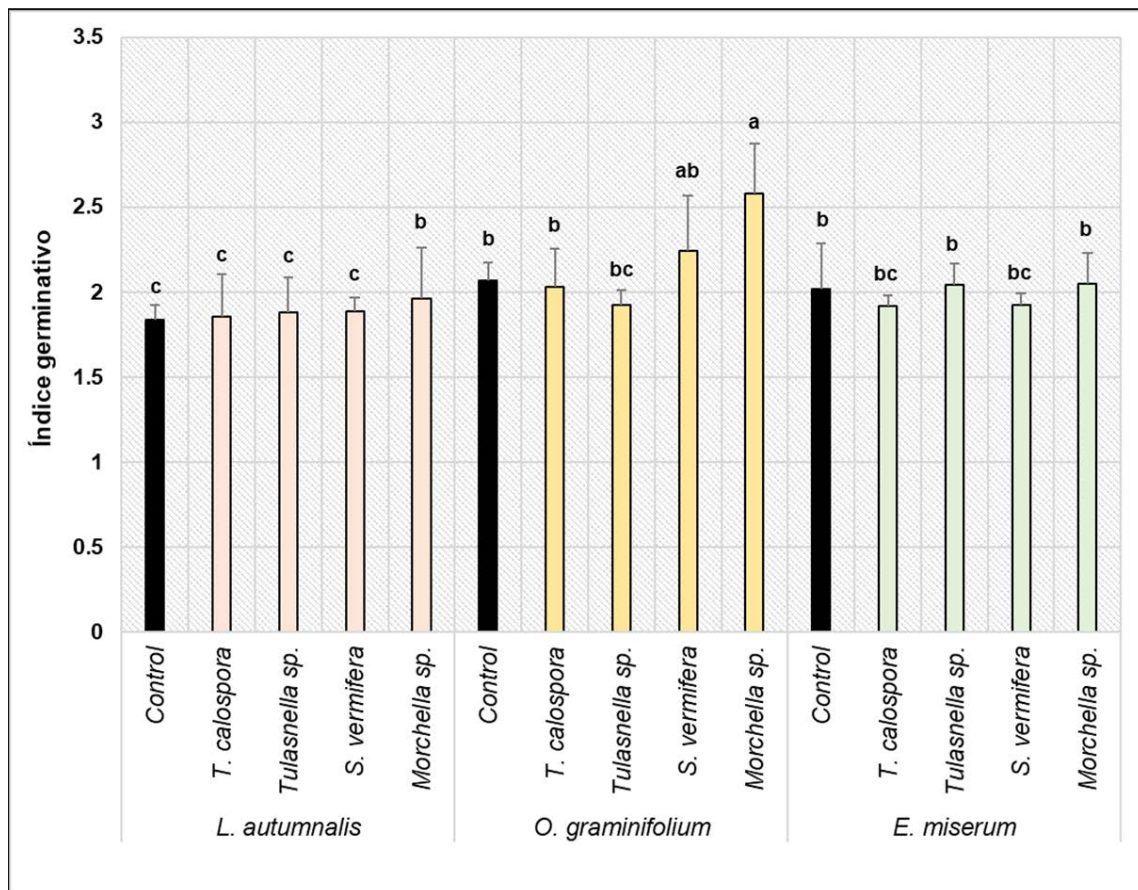


Figura 12. Estadios de desarrollo de semillas de *L. autumnalis* (A), *O. graminifolium* (B) y *E. miserum* (C), en diferentes tratamientos a los 77 días de la siembra en medio MBA. Se indica el índice germinativo en cada barra, y estadio de desarrollo con diferentes colores. Letras diferentes indican diferencias significativas (P=0.05, Tukey).

Efecto de las cepas fúngicas sobre la supervivencia de las plántulas en medio MBA en cultivo *in vitro* a los 120 días de su siembra

Para calcular el porcentaje de supervivencia de las diferentes orquídeas de interés en interacción directa con las cepas fúngicas, se realizó un análisis a los 120 días de la siembra para contabilizar la supervivencia. Para el caso de *L. autumnalis* mostró que todos los tratamientos simbióticos mostraron mejores resultados al compararlos con los controles (Figura 13). Para *O. graminifolium* el tratamiento con *Tulasnella* sp. (t3) fue el único que se encontró cercano al control (Figura 13). En cuanto a *E. miserum* solo los tratamientos con *T. calospora* (t2) y *Morchella* sp (t5), fueron los únicos mayores que el control (Figura 13).

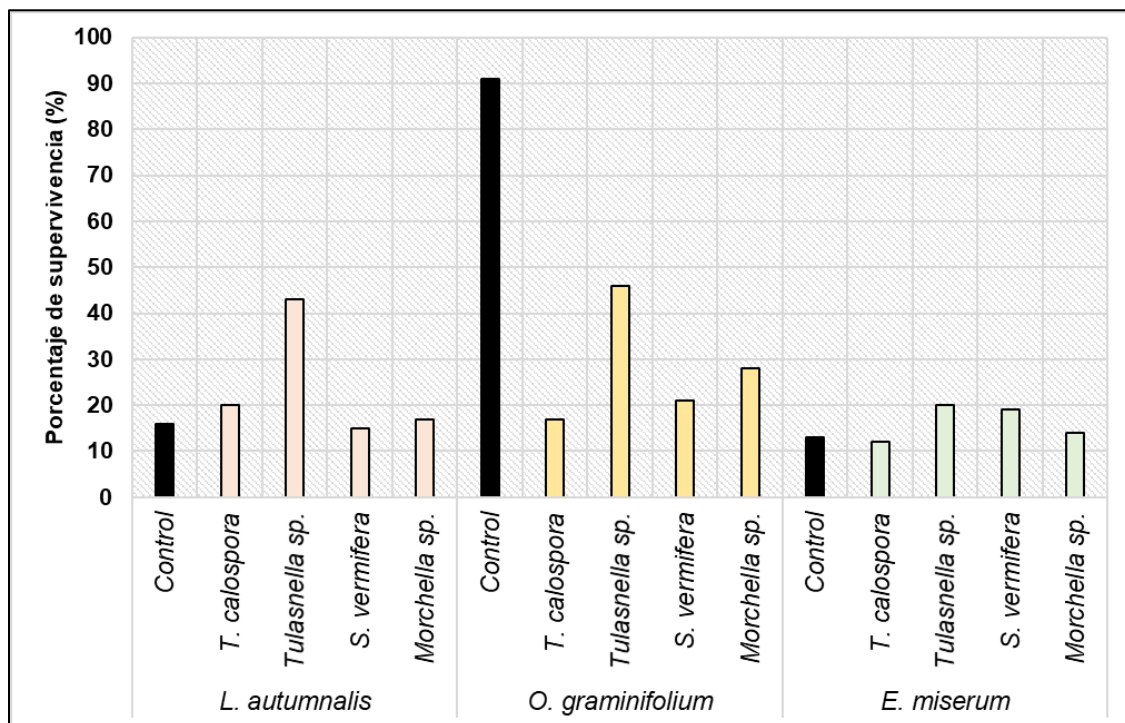


Figura 13. Comparación de la supervivencia de plántulas de *L. autumnalis* (A), *O. graminifolium* (B) y *E. miserum* (C) en diferentes tratamientos a los 120 días de la siembra en medio MBA. Se indica el índice germinativo en cada barra, y estadio de desarrollo con diferentes colores.

Efecto de las cepas fúngicas sobre la germinación de la semilla en medio MBA en cultivo *in vitro* en caja dividida.

Este sistema se estableció para observar el efecto de los volátiles que producen los hongos micorrícicos y el endófito en el porcentaje de germinación sobre las semillas de las orquídeas de interés a los 45 días de su siembra. Las cuales se colocaron en cajas divididas, teniendo de un lado medio MS en el cual se germinaron las semillas y del otro medio PDA donde se encontraba creciendo el hongo. A los 45 días de su siembra se calculó el porcentaje de germinación de la semilla. En las gráficas de cada especie se observa una comparación entre interacción directa e interacción con la finalidad de observar si existe una diferencia.

Germinación de *L. autumnalis*

Todos los tratamientos simbióticos en caja dividida promovieron la germinación de manera exponencial, teniendo respuestas arriba del 60%, mientras el control presentaba un valor cercano al 10%. Al comparar las respuestas entre caja completa y caja dividida se observó que se obtuvieron mejores resultados en todos los tratamientos simbióticos (Figura 14).

Germinación de *O. graminifolium*

Se obtuvo el porcentaje de germinación a los 45 días de la siembra, obteniendo como resultado que un contacto indirecto para la especie *O. graminifolium* solo funciona con el hongo micorrícico *T. calospora* (t2). Al comparar una interacción directa con una indirecta, podemos observar que todos los tratamientos simbióticos (exceptuando *T. calospora* (t2)) obtienen valores de germinación más altos en interacciones directas. Otro punto a resaltar es que el hongo micorrícico *Tulasnella* sp. (t3) no funciona ni en interacción directa ni indirecta (Figura 15).

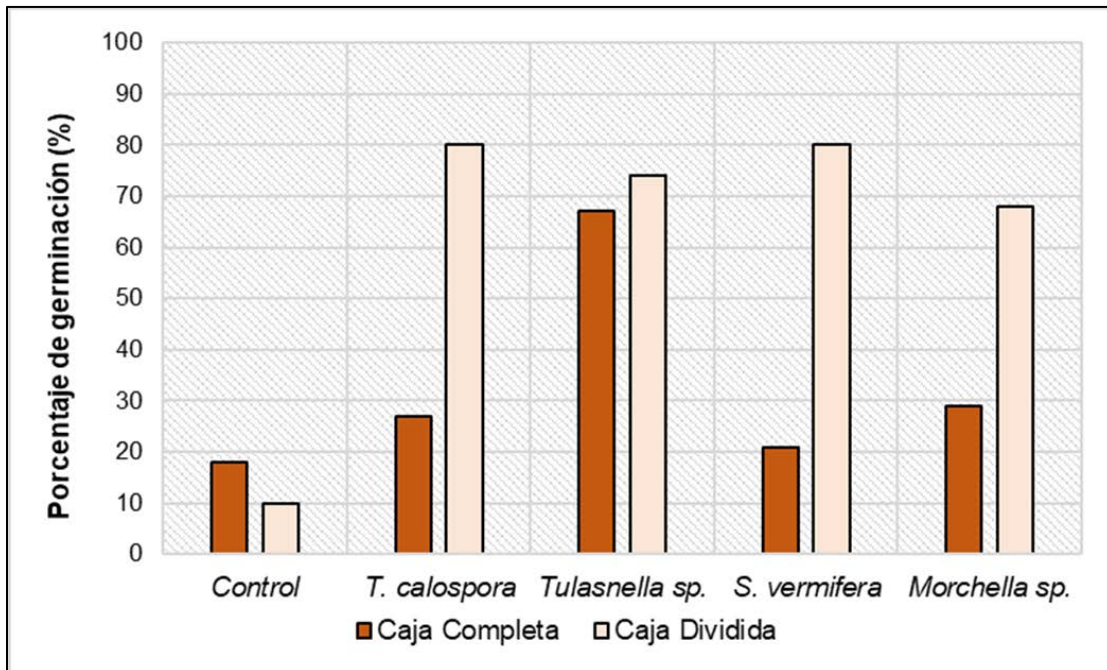


Figura 14. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de *L. autumnalis* en caja completa y caja dividida en medio MBA, con diferentes tratamientos a los 45 días de la siembra.

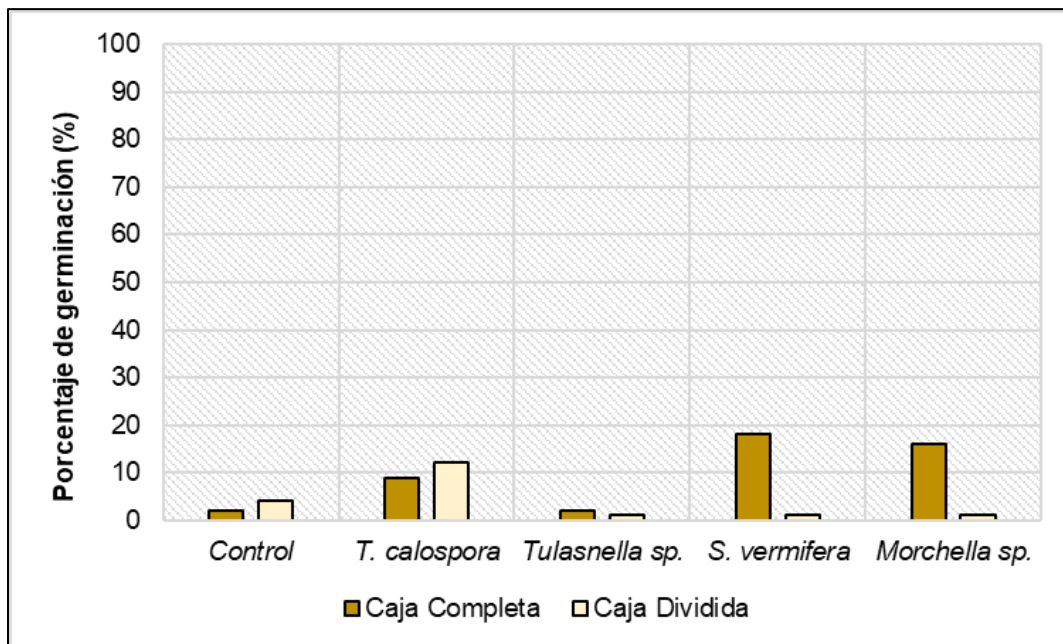


Figura 15. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de *O. graminifolium* en caja dividida y caja completa en medio MBA, con diferentes tratamientos a los 45 días de la siembra.

Germinación de *E. miserum*

Al analizar el efecto de los exudados volátiles de los diferentes hongos micorrícicos y un endófito sobre la germinación de *E. miserum* a los 45 días de su siembra. Se observó que el tratamiento simbiótico con *T. calospora* (t2) en interacción indirecta demostró ser el mejor tratamiento para promover la germinación para la orquídea *E. miserum* con un porcentaje de germinación cercano al 100%. Los demás tratamientos no mostraron tener efecto diferente con el del control (Figura 16).

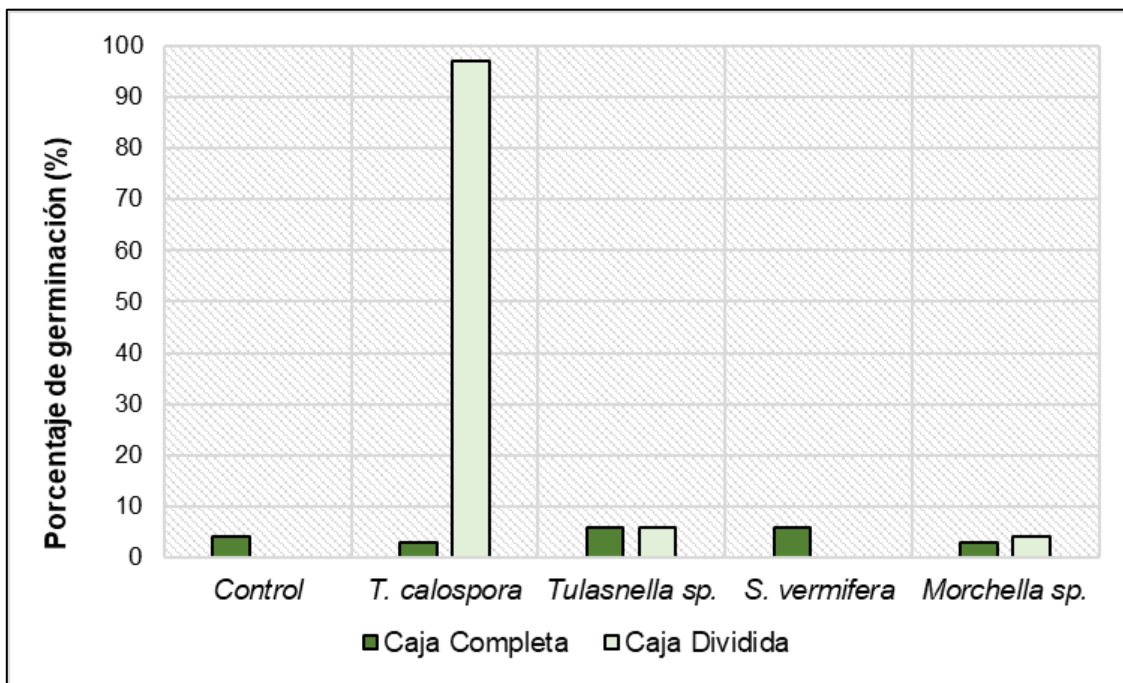


Figura 16. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de *E. miserum* en caja dividida y caja completa en medio MBA, con diferentes tratamientos a los 45 días de la siembra.

Efecto de las cepas fúngicas sobre el desarrollo de la semilla en medio MBA en cultivo *in vitro*

Se analizó el efecto de los exudados volátiles de los diferentes hongos micorrícicos y un endófito sobre el desarrollo de los embriones germinados en el experimento pasado a los 45 días de su siembra. Los cuales fueron germinados en caja dividida

en el apartado de medio MS. En las gráficas podemos observar el desarrollo de las orquídeas en una interacción directa representadas con las barras de color más oscuro y una interacción indirecta que presentan un tono de barras más claro.

Índice germinativo de *L. autumnalis*

Al observar el efecto de una interacción indirecta, se encontró que el desarrollo de todos los tratamientos simbióticos es superior al del tratamiento control, ya que en los tratamientos con los simbioses se obtuvo un mayor número de individuos en estadios de desarrollo mayor al estadio 3, siendo casi el doble que en un tratamiento asimbiótico. Al comparar el efecto entre tipo de interacción directa con indirecta se observó que solo el simbiótico de *Tulasnella* sp. (t3) en interacción indirecta está por debajo de su contra parte de contacto directo (Figuras 17 y 18).

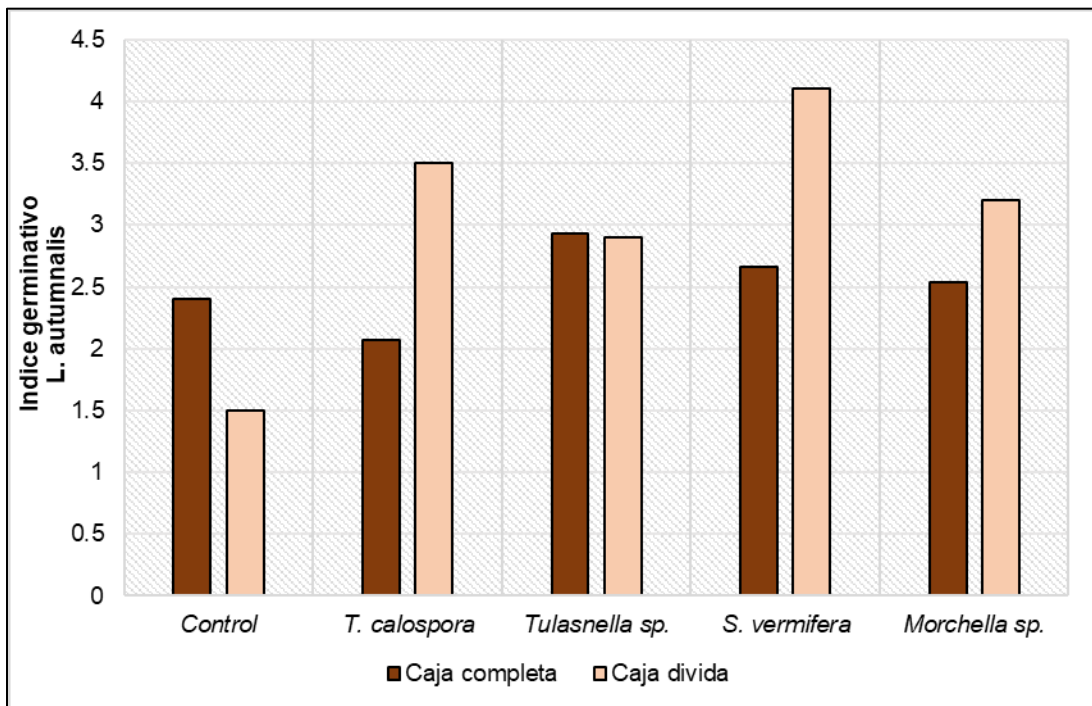


Figura 17. Estadios de desarrollo de semillas de *L. autumnalis*, en diferentes cajas de cultivo a los 45 días de la siembra en medio MBA y MS.











	Dia 1	Dia 45
Control		
<i>T. calospora</i>		
<i>Tulasnella</i> sp.		
<i>S. vermifera</i>		
<i>Morchella</i> sp.		

Figura 18. Comparación de estadios de desarrollo (día 1 y día 45) de semillas de *L. autumnalis* en respuesta a compuestos volátiles de las cepas fúngicas.

Índice germinativo de *O. graminifolium*

Al observar el comportamiento de las diferentes cepas sobre el desarrollo de *O. graminifolium* en diferentes tipos de contacto (directo e indirecto), el cual nos mostró un mejor desarrollo de los embriones en las cajas completas (interacción directa) de manera general, sin embargo, en todos los tratamientos presentan valores parecidos al control (t1). Mientras que al analizar el efecto de un contacto indirecto se observó que el único tratamiento con valores mayores al control fue *T. calospora* (t2) a los 45 días de la siembra (Figuras 19 y 20).

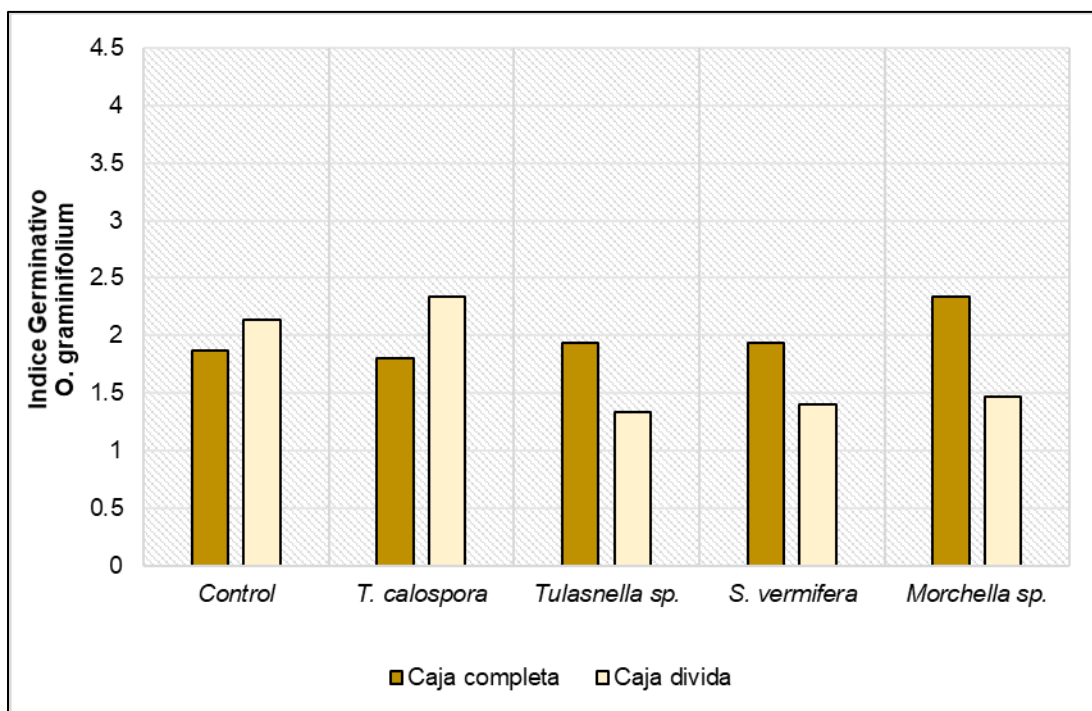


Figura 19. Estadios de desarrollo de semillas de *O. graminifolium*, en diferentes tratamientos a los 45 días de la siembra en medio MBA y MS.











	Dia 1	Dia 45
Control		
<i>T. calospora</i>		
<i>Tulasnella</i> sp.		
<i>S. vermifera</i>		
<i>Morchella</i> sp.		

Figura 20. Comparación de estadios de desarrollo (día 1 y día 45) de semillas de *O. graminifolium* en respuesta a compuestos volátiles de las cepas fúngicas.

Índice germinativo de *E. miserum*

Cuando se analizó el efecto de las cepas sobre el desarrollo de la orquídea *E. miserum* en distintos tipos de contacto, para el contacto directo no se encontró comportamiento diferente entre los tratamientos fúngicos y el control asimbiótico, sin embargo, al evaluar el efecto en un contacto indirecto la mayoría de los tratamientos tuvieron un efecto ligeramente mayor al de control, y la mejor respuesta fue con el tratamiento de *T. calospora* (t2) en caja dividida (Figuras 21 y 22).

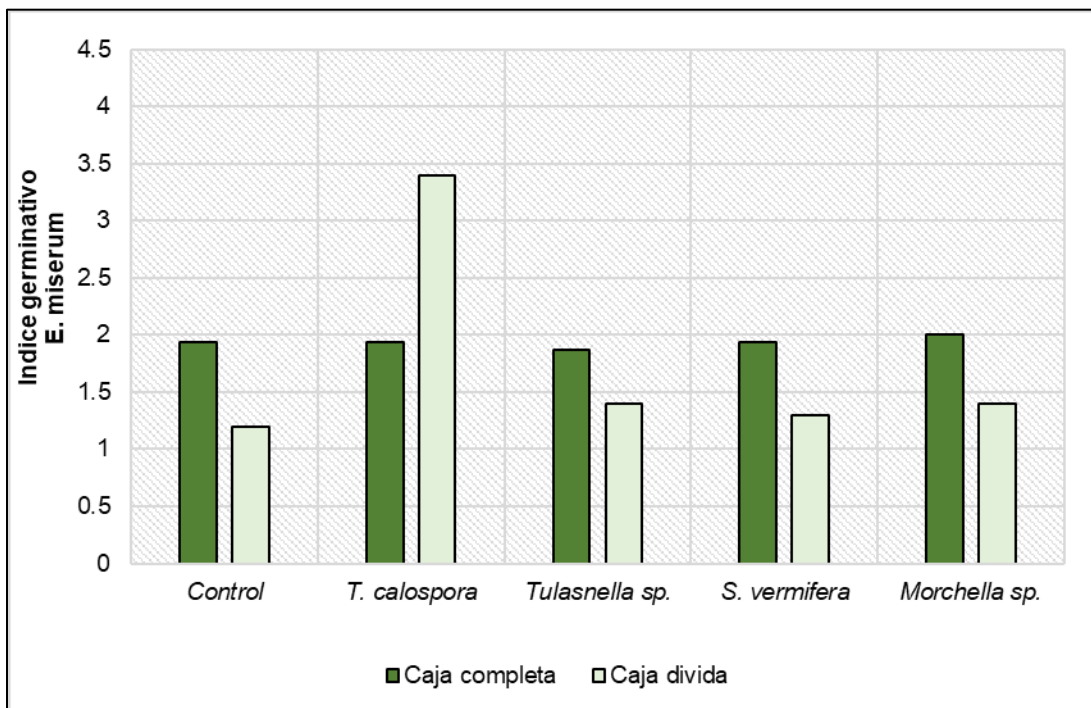


Figura 21. Estadios de desarrollo de semillas de *E. miserum*, en diferentes tratamientos a los 45 días de la siembra en medio MBA.




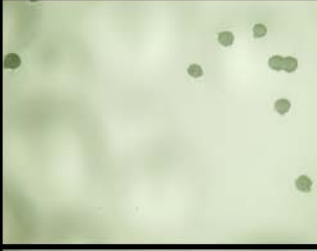






	Dia 1	Dia 45
Control		
<i>T. calospora</i>		
<i>Tulasnella</i> sp.		
<i>S. vermifera</i>		
<i>Morchella</i> sp.		

Figura 22. Comparación de estadios de desarrollo (día 1 y día 45) de semillas de *E. miserum* en respuesta a compuestos volátiles de las cepas fúngicas.

Montaje de la técnica *in vitro* dual

Transcurridos 120 días de la siembra, se montó el experimento de la fase *in vitro* dual para los embriones obtenidos de las tres especies de orquídeas, sin embargo, los hongos invadieron los medios tomando un rol parasitoide. Transcurridos 6 meses no se obtuvieron plántulas o las plántulas fueron consumidas por los hongos (Figura 23).



Figura 23. Plántulas de *L. autumnalis* creciendo en la técnica *in vitro* dual, con la cepa *T. calospora* con un comportamiento de parasito invadiendo las plántulas.

Discusión

Las asociaciones simbióticas estudiadas durante el presente trabajo entre los hongos micorrícicos (extraídos de raíces de la orquídea *L. autumnalis*) y las orquídeas durante la germinación en una interacción directa, mostraron una respuesta diferencial dependiendo de la orquídea. Encontrando que las semillas de las orquídeas se les dificulta germinar de manera asimbiótica, ya que los tratamientos asimbióticos (controles) presentaban los valores más bajos. Confirmando la hipótesis existente de la necesidad de un simbiote fúngico para la germinación en estado natural (Peterson et al., 2004).

Los valores de germinación de *L. autumnalis* durante el trabajo, demostraron mayor afinidad entre la orquídea y los HMO, presentando los valores más altos (26%) recordando que es la especie de la que se extrajeron los HMO. De igual manera, tenemos el efecto sobre la germinación en *O. graminifolium* que también incrementaron los porcentajes de germinación comparados con un tratamiento asimbiótico, presentando un comportamiento generalista con respecto a sus asociaciones. Muchos autores reportan que una gran cantidad de orquídeas fotosintéticas interactúan con una variedad de HMO compatibles (Otero et al., 2002), o incluso que algunas orquídeas pueden germinar en asociación con hongos obtenidos de otra especie (Zettler, 1997). Zettler et al., (2007) menciona que el efecto de la asociación simbiótica puede variar dependiendo de la especie. Explicando porque a pesar de tener efectos positivos en ambas especies orquídeas los resultados son diferentes entre sí.

Por otra parte, para la orquídea *E. miserum* el efecto de los HMO sobre la germinación de sus semillas es nulo. Lo cual nos indica un comportamiento selectivo que tiene esta orquídea con sus socios fúngicos. Se ha reportado que algunas especies de orquídeas solo germinan en presencia de su simbiote fúngico específico (Pereira et al., 2005). Trabajos enfocados en el uso de HMO en la germinación en semillas de orquídeas del género *Epidendrum* como el trabajo de

Bermeo Criollo Y Sari Cumbe, en el 2018 han demostrado una promoción en la germinación de las semillas, así como en el desarrollo de los embriones al utilizar cepas de *Ceratobasidium* sp. y *Sebacina vermifera* (actualmente *Serendipita vermifera*) esta última especie fue utilizada durante este trabajo. Riofrio y colaboradores en el 2013 mencionan que el género *Epidendrum* suele ser muy específico hacia sus asociaciones. Estos trabajos demuestran que la afinidad de una orquídea no está relacionada a su género, sino a su especie.

En cuanto al índice germinativo (desarrollo de los embriones) y la sobrevivencia de las plantas, se encuentra una pérdida en el efecto positivo de los micobiontes sobre las plantas. Lo cual nos indica que los HMO dejaron de ser funcionales una vez germinada la semilla. Estudios previos muestran que la orquídea puede cambiar de socios fúngicos de acuerdo a la etapa fenológica a la que se encuentre, incluso se discute la idea de que diversos micobiontes cumplen diferentes funciones a lo largo del ciclo de la orquídea (Zhang et al., 2020). Además, se ha informado que los hongos no compatibles pueden estimular la germinación, pero no el desarrollo posterior (Rasmussen et al., 2015).

Al comparar estudios de orquídeas adultas y plántulas de la misma especie con HMO, encontramos frecuentemente un cambio en las asociaciones. Algunas orquídeas mantienen sus asociaciones con un solo micobionte, y existen otras que cambian de simbiosis facultativamente o verse obligadas a cambiar durante su transición a la etapa adulta, especialmente durante perturbaciones ambientales (McCormick et al., 2006). También se ha observado que algunas orquídeas aumentan la diversidad de hongos micorrícicos en su etapa adulta, lo que demuestra un mayor grado de selectividad durante la germinación que en estado adulto (Bidartondo et al., 2008). En el caso de *L. autumnalis*, se han reportado diferentes asociaciones fúngicas en sus raíces, permitiéndole establecer una asociación con una gran cantidad de HMO, que estén presentes en un sitio determinado a lo largo de su ciclo de vida. La alta dispersión y colonización está relacionada con la capacidad de interacción con diversas especies de hongos.

Demostrando una plasticidad para cambiar de socio fúngico de acuerdo a sus necesidades, razón por la cual aumenta su supervivencia durante las diferentes etapas de su ciclo de vida (Waud et al., 2017). Este comportamiento se vio reflejado en los resultados obtenidos teniendo diferentes efectos de acuerdo a los estados fenológicos de las plantas.

Es importante destacar el efecto de las cepas pertenecientes al género *Tulasnella* en la germinación, desarrollo y supervivencia de las plántulas de orquídeas. Estas cepas mostraron variabilidad en su efecto según el estado fenológico de las diferentes especies de orquídeas. La compatibilidad de este género de hongos es regulada de manera separa entre semilla y plántulas (Fuji et al., 2020). Rasmussen en el 2002, sugirió que para las orquídeas de habito epifito se pueden asociar con un amplio grado de socios HMO, desatacando que las orquídeas presentan un solo tipo de hongo micorrícico predominante. Estas asociaciones tan específicas usualmente son con miembros de *Tulasnellaceae* y *Ceratobasidiaceae*. *Tulasnella* es un género que ha sido reportado comúnmente en orquídeas fotosintéticas y epifitas neotropicales con reportes en orquídeas terrestres y epifitas terrestres (Cruz Blasi, 2007). Una colonización por cepas de *Tulasnella* presenta como un aumento en la biomasa de las orquídeas (Sathiyadash et al., 2020), y la promoción en la iniciación de la germinación de las semillas (Hadley et al., 1971; Herrera et al., 2017).

Se ha reportado que HMO, son capaces de producir compuestos que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas como el AIA, el GA₃ y el ANA (Dan et al., 2012). Muchos de los beneficios sobre el desarrollo de las plantas son producto de las secreciones liberadas por los HMO, las cuales activan respuestas de señalización comunes durante la simbiosis. Generando un mejor desarrollo en las plantas (Arora et al., 2016; Sathiyadash et al., 2020). En el estudio mencionado, se observó que para la orquídea *L. autumnalis* las secreciones de los HMO son suficientes para promover la germinación y el desarrollo en menor tiempo que un tratamiento asimbiótico. En el caso de *E. miserum*, se encontró la germinación y

desarrollo solo se vio incrementaron en asociación de con la cepa de *T. calospora* encontrando una afinidad incluso a los volátiles producidos por los HMO. Sin embargo, en el caso de *O. graminifolium*, el efecto nulo de los exudados indica que los compuestos por sí solos no son suficientes para desencadenar una respuesta fisiológica, y que se requiere un contacto directo con los HMO para obtener algún tipo de respuesta.

Al analizar el efecto que tuvieron las cepas fúngicas sobre la germinación, desarrollo y supervivencia es importante resaltar el efecto de la cepa endófito, la cual durante la etapa germinativa promovió la germinación de 2 de las 3 especies de orquídeas (*L. autumnalis* y *O. graminifolium*), sin embargo, el efecto de la misma disminuyó en el desarrollo de las plántulas. Para la etapa de la supervivencia teniendo un efecto nulo parecido al control. Esto sugiere un efecto facultativo dependiendo del estadio de desarrollo en el que se encuentre, corroborando de esta manera los resultados de Ordóñez et al. (2012), donde trabajaron con hongos endófitos extradidos de raíces de orquídeas adultas pertenecientes al género *Vanilla* en estado silvestre. En su investigación inocularon plántulas de *V. planifolia* con los HE obtenidos y encontraron una respuesta diferencial dependiendo de los HE, con base al estado de desarrollo que presente la planta. Además, mencionaron que algunas cepas endófitas pueden tener un aporte insuficiente para influir en las tasas de crecimiento, o que la asociación endófito puede no ser fundamental en todas las etapas de las plantas, aunque sí en la germinación de las semillas. Estos resultados resaltan la relación entre el estado fenológico de las plantas y el efecto de los HE (Porrás-Alfaro et al., 2011).

Conclusiones

Los tratamientos asimbióticos mostraron los valores más bajos de germinación, confirmando la necesidad de un simbionte fúngico para la germinación exitosa de las semillas de orquídeas.

Existe una variabilidad en la respuesta de las orquídeas a las asociaciones simbióticas con HMO. Algunas especies de orquídeas, como *L. autumnalis* y *O. graminifolium*, mostraron una mayor afinidad con los HMO y experimentaron un aumento en los porcentajes de germinación en comparación con los tratamientos asimbióticos. Sin embargo, otras especies, como *E. miserum*, fueron más selectivas en sus asociaciones y solo respondieron a cepas específicas de HMO.

El efecto de los HMO en la germinación de las semillas de orquídeas puede variar según el estado fenológico de las plantas. Si bien los HMO promovieron la germinación en algunas especies, se observó una disminución en su efecto en el desarrollo de las plántulas y la supervivencia de las plantas. Esto sugiere que las orquídeas pueden cambiar de socios fúngicos a lo largo de su ciclo de vida y que diferentes HMO pueden desempeñar funciones específicas en cada etapa.

Las cepas de HMO pertenecientes al género *Tulasnella*, han demostrado ser beneficiosas para la germinación y el desarrollo de las orquídeas. Estas asociaciones específicas entre orquídeas y miembros de Tulasnellaceae están relacionadas con un aumento en la biomasa de las orquídeas y la iniciación de la germinación de las semillas.

Los HMO son capaces de producir compuestos bioactivos, como ácido indol acético (IAA), ácido giberélico (GA) y ácido naftalenacético (NAA), que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las secreciones liberadas por los HMO activan respuestas de señalización comunes durante la simbiosis, lo que promueve un mejor desarrollo en las orquídeas.

En esta investigación, los resultados destacan la importancia de las asociaciones simbióticas entre las orquídeas y los hongos micorrícicos para la germinación exitosa de las semillas y el desarrollo temprano de las plántulas. La especificidad de las asociaciones, la variabilidad en la respuesta de las orquídeas a diferentes cepas de HMO y la influencia del estado fenológico de las plantas son aspectos importantes a considerar en futuras investigaciones sobre la interacción entre orquídeas y HMO.

Literatura citada

Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*, 33(1), 1–97. <https://doi.org/10.1007/BF02858656>

Arditti, J., & Ghani, A. K. A. (2000). Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145(3), 367–421. <https://doi.org/DOI:10.1046/j.1469-8137.2000.00587.x>

Arora, N. K., & Mishra, J. (2016). Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, 107, 405–407. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.05.020>

Batty, A. L., Brundrett, M. C., Dixon, K. D., & Sivasithamparam, K. (2006). New methods to improve symbiotic propagation of temperate terrestrial orchid seedlings from axenic culture to soil. *Australian Journal of Botany*, 54, 367–374.

Batty, A. L., Dixon, K. W., Brundrett, M. C., & Sivasithamparam, K. (2002). Orchid Conservation and Mycorrhizal Associations BT – Microorganisms. In *Plant Conservation and Biodiversity* (K. Sivasithamparama, K. W. Dixon, & R. L. Barrett, Eds.; pp. 195–226). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/0-306-48099-9_7

Beltrán Nambo, M. D. L. A. (2010). *Aislamiento y caracterización de hongos micorrícicos asociados a orquídeas terrestres del género Bletia (Orchidaceae) en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio, del Mpio. de Uruapan, Michoacán*. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Beltrán Nambo, M. D. L. A. (2018). *Diversidad fúngica en raíces de orquídeas mexicanas y su contribución para la germinación y desarrollo inicial de plántulas in vitro*. Tesis de Doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Bermeo Criollo, C. A., & Sari Cumbe, F. A. (2018). "Simbiosis Hongo – Micorriza como factor promotor de la germinación en semillas de orquídeas del género *Epidendrum*." Universidad de Cuenca. Ecuador. Tesis de licenciatura.

Bidartondo, M. I., & Read, D. J. (2008). Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology*, 17(16), 3707–3716. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03848.x>

Brundrett, M. C., Scade, A., Batty, A. L., Dixon, K. W., & Sivasithamparam, K. (2003). Development of in situ and ex situ seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats. *Mycological Research*, 107(10), 1210–1220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0953756203008463>

Cruz Blasi, J. (2007). Colonización micorrízica y diversidad de hongos micorrízicos de algunas especies de orquídeas epifitas tropicales en el Sureste de Chiapas, México. Colegio de Postgrados, Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Tesis de maestría.

Da Silva, J. A. T., Galdiano, R. F., & De Martin, V. F. (2018). *In vitro* seed germination, seedling development, and reintroduction of the threatened Brazilian orchid *Oncidium baueri* Lindl. *Horticultura Brasileira*, 36(2), 238–244.

Dan, Y., Yu, X., Guo, S., & Meng, Z. (2012). Effects of forty-two strains of orchid mycorrhizal fungi on growth of plantlets of *Anoectochilus roxburghii*. *African Journal of Microbiology Research*, 6.

Flores-Escobar, G., Legaria-Solano, J. P., Gil-Vasquez, I., & Colinas-Leon, M. T. (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14, 347–353.

Fuji, M., Miura, C., Yamamoto, T., Komiyama, S., Suetsugu, K., Yagame, T., Yamato, M., & Kaminaka, H. (2020). Relative effectiveness of Tulasnella fungal strains in orchid mycorrhizal symbioses between germination and subsequent seedling growth. *Symbiosis*, 81(1), 53–63. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00681-0>

Govaerts, R. (2023). *World Checklist of Orchidaceae*. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. https://wcsp.science.kew.org/namedetail.do?name_id=327928

Hadley, G., & Williamson, B. (1971). Analysis of the post-infection growth stimulus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist*, 70(3), 445–455. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1971.tb02546.x>

Herrera, H., Valadares, R., Contreras, D., Bashan, Y., & Arriagada, C. (2017). Mycorrhizal compatibility and symbiotic seed germination of orchids from the Coastal

Range and Andes in south central Chile. *Mycorrhiza*, 27(3), 175–188. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0733-0>

Honrubia, H. (2009). Las micorrizas: Una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 66.

McCormick, M. K., Whigham, D. F., Sloan, D., O'Malley, K., & Hodkinson, B. (2006). Orchid-fungus fidelity: a marriage meant to last? *Ecology*, 87(4), 903–911. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[903:ofammt\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[903:ofammt]2.0.co;2)

Ordóñez C, N. F., Otero, J. T., & Diez G, M. C. (2012). Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta Agronómica*, 61(3), 282–290.

Otero, J. T., Ackerman, J. D., & Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89(11), 1852–1858. <https://doi.org/https://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1852>

Pereira, O. L., Kasuya, M. C. M., Borges, A. C., & Araújo, E. F. de. (2005). Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of Botany*, 83(1), 54–65. <https://doi.org/10.1139/b04-151>

Peterson, R. L., Yukari, U., & Carla, Z. (1998). Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis*, 25, 29–55.

Peterson, R., & Massicotte, H. (2004). Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique - CAN J BOT*, 82, 1074–1088. <https://doi.org/10.1139/b04-071>

Porras-Alfaro, A., & Bayman, P. (2011). Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 291–315. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081831>

Ramsay, R. R., Sivasithamparam, K., & Dixon, K. W. (1986). Patterns of infection and endophytes associated with Western Australian orchids. *Lindleyana*, 1, 203–214.

Rasmussen, H. N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*, 244, 149–163.

Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersakova, J., & Tesitelova, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of Botany*, 116(3), 391–402. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv087>

Sathiyadash, K., Karthikeyan, V., Rajendran, K., Muthukumar, T., Sathiyadash, K., Thangavelu, M., Karthikeyan, V., & Rajendran, K. (2020). Orchid Mycorrhizal Fungi: Structure, Function, and Diversity (pp. 239–280). https://doi.org/10.1007/978-981-32-9456-1_13

Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). 6 - Structure and development of ectomycorrhizal roots. In *Mycorrhizal symbiosis* (3rd ed., pp. 191–268). Academic Press.

Waud, M., Brys, R., Van Landuyt, W., Lievens, B., & Jacquemyn, H. (2017). Mycorrhizal specificity does not limit the distribution of an endangered orchid species. *Molecular Ecology*, 26(6), 1687–1701. <https://doi.org/10.1111/mec.14014>

Zelmer, C. D., Cuthbertson, L., & Currah, R. S. (1996). Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds, and protocorms. *Mycoscience*, 37, 439–448.

Zettler, L. (1997). *Orchid-fungal symbiosis and its value in conservation*. *Mcllvaneia* 13:40–45

Zettler, L. W., Poulter, S. B., McDonald, K. I., & Stewart, S. L. (2007). Conservation-driven Propagation of an Epiphytic Orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a Mycorrhizal Fungus. *HortScience*, 42(1), 135–139. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.1.135>

Zhang, Y., Li, Y.-Y., Chen, X.-M., Guo, S.-X., & Lee, Y.-I. (2020). Effect of different mycobionts on symbiotic germination and seedling growth of *Dendrobium officinale*, an important medicinal orchid. *Botanical Studies*, 61(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s40529-019-0278-6>

Capítulo 3. Evaluar el efecto de la adición de diferentes aditivos orgánicos a un medio básico en cultivo *in vitro* e *in vitro* dual, para la germinación simbiótica y desarrollo de plántulas.

Resumen

Las orquídeas michoacanas son de gran importancia ecológica y tradicional, las cuales en su mayoría presentan problemas de sobreexplotación y de pérdida de sus hábitats. Por lo cual, el objetivo de esta investigación fue establecer métodos de micropropagación *in vitro* evaluando diferentes aditivos orgánicos en tratamientos simbióticos. El cultivo inició con la germinación de semillas de orquídeas michoacanas *L. autumnalis*, *O. graminifolium* y *E. miserum* en medios MBA enriquecidos con agua de coco, pulpa de plátano y líquido de café. Se emplearon métodos asimbióticos (control) y métodos simbióticos (*Tulasnella calospora* (t2), *Tulasnella* sp. (t3) y *Serendipita vermifera* (t4) y *Morchella* sp. (t5)). Los resultados mostraron de manera general que, durante la germinación a los 45 días de su siembra, los aditivos solo funcionan en tratamientos asimbióticos para las orquídeas *L. autumnalis* y *O. graminifolium*. En cambio, para *E. miserum* la germinación se vio aumentada en todos los tratamientos comparados con el medio básico de avena, incluso el desarrollo de las plántulas de esta especie se vio beneficiado en todos los tratamientos. Para *L. autumnalis* el desarrollo mostró una respuesta diferencial de acuerdo a la combinación aditivo/hongo. Mientras que *O. graminifolium* los tratamientos asimbióticos funcionaron con los compuestos orgánicos. En cuanto a la supervivencia de las plántulas, de manera general se demostró que los aditivos orgánicos promueven la supervivencia de las plántulas. Las plántulas obtenidas a los 77 días de su siembra fueron trasladadas a condiciones *in vitro* dual, sin embargo, pasados 6 meses ninguna planta sobrevivió. Estos resultados indican que los aditivos orgánicos pueden tener un efecto positivo en la germinación y desarrollo inicial de las plántulas de algunas especies de orquídeas michoacanas, pero aún se requiere mejorar las condiciones de cultivo *in vitro* para lograr una supervivencia a largo plazo. Es importante seguir investigando y optimizando los métodos de micropropagación para conservar y propagar estas orquídeas de importancia ecológica y tradicional en Michoacán.

Palabras claves: Aditivos orgánicos, agua de coco, café, plátano, micropropagación.

Introducción

Las orquídeas son de interés considerando diversos criterios, que pueden ir desde su uso medicinal (Piri et al., 2013), consumibles (Ordóñez et al., 2012) y desde luego ornamental, lo que ha generado una explotación de estos organismos en sus hábitats naturales en forma de saqueos ilegales. Además, la acelerada desaparición de áreas naturales genera que año con año las poblaciones naturales se vean disminuidas de manera drástica durante los últimos años (Hagsater et al., 2005). En los dos últimos siglos se han extinguido varias especies de orquídeas en México y a partir de 1998 han desaparecido al menos 22 especies (Hagsater et al., 2005).

Se han reportado 200 especies en alguna categoría de riesgo y algunos investigadores sugieren que esta cifra podría ser aún mayor (Soto Arenas et al., 2007; Damon, 2018). Ante esta situación, diversas investigaciones se han enfocado en la generación de herramientas (o técnicas) más eficientes para poder restaurar poblaciones naturales de orquídeas (Batty et al., 2006).

El adicionar algún tipo de aditivo orgánico a un medio de cultivo convencional potencia el efecto de este (Puerta Quintero et al., 2011; Huh et al., 2016; Menezes Gonçalves et al., 2016). Sin embargo, la mayoría de las orquídeas germinadas con esto métodos presentan, deficiencias en las etapas de aclimatación (Teixeira da Silva et al., 2015). Una alternativa prometedora y ampliamente investigada en los últimos años es el uso de HMO, ya que han demostrado aumentar la tasa de supervivencia de las orquídeas. Con fines de conservación, el trabajar con HMO es la mejor alternativa debido a los numerosos informes que respaldan la mejora en el porcentaje de sobrevivencia ligada a esta interacción (Rasmussen, 2002; Rasmussen et al., 2015).

Sin embargo, el efecto de la adición de aditivos orgánicos en tratamientos simbióticos ha sido poco explorado. Por lo tanto, en este capítulo se exploró el uso

de agua de coco, pulpa de plátano y líquido de café en tratamientos simbióticos con tres especies de orquídeas michoacanas.

Material biológico

De igual manera que la fase anterior se utilizaron semillas de *L. autumnalis*, *O. graminifolium* y *E. miserum* (Figura 1). Además, también se volvieron a utilizar tres hongos micorrícicos (*Tulasnella calospora*, *Tulasnella* sp. y *Serendipita vermifera*) y un hongo endófito (*Morchella* sp.) (Figura 2) como un control positivo; todos aislados de raíces de orquídeas michoacanas (Beltrán-Nambo, 2018).

Metodología

Durante esta fase de la tesis se utilizó la metodología anterior para el cultivo *in vitro*, con la diferencia de que el medio de cultivo MBA fue enriquecido con alguno de los siguientes aditivos orgánicos: agua de coco (200 ml/L), pulpa de plátano (100g/L), líquido de café (100ml/L) previo a su esterilización (Velázquez Kú et al., 2016). Los procesos de desinfección y siembra de semillas e inóculos fúngicos y controles, así como número de réplicas y variables a considerar se realizarán de manera similar al experimento anterior. Teniendo un total de 15 tratamientos por especie de orquídea (t1: asimbiótico, t2: *Tulasnella calospora*, t3: *Tulasnella* sp. t4: *Serendipita vermifera*, y t5: *Morchella* sp. cada uno con los tres aditivos orgánicos). Contando con un total de cuatro réplicas por tratamiento de manera que por especie de orquídea se tenía un total de 60 cajas.

A los 77 días de su siembra se analizó el porcentaje de germinación e índice germinativo de los embriones de las diferentes especies de orquídeas, así como porcentaje de supervivencia. Todos los datos obtenidos fueron analizados por ANOVA y análisis de correlación, además se compararon medias (LSD de Fisher).

Para la fase de cultivo *in vitro* dual, los embriones de los diferentes tratamientos fueron trasladados siguiendo la misma metodología de la fase 2 con la diferencia de que los medios de cultivo fueron enriquecidos con los aditivos orgánicos probados para el cultivo *in vitro* y a las mismas concentraciones. Este experimento se mantuvo por un periodo de cinco a seis meses y al final del experimento se midieron las mismas variables que para el sistema *in vitro* dual de la fase 2.

Resultados

Germinación 45 días medios enriquecidos

Para demostrar el efecto de la adicción de aditivos orgánicos (agua de coco, pulpa de plátano y líquido de café), a un medio de cultivo sobre la germinación de las orquídeas seleccionadas en tratamientos simbióticos. Se germinaron semillas de las tres especies de orquídeas en cajas con medio MBA y sus diferentes variaciones, a los 45 días de su siembra se obtuvo el porcentaje de germinación. El cual se comparó entre los diferentes medios con una comparación de medias.

Germinación de *L. autumnalis* con los aditivos orgánicos

La germinación simbiótica de *L. autumnalis* en los medios enriquecidos no se ve favorecida, presentando porcentajes de germinación menores a los reportados en un medio básico (sin ningún aditivo). Sin embargo, podemos resaltar que el adicionar agua de coco a un medio MBA en un tratamiento asimbiótico si promueve la germinación comparada con un medio tradicional. Otro tratamiento que es necesario destacar es el tratamiento simbiótico con *Morchella* sp. (t5) en un medio enriquecido con líquido de café que promueve la germinación de manera muy destacada (Figura 24).

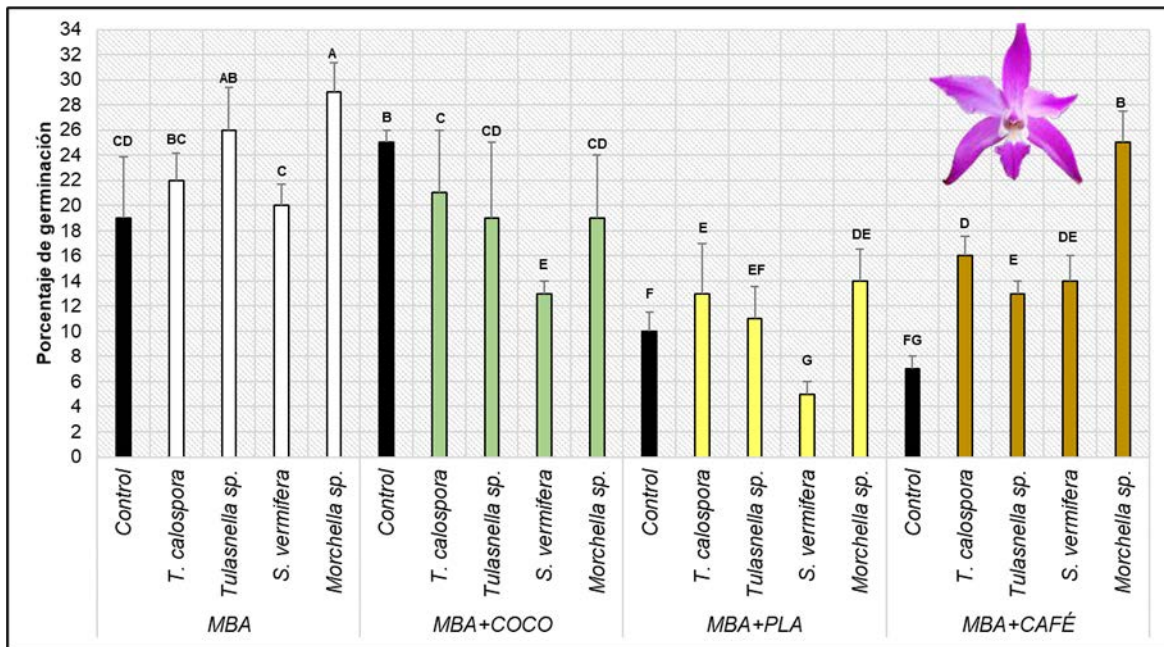


Figura 24. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de *L. autumnalis* en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos, con diferentes tratamientos a los 45 días de la siembra. Letras diferentes indican diferencias significativas (P=0.05, Tukey).

Germinación de *O. graminifolium* con los aditivos orgánicos

En el caso de *O. graminifolium* se observó que en los medios enriquecidos los tratamientos asimbióticos presentaron los porcentajes de germinación más altos. También es importante resaltar que en el medio MBA sin la adicción de algún aditivo orgánico funciona de mejor manera que los tratamientos asimbióticos, exceptuando el tratamiento con *Tulasnella sp.* (t2) (Figura 25).

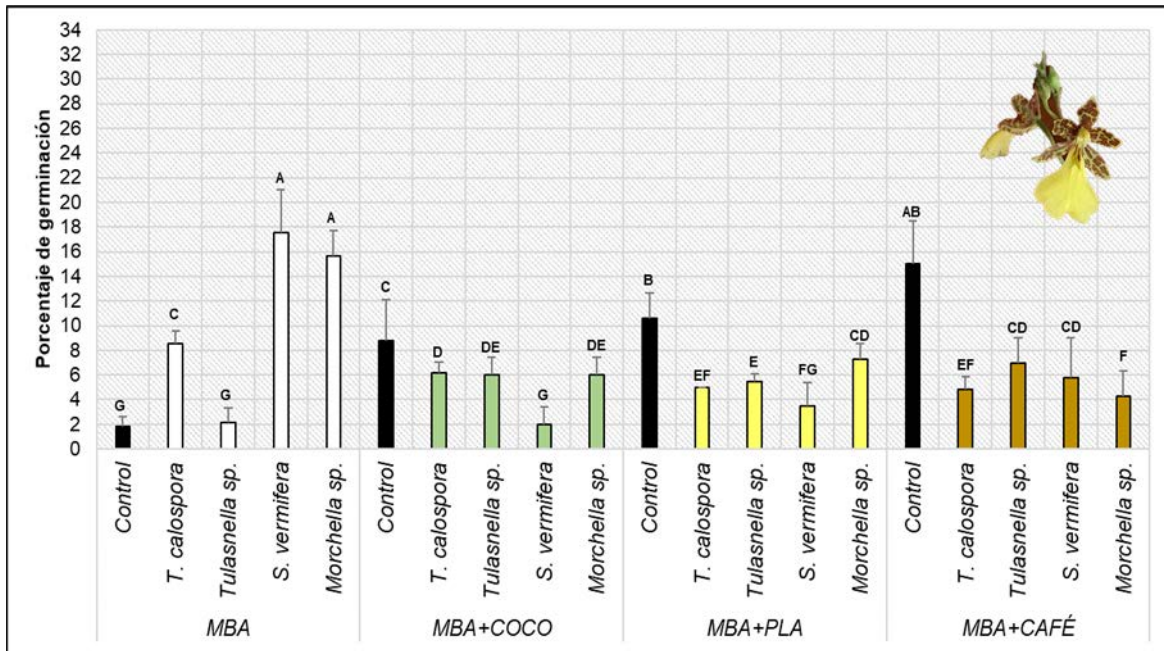


Figura 25. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de *O. graminifoulim* en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos, con diferentes tratamientos a los 45 días de la siembra. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P=0.05$, Tukey).

Germinación de *E. miserum* con los aditivos orgánicos

En cuanto a la germinación de semillas de la orquídea *E. miserum* en los medios enriquecidos, se muestran porcentajes de germinación mayores que los obtenidos en un medio básico. Obteniendo una respuesta diferencial dependiendo del aditivo con el hongo. Podemos resaltar el tratamiento con *S. vermifera* (t4) en el medio con agua de coco presentó el valor más bajo (Figura 26).

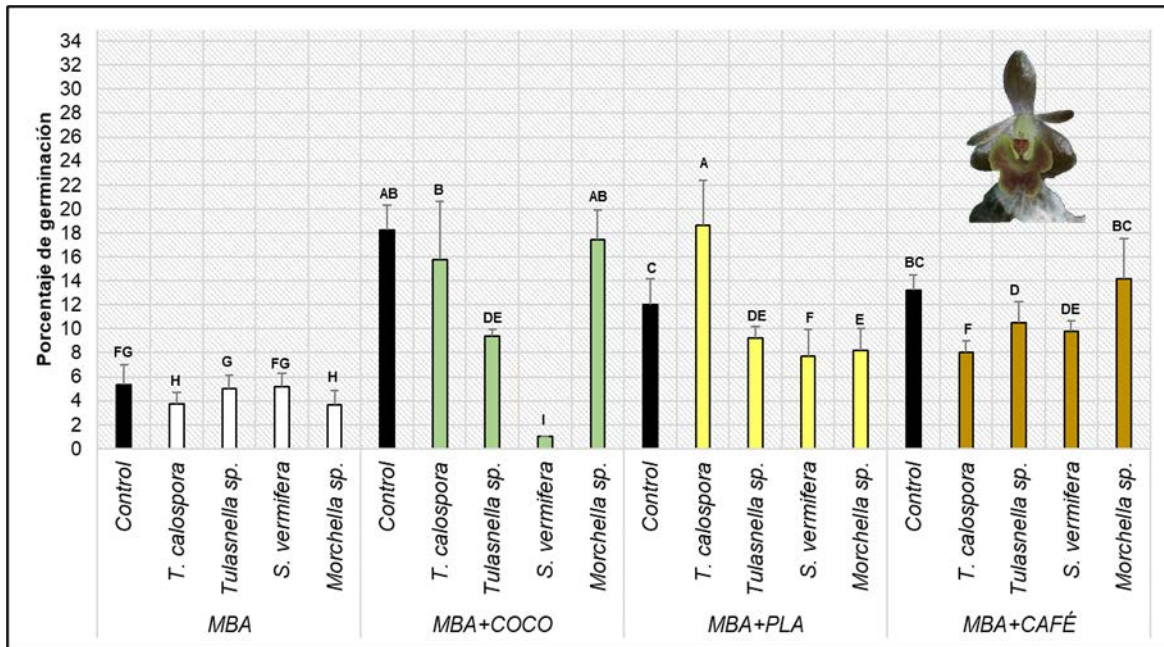


Figura 26. Comparación del porcentaje de germinación de semillas de *E. miserum* en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos, con diferentes tratamientos a los 45 días de la siembra. Letras diferentes indican diferencias significativas (P=0.05, Tukey).

Efecto de las cepas fúngicas sobre el desarrollo del embrión en medio MBA + aditivos orgánicos en cultivo *in vitro*.

Para evidenciar el efecto que se obtiene de añadir aditivos orgánicos a un medio básico de avena, a los embriones de la prueba anterior se les analizó en que estadio de desarrollo iban a los 77 días de su siembra, posteriormente se calculó el índice germinativo, con el cual se le puede asignar un valor a cada tratamiento. Se compararon los tratamientos entre medios e inóculos fúngicos.

Desarrollo de *L. autumnalis* en medios enriquecidos

Al analizar el índice germinativo de *L. autumnalis* con los diferentes aditivos, se encontró una respuesta diferencial dependiendo del hongo con el aditivo, sin embargo, de manera general podemos observar valores más altos en los

tratamientos con aditivos orgánicos. Podemos destacar la tendencia del efecto del hongo endófito *Morchella* sp. (t5) sobre el desarrollo con todos los aditivos orgánicos, teniendo valores más altos que su contra parte en un medio básico (Figura 27).

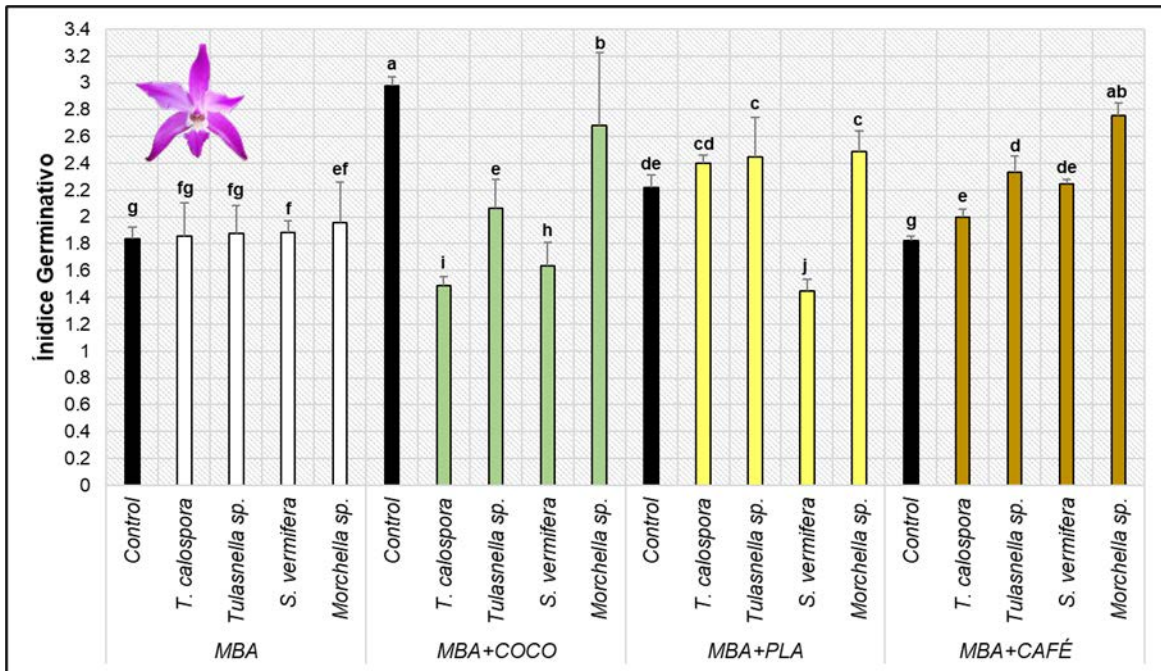


Figura 27. Comparación del índice germinativo de semillas de *L. autumnalis* en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos, con diferentes tratamientos a los 77 días de la siembra. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P=0.05$, Tukey).

Desarrollo de *O. graminifolium* en medios enriquecidos

Cuando se observó el efecto de los simbioses sobre el desarrollo de los embriones en la orquídea *O. graminifolium* con los diferentes aditivos se encontró que, en los medios enriquecidos con pulpa de plátano y líquido de café, la respuesta asimbiótica genera los mejores resultados comparadas con sus contrapartes con los inoculantes fúngicos, sin embargo, de manera general encontramos mejores resultados en el medio MBA (sin aditivos orgánicos) pero que se encuentran en simbiosis con los hongos (Figura 28).

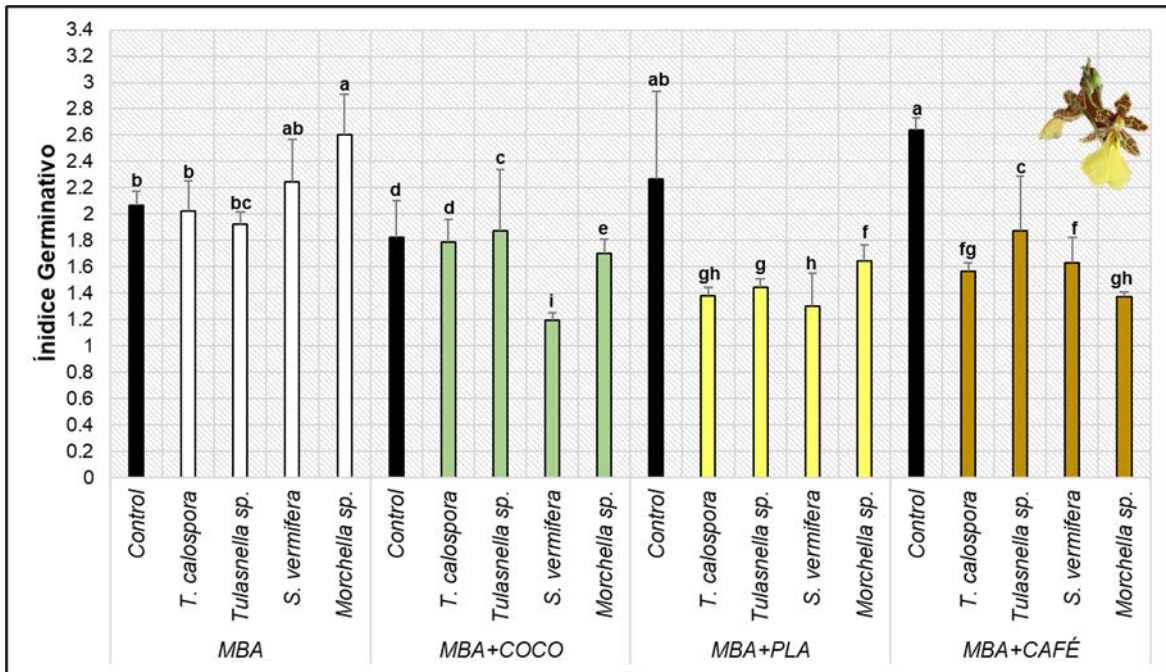


Figura 28. Comparación del índice germinativo de semillas de *O. graminifoulim* en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos, con diferentes tratamientos a los 45 días de la siembra. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P=0.05$, Tukey).

Desarrollo de *E. miserum* en medios enriquecidos

En la orquídea *E. miserum* con los diferentes aditivos orgánicos en tratamientos simbióticos, se encontró una respuesta diferencial en el desarrollo dependiendo del inoculo fúngico con el medio, donde destacamos que en el medio con agua de coco y el hongo *S. vermifera* (t4) fue la respuesta más baja comparada con los demás tratamientos en este aditivo. En cambio, en el medio enriquecido con pulpa de plátano, el hongo *S. vermifera* (t4) promovió el mejor resultado. Para el medio enriquecido con líquido de café se encontró que el tratamiento asimbiótico indujo de mejor manera del desarrollo de esta orquídea, seguido por el tratamiento simbiótico con el hongo endófito *Morchella* sp.(t5) (Figura 29).

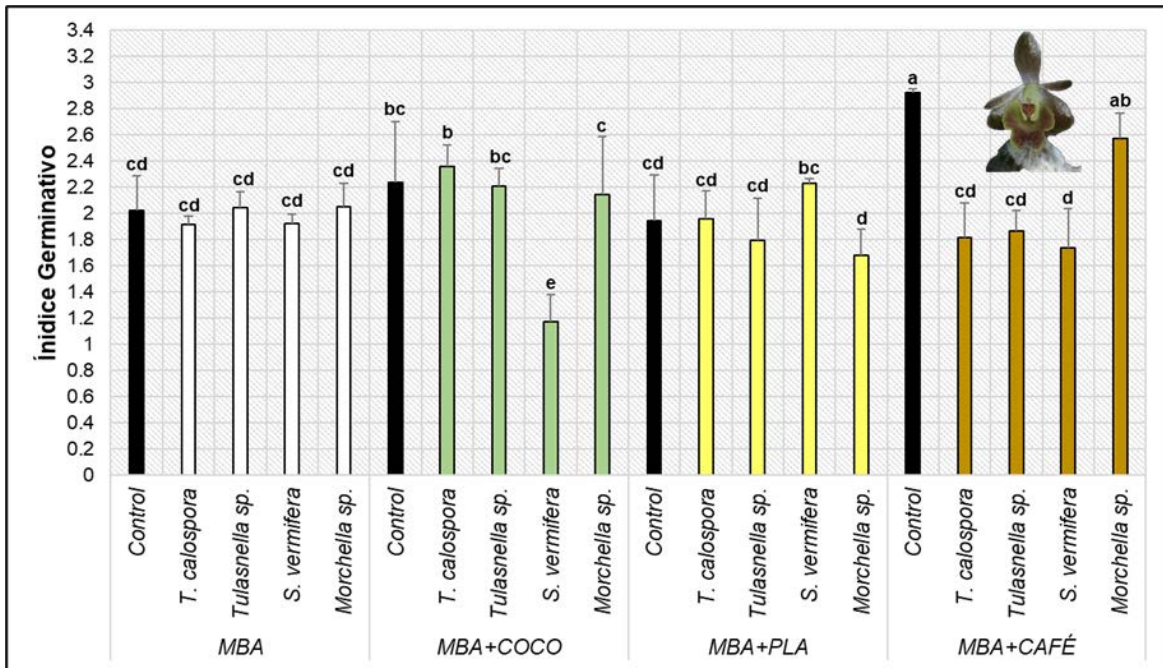


Figura 29. Comparación del índice germinativo de semillas de *E. miserum* en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos, con diferentes tratamientos a los 45 días de la siembra. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P=0.05$, Tukey).

Efecto de las cepas fúngicas sobre el porcentaje de supervivencia de los embriones en medio MBA + aditivos orgánicos en cultivo *in vitro* a los 77 días

Para calcular el porcentaje de supervivencia de las diferentes orquídeas de interés, en interacción directa con las cepas fúngicas, se realizó un análisis a los 77 días de la siembra de las semillas en los medios enriquecidos, para contabilizar la supervivencia. Debido a la baja cantidad de individuos no se les pudo realizar un análisis estadístico.

Porcentaje de supervivencia de *L. autumnalis* en medios enriquecidos

Para el caso de *L. autumnalis* encontramos que el adicionar aditivos al medio básico de avena, si promueve la supervivencia de las plantas al comparar los medios, sin embargo, para los tratamientos simbióticos solo encontramos respuestas mejores

que en el control cuando se utilizó el aditivo de agua de coco y la mejor respuesta con el inóculo de *T. calospora* (t2), para la pulpa de plátano todos los tratamientos presentaron respuestas similares al control y para el líquido de café el tratamiento con *Tulasnella* sp. (t3) fue la mejor respuesta comparada con su control (Figura 30).

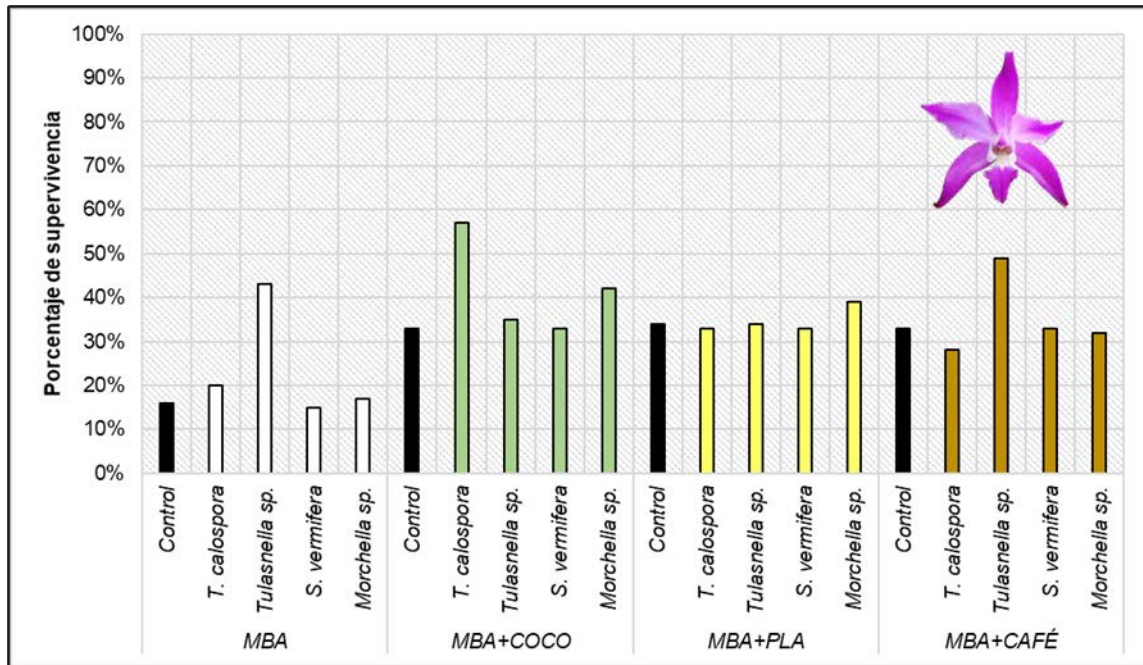


Figura 30. Comparación de la supervivencia de los embriones *L. autumnalis* en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos, con diferentes tratamientos a los 77 días de la siembra.

Porcentaje de supervivencia de *O. graminifolium* en medios enriquecidos

Cuando se les analizó la supervivencia a los embriones de la especie *O. graminifolium*, el mayor porcentaje de supervivencia se obtuvo en el medio sin aditivos orgánicos y con el tratamiento asimbiótico (t1). Para el medio enriquecido con agua de coco se encontró el tratamiento simbiótico con *S. vermifera* (t4) como el tratamiento que más promovió la supervivencia. Para los medios enriquecidos con pulpa de plátano y líquido de café los controles asimbióticos (t1) presentaron las mejores respuestas (Figura 31).

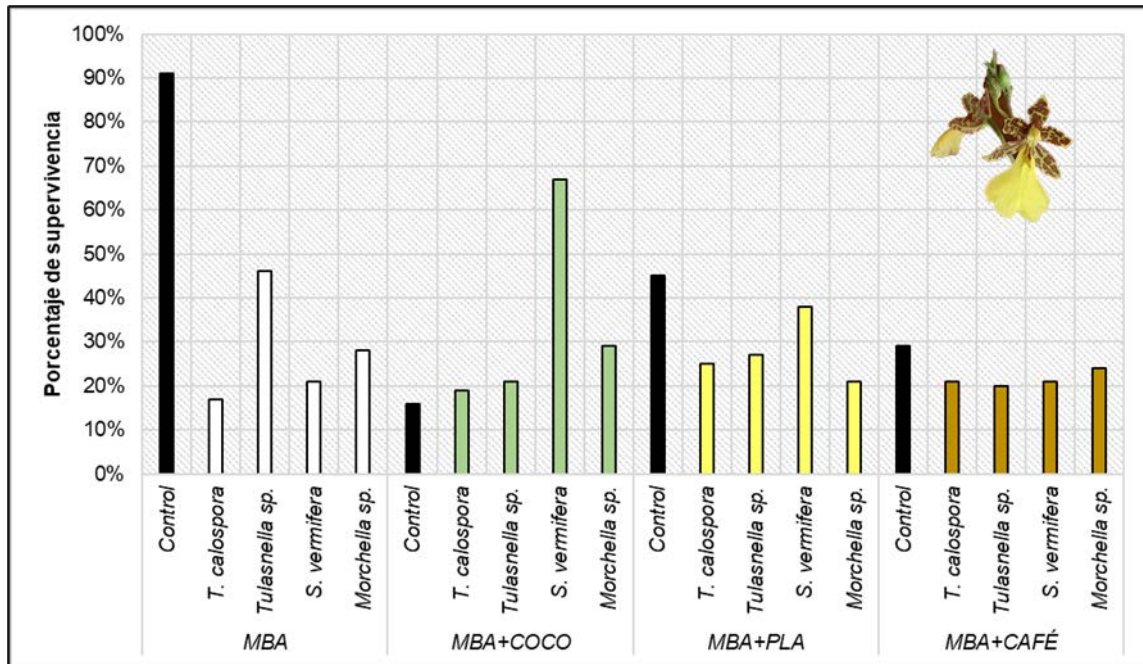


Figura 31. Comparación de la supervivencia de los embriones *O. graminifoulim* en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos, con diferentes tratamientos a los 77 días de la siembra.

Porcentaje de supervivencia de *E. miserum* en medios enriquecidos

El adicionar algunos aditivos orgánicos a los medios si promueve de manera general la supervivencia de la orquídea *E. miserum* con algunos tratamientos fúngicos. Destacando el resultado en agua coco con *S. vermifera* (t4), promovió la supervivencia en un 100%. Para pulpa de plátano encontramos que el tratamiento con *Tulasnella* sp. (t3) genera los mejores resultados, seguido de un tratamiento asimbiótico. (t1). En cuanto al tratamiento en líquido de café encontramos mejores resultados en un medio asimbiótico (Figura 32).

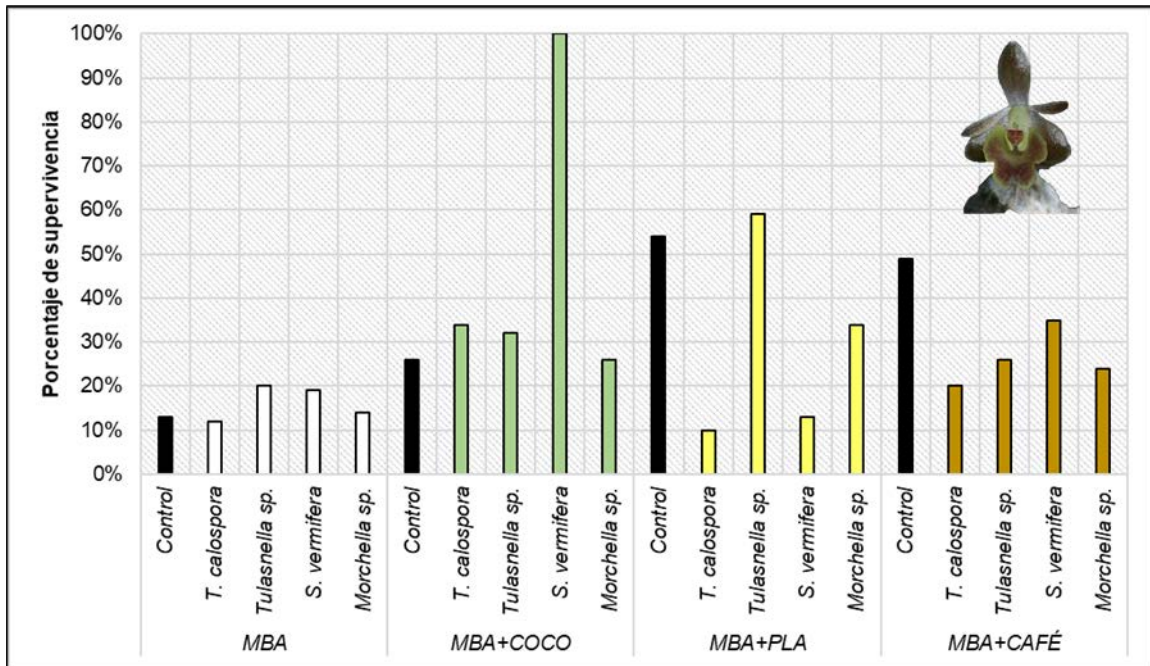


Figura 32. Comparación de la supervivencia de los embriones *E. miserum* en medio MBA en los diferentes medios enriquecidos, con diferentes tratamientos a los 77 días de la siembra.

Montaje de técnica *in vitro* dual con aditivos orgánicos.

Transcurridos 77 días de la siembra se montó el experimento de la fase *in vitro* dual con todos los aditivos orgánicos para los embriones obtenidos de las tres especies de orquídeas, sin embargo, los hongos invadieron los medios tomando un rol parasitoide. Transcurridos 6 meses no se obtuvieron plántulas (Figura 33).



Figura 33. Fotografía de frascos con el sistema *in vitro* dual con los diferentes tratamientos de interés a una semana de su montaje en cámara de crecimiento.

Discusión

Los resultados obtenidos sobre la germinación, desarrollo y supervivencia de las plántulas de las diferentes orquídeas en medios enriquecidos demuestran una respuesta única para cada orquídea, teniendo resultados muy diferentes en todas las evaluaciones. Se ha mencionado que al trabajar con técnicas como la micropropagación *in vitro* los porcentajes de germinación pueden variar de acuerdo de a la especie (Velázquez et al., 2016). De esta manera, numerosos estudios de cultivo *in vitro* enfocados a la generación de protocormos sugieren que la efectividad del método varía de acuerdo a las necesidades de las especies de orquídeas (Arditti, 1977; Huh et al., 2016).

Al analizar la germinación de *O. graminifolium* y *E. miserum* se encontró que la adición de los 3 aditivos orgánicos promueve la germinación en un tratamiento asimbiótico comparado con el tratamiento control. Incluso podemos resaltar que para *E. miserum* la adicción de los aditivos orgánicos mejoró su germinación en todos los tratamientos. Para la orquídea *L. autumnalis* solo con el aditivo agua de coco la germinación fue superior al medio control. En cambio, durante la germinación en tratamientos con inóculos fúngicos de manera general no demostraron tener mejor efecto que los tratamientos asimbióticos. Solo podemos destacar que los tratamientos *L. autumnalis* con *Morchella* sp. (t5) en medio con café y *E. miserum* con *T. calospora* en medio con café superaron a los tratamientos asimbióticos en términos de germinación.

Cuando se analizó la germinación en medios enriquecidos se encontró que el agua de coco, es el aditivo que tiene mejor desempeño en tratamientos asimbióticos durante la germinación. Pero al analizar el efecto en el desarrollo de los embriones encontramos que los aditivos empiezan a beneficiar el desarrollo. Para *L. autumnalis*, todos los aditivos promovieron el desarrollo de los embriones de manera general, siendo el agua de coco el aditivo que obtuvo los mejores resultados en el tratamiento asimbiótico. Sin embargo, al observar los resultados en medios enriquecidos con pulpa de plátano y líquido de café, los tratamientos con inóculos fúngicos tienen valores más altos que sus controles en medios básicos. Para *O. graminifolium*, los aditivos pulpa de plátano y líquido de café, solo funcionaron en tratamientos asimbióticos, lo que sugiere que la presencia de los inocuos fúngicos no mejoró significativamente el desarrollo de los embriones en este caso. En el caso de *E. miserum* encontramos una respuesta variada dependiendo del aditivo orgánico utilizado. El tratamiento con *S. vermifera* (t4), sólo funciona en medios con pulpa de plátano, mientras que el líquido de café fue efectivo únicamente en los tratamientos asimbióticos seguidos del hongo endófito *Morchella* sp. (t5), mientras que con agua de coco solo el tratamiento con *S. vermifera* (t4) afectó el desarrollo de las plantas.

Estos resultados indican que los aditivos orgánicos, pueden tener un impacto positivo en el desarrollo de los embriones de las orquídeas y que la presencia de inóculos fúngicos puede potenciar aún más este efecto en algunos casos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos resultados son específicos para las especies de orquídeas estudiadas y pueden variar en otras especies.

Para germinar semillas en un cultivo *in vitro*, se requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos que son necesarios a niveles de macroelementos como; C, H, O, P, K, N, S, Ca, y Mg y microelementos; B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe y Cl. Generalmente, las células fabrican sus proteínas a partir de fuentes adecuadas de carbono y nitrógeno. Las cuales son suministradas por el medio de cultivo (Eskew et al., 1984; Krikorian, 1991).

Se han reportan múltiples compuestos que benefician la germinación y desarrollo de las plantas en el líquido de café, entre ellos se encuentran los carbohidratos como glucosa, fructosa y ribosa, que proporcionan nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas. Estos carbohidratos pueden servir como fuente de energía y carbono para las células vegetales. Aunado a esto, el café posee altas concentraciones de nitrógeno. Se ha reportado que alrededor del 3.08% del peso seco de un grano de café corresponden a nitrógeno. Un nutriente esencial para el crecimiento de las plantas, ya que desempeña un papel crucial en la síntesis de proteínas y en otros procesos metabólicos. Por lo tanto, la presencia de nitrógeno en el líquido de café puede proporcionar una fuente adicional de este nutriente para las plantas en el medio de cultivo (Puerta Quintero, 2011).

La adición de sustratos orgánicos naturales como el agua de coco y como pulpa de plátano, pueden promover el desarrollo de los brotes cultivados *in vitro* dado que representan una fuente de vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos, carbohidratos, péptidos y hormonas de crecimiento (Utami & Hariyanto, 2020). El agua de coco es un líquido incoloro producido por los cocos verdes (*Cocos nucifera*), contiene azúcar soluble que es una fuente natural de carbono, aminoácidos, fenoles, vitaminas,

difenilurea y mioinositol. Estos compuestos pueden actuar como nutrientes y promover el desarrollo de los brotes. Otro de los componentes importantes del agua de coco es la difenilurea, que es un precursor orgánico de las citoquininas las hormonas vegetales que promueven la división celular en las plantas (Huh et al., 2016; Menezes Gonçalves et al., 2016). Por lo tanto, la presencia de difenilurea en el agua de coco puede estimular la división celular y promover el crecimiento de los brotes cultivados *in vitro*.

Menezes y colaboradores en el 2016, reportaron que plantas de *Laeliocattleya* cultivadas en medios enriquecidos con agua de coco presentaban valores más bajos en los primeros estadios de desarrollo. Además, corroboraron que la pulpa de plátano induce la multiplicación y alargamiento de raíces en cultivo de plántulas. Por otro lado, el trabajo de Huang (2001) demuestra que la pulpa de plátano induce el desarrollo de yemas caulinares, pero no de raíces.

Se ha propuesto que las asociaciones entre orquídeas se pueden dar de 2 maneras. La primera involucra orquídeas heterotróficas en las cuales su dependencia a los hongos micorrícicos es a lo largo de toda la vida de la planta; mientras que en las orquídeas autótrofas esta necesidad va disminuyendo por el desarrollo de funciones fotosintéticas, es decir la planta depende menos de los hongos (Cameron et al., 2007).

La simbiosis se ha definido como la una relación habitual entre dos o más especies, que redundan en beneficios de todas ellas (Hilje, 1964). Incluso para el caso de las orquídeas se ha aceptado el término de simbiosis obligatoria, que se define como la asociación vital para la vida de la orquídea (Rasmussen et al., 2015). Sin embargo, esas asociaciones se efectúan en estado natural donde existe la necesidad para poder sobrevivir. Durante el presente trabajo, se germinaron las semillas en medios enriquecidos, donde no existía necesidad de las orquídeas de establecer alguna asociación con los inóculos fúngicos, lo que nos indicaría la variación de los resultados con respecto a los obtenidos y mostrados en el capítulo

2. Es importante tener en cuenta que los estudios en condiciones controladas en el laboratorio proporcionan información importante, pero no reemplazan la complejidad de las interacciones naturales que ocurren en el medio ambiente.

La efectividad de la inoculación dependerá del balance de factores ecofisiológicos en el sistema planta-suelo, lo cual significa que un mismo inóculo puede desencadenar efectos muy variados sobre un cultivo, dependiendo de las condiciones que se tenga. Por lo tanto, no se puede generalizar el efecto de un tipo de micorrizas sobre todos los árboles ni sobre todos los ecosistemas (manejo directo). Los hongos al estar en condiciones idóneas crecieron de manera acelerada invadiendo toda la caja. Son muchos los factores que influyen en el crecimiento de los hongos, como la disponibilidad de materia orgánica y de agua, la temperatura, el pH y la luz. La temperatura óptima la encontramos entre los 25°C y los 30°C. En cuanto, al pH del sustrato, la mayoría son ligeramente acidófilos, en pH de entre 5,5 y 5,7 (Izco Sevillano et al., 1997). Siendo las condiciones que se mantuvieron durante la experimentación. Demostrando que los hongos en condiciones idóneas para ellos pueden cambiar a un papel parasitario afectando al crecimiento de las plantas.

Rhizoctonia sensu lato es un grupo artificial que incluye géneros de hongos como *Thanatephorus*, *Ceratobasidium*, *Sebacina* y *Tulasnella* que forman simbiosis con las orquídeas (Sneh et al., 1991; Rasmussen et al., 2015). Sin embargo, los hongos de ese grupo artificial tienen actividades antagónicas con muchas familias de plantas (Otero Ospina & Bayman, 2009).

Conclusiones

En general, se puede concluir que la germinación, desarrollo y supervivencia de las plántulas de orquídeas en medios enriquecidos es un proceso complejo y altamente variable, con respuestas únicas para cada especie de orquídea. Los resultados obtenidos en las evaluaciones demuestran que las orquídeas tienen necesidades específicas y que los aditivos orgánicos utilizados, como el agua de coco, la pulpa

de plátano y el líquido de café, pueden influir en la germinación y el desarrollo de las plántulas.

La micropropagación *in vitro* y la utilización de diferentes técnicas de cultivo, como la adición de inóculos fúngicos, también afectan los resultados obtenidos. Es importante considerar que la efectividad de estos métodos puede variar dependiendo de la especie de orquídea y las condiciones de cultivo.

Además, se destaca la importancia de proporcionar a las plántulas de orquídeas una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos, como macroelementos y microelementos, para su adecuado desarrollo. Estos nutrientes son esenciales y pueden ser suministrados mediante el medio de cultivo utilizado.

Por último, se evidencia la complejidad de la simbiosis entre las orquídeas y los hongos micorrícicos, y cómo esta relación puede variar según la especie de orquídea y su nivel de dependencia fotosintética. Los hongos micorrícicos pueden tener un papel beneficioso en el crecimiento de las orquídeas, pero también pueden volverse parasitarios en condiciones favorables.

En conclusión, el cultivo *in vitro* de orquídeas en medios enriquecidos requiere considerar las necesidades específicas de cada especie, la selección adecuada de aditivos orgánicos, la aplicación de técnicas de inoculación apropiadas y el suministro balanceado de nutrientes. Estos factores influyen en la germinación, desarrollo y supervivencia de las plántulas y son relevantes para el éxito de los estudios y la producción de orquídeas en entornos controlados.

Literatura citada

Arditti, J. (1977). *Orchid biology, reviews and perspectives*. Cornell University Press.

Batty, A. L., Brundrett, M. C., Dixon, K. D., & Sivasithamparam, K. (2006). New methods to improve symbiotic propagation of temperate terrestrial orchid seedlings from axenic culture to soil. *Australian Journal of Botany*, 54, 367–374.

Beltrán Nambo, M. D. L. A. (2018). Diversidad fúngica en raíces de orquídeas mexicanas y su contribución para la germinación y desarrollo inicial de plántulas *in vitro*. Tesis de Doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Cameron, D. D., Johnson, I., Leake, J. R., & READ, D. J. (2007). Mycorrhizal Acquisition of Inorganic Phosphorus by the Green-leaved Terrestrial Orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botany*, 99(5), 831–834.

Damon, A. (2018). Estrategia para el rescate, conservación y aprovechamiento sustentable de las orquídeas (orchidaceae) en el sureste de México. *Agro Productividad*, 10(6).

Eskew, D. L., Welch, R. M., & Norvell, W. A. (1984). Nickel in Higher Plants. *Plant Physiology*, 76(3), 691–693. <https://doi.org/10.1104/pp.76.3.691>

Hagsater, E., Soto Arenas, M. A., Salazar Chavez, G. A., Machorro Jiménez, R., López Rosas, M. A., & Dressler, R. L. (2005). Las orquídeas de México. Instituto Chinoín México. D.F. 304 pp.

Hilje, L. (1964). Simbiosis: consideraciones terminológicas y evolutivas. *UNICIENCIA*, 1(1), 57–60.

Huh, Y., Lee, J., Nam, S., Paek, K., & Suh, G. (2016). Improvement of asymbiotic seed germination and seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw. with organic additives. *Journal of Plant Biotechnology*, 43, 138–145. <https://doi.org/10.5010/JPB.2016.43.1.138>

Izco Sevillano, J., Barreno Rodriguez, E., Bruguès, M., Costa, M., Devesa Alcaraz, J. A., Fernandez Gonzalez, F., Gallardo Garcia, T., Llimona Pàges, X., Salvo Tierra, A. E., Talavera Lozano, S., & Valdes Castrillion, B. (1997). *Botánica* (M.-H. I. de España, Ed.).

Krikorian, A. D. (1991). Medios de cultivo: Generalidades, composición y preparación. In *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (pp. 44–77).

Menezes Gonçalves, L., Manchado P.S., M. F., Ballesta, P., Mora, F., Milaneze Gutierrez, M. A., & Aparecida Mangolin, C. (2016). Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). *IDESIA*, 34(1), 47–54.

Ordóñez C, N. F., Otero, J. T., & Diez G, M. C. (2012). Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta Agronómica*, 61(3), 282–290.

Otero Ospina, J. T., & Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epifitas. *Acta Agronómica; Vol. 58, Núm. 4 (2009)*.

Piri, H., Pathak, P., & Bhanwra, R. K. (2013). Asymbiotic germination of immature embryos of a medicinally important epiphytic orchid *Acampe papillosa* (Lindl.) Lindl. *African Journal of Biotechnology*, 12, 162–167.

Puerta Quintero, G. I. (2011). Composición química de una taza de café. *Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé)*, 414, 1–12.

Rasmussen, H. N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*, 244, 149–163.

Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersakova, J., & Tesitelova, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of Botany*, 116(3), 391–402. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv087>

Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. (1991). Identification of Rhizoctonia species. APS press.

Soto Arenas, M. A., Solano Gómez, R., & Hagsater, E. (2007). Risk of extinction and patterns of diversity loss in mexican orchids. *Lankesteriana*, 7(1–2), 114–121.

Teixeira da Silva, J. A., Tsavkelova, E. A., Zeng, S., Ng, T. B., Parthibhan, S., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Rao, M. V. (2015). Symbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on plant growth and development. *Planta*, 242(1), 1–22. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2301-9>

Utami, E., & Hariyanto, S. (2020). Organic Compounds: Contents and Their Role in Improving Seed Germination and Protocorm Development in Orchids. *International Journal of Agronomy*, 2020, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/2795108>

Velázquez Kú, N., Quijano-Avila, J. C., & Rodríguez-Ávila, N. L. (2016). análisis de diferentes sustratos en la germinación y multiplicación *in vitro* de orquídeas silvestres del estado de campeche. *revista del centro de graduados e investigación. instituto tecnológico de mérida*, 31(63), 27–31.

8. Discusión General

Durante el presente trabajo las diferentes pruebas, la orquídea *L. autumnalis* demostró ser la especie que más afinidad tuvo con las cepas probadas, variando el efecto de acuerdo a la cepa. La especie *L. autumnalis* ha demostrado tener valores alto de riqueza y diversidad de las comunidades fúngicas (Beltrán Nambo, 2018). Además, de ser una de las especies con mayor cubrimiento territorial. Lo cual confirma lo que se ha mencionado sobre algunas especies de orquídeas, en las que su talento adaptativo para dispersarse y colonizar nuevos ambientes está relacionado con su capacidad de interactuar con una mayor variedad de hongos, donde obtienen mayor ventaja en los sustratos donde se desarrollan y probablemente en variaciones estacionales (Ercole et al., 2015; Waud et al., 2016).

En adición, su plasticidad para cambiar de socios fúngicos de acuerdo a sus necesidades, asegura su supervivencia durante diferentes etapas de su ciclo de vida o condiciones ambientales (Rasmussen et al., 2015). Lo cual se observó durante en los resultados, variando la efectividad de acuerdo al estado fenológico de la planta. Sin embargo, en el trabajo de Beltrán Nambo (2018), se trabajó con *L. autumnalis* y las mismas cepas fúngicas, obteniendo porcentajes de germinación más altos en menos días. Lo cual nos indica que las cepas con las que se trabajaron durante el presente trabajo han perdido parcialmente su efectividad.

Otro punto importante a resaltar, es que la simbiosis se da en la naturaleza para complementar sus necesidades en una asociación mutualista. Sin embargo, durante el trabajo se tuvieron las condiciones óptimas para el crecimiento y desarrollo tanto de las semillas como de los HMO (Zettler, 1997).

Se ha discutido que las condiciones del nicho afectan el cómo actúan los HMO con las semillas de orquídeas (Waud et al., 2017). Asimismo, desde el punto de vista nutricional, el crecimiento de la planta derivado al aumento de la absorción de P es el principal beneficio que obtiene del HM, por la baja disponibilidad de este

elemento, en algunos suelos. Sin embargo, si el P no es un elemento limitante en el suelo, la simbiosis puede llegar a ser reducida o hasta inhibida si se encuentra en altos niveles en el suelo (Blanco & Salas, 1997). Todas estas respuestas tan específicas reflejan diferencias en las estrategias ecológicas de los HM, en el metabolismo de las plantas, la arquitectura de la raíz y en los patrones de colonización (Dodd, 1998; Smith & Read, 2008b).

Se ha reportado que algunos hongos micorrícicos tienen dificultades en crecer en medios de cultivo convencionales (Rasmussen et al., 2015), no obstante durante el presente trabajo se observó que las cepas no solo crecieron de manera más acelerada que en su medio clásico de crecimiento, sino que también pasaron de tener un efecto benéfico a un rol de parásito. Es necesario tener en cuenta las necesidades tanto de los HMO como de las orquídeas al establecer metodologías para su cultivo.

Durante el trabajo de Batty et al. (2006), se trabajó con medio PDA a un cuarto de su concentración en el cultivo *in vitro* dual, con lo que el crecimiento de los hongos fue limitado y controlado. Bajar las concentraciones de los aditivos y avena limitaría el crecimiento de los HMO y favorecería el cultivo de *in vitro* dual para las orquídeas.

9. Conclusión general

El adicionar aditivos orgánicos a un medio de cultivo, no incrementa los beneficios que representa una germinación simbiótica *in vitro*. Perjudicando su germinación, desarrollo y supervivencia en un contacto directo.

Con los resultados del cultivo *in vitro e in vitro dual*, se observó que la germinación, desarrollo y supervivencia de las plántulas de las tres especies de orquídeas se ven modificadas por la interacción con los hongos. *L. autumnalis* responde de manera adecuada tanto a la interacción directa como indirecta con los hongos. *E. miserum* presenta un mejor desarrollo con los volátiles del hongo *T. calospora*. Mientras que, *O. graminifolium* responde mejor al contacto directo con las cepas fúngicas probadas

10. Perspectivas

Realizar experimentación en la que se determine la germinación, crecimiento y desarrollo de las plántulas, en cultivos con los hongos por separado (sin interacción directa) en el mismo medio y observar si en conjunto los compuestos volátiles derivado de los hongos y los aditivos orgánicos mejoran los tiempos de germinación y desarrollo de las plantas.

Disminuir las concentraciones de la avena y de los aditivos orgánicos en el montaje de las técnica *in vitro dual*, para evitar un crecimiento muy acelerado de las cepas.

Trabajar con una sola especie de orquídea y diversas cepas de hongos, lo cual dará una perspectiva general de la respuesta específica de la planta.

11. Literatura general citada

- Aewsakul, N., Maneesorn, D., Serivichyaswat, P., Taluengjit, A., & Nontachaiyapoom, S. (2013). Ex vitro symbiotic seed germination of *Spathoglottis plicata* Blume on common orchid cultivation substrates. *Scientia Horticulturae*, 160, 238–242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2013.05.034>
- Alexander, C., Alexander, I. J., & Hadley, G. (1984). Phosphate uptake By *Goodyera repens* in relation to mycorrhizal infection. *New Phytologist*, 97, 401–412.
- Alvarez-Pardo, V. M., Ferreira, A. G., & Nunes, V. F. (2006). Seed disinfestation methods for in vitro cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. *Horticultura Brasileira*, 24(2), 217–220. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362006000200019>
- Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review*, 33(1), 1–97. <https://doi.org/10.1007/BF02858656>
- Arditti, J. (1977). *Orchid biology, reviews and perspectives*. Cornell University Press.
- Arditti, J. (2008). An history of orchid hybridization, seed germination and tissue culture. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 89, 359–381. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1984.tb02567.x>
- Arditti, J., Ernst, R., Yam, T. W., & Glabe, C. (1990). The contribution of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. *Lindleyana*, 5(4), 249–255.
- Arditti, j., & Ghani, A. K. A. (2000). Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145(3), 367–421. <https://doi.org/DOI: 10.1046/j.1469-8137.2000.00587.x>
- Arora, N. K., & Mishra, J. (2016). Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, 107, 405–407. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.05.020>
- Ávila Diaz, I., & Salgado Garciglia, R. (2006). Propagación y mantenimiento in vitro de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *BIOLÓGICAS*, 8, 138–149.
- Bagyalakshmi, G., Thangavelu, M., Sathiyadash, K., & appan, M. (2010). Mycorrhizal and dark septate fungal associations in shola species of Western Ghats, southern India. *Mycoscience*, 51, 44–52. <https://doi.org/10.1007/s10267-009-0009-z>
- Barroso, J., Neves, H., & Pais, M. (2006). Production of indole-3-ethanol and indole-3-acetic acid by the mycorrhizal fungus of *Ophrys lute* (Orchidaceae). *New Phytologist*, 103, 745–749. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1986.tb00849.x>

- Batty, A. L., Brundrett, M. C., Dixon, K. D., & Sivasithamparam, K. (2006). New methods to improve symbiotic propagation of temperate terrestrial orchid seedlings from axenic culture to soil. *Australian Journal of Botany*, *54*, 367–374.
- Batty, A. L., Dixon, K. W., Brundrett, M. C., & Sivasithamparam, K. (2002). *Orchid Conservation and Mycorrhizal Associations BT- Microorganisms in Plant Conservation and Biodiversity* (K. Sivasithamparama, K. W. Dixon, & R. L. Barrett, Eds.; pp. 195–226). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/0-306-48099-9_7
- Bayman, P., Lebrón, L. L., Tremblay, R. L., & Lodge, D. J. (1997). Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *The New Phytologist*, *135*(1), 143–149. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00618.x>
- Bayman, P., & Otero, J. T. (2006). *Microbial Endophytes of Orchid Roots BT - Microbial Root Endophytes* (B. J. E. Schulz, C. J. C. Boyle, & T. N. Sieber, Eds.; pp. 153–177). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_9
- Beltrán Nambo, M. D. L. A. (2010). Aislamiento y caracterización de hongos micorrízicos asociados a orquídeas terrestres del género *Bletia* (Orchidaceae) en la Reserva Natural Barranca del Cupatitzio, del Mpio. de Uruapan, Michoacán. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Beltrán Nambo, M. D. L. A. (2018). Diversidad fúngica en raíces de orquídeas mexicanas y su contribución para la germinación y desarrollo inicial de plántulas *in vitro*. Tesis de Doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Bermeo Criollo, C. A., & Sari Cumbe, F. A. (2018). “Simbiosis Hongo – Micorriza como factor promotor de la germinación en semillas de orquídeas del género *Epidendrum*.” Universidad de Cuenca. Ecuador. Tesis de maestría.
- Bidartondo, M. I., & Read, D. J. (2008). Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology*, *17*(16), 3707–3716. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03848.x>
- Blanco, F. A., & Salas, E. A. (1997). Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigación realizada en Costa Rica. *Micorrizas En La Agricultura: Contexto Mundial e Investigación Realizada En Costa Rica*, *21*(1), 55–67.
- Böhm, J., & Hock, B. (1997). *Mycorrhizae: Endomycorrhizae BT- Progress in Botany: Structural Botany Physiology Genetics Taxonomy Geobotany/Fortschritte der Botanik Struktur Physiologie Genetik Systematik Geobotanik* (H.-D. Behnke, U. Lüttge, K. Esser, J. W. Kadereit, & M. Runge, Eds.; pp. 555–594). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60458-4_24
- Brundrett, M. (2017). Global Diversity and Importance of Mycorrhizal and Nonmycorrhizal Plants (pp. 533–556). https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_21

- Brundrett, M. C., Scade, A., Batty, A. L., Dixon, K. W., & Sivasithamparam, K. (2003). Development of in situ and ex situ seed baiting techniques to detect mycorrhizal fungi from terrestrial orchid habitats. *Mycological Research*, 107(10), 1210–1220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0953756203008463>
- Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220(4), 1108–1115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/nph.14976>
- Cameron, D. D., Johnson, I., Leake, J. R., & Read, D. J. (2007). Mycorrhizal Acquisition of Inorganic Phosphorus by the Green-leaved Terrestrial Orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botany*, 99(5), 831–834.
- Cameron, D. D., Leake, J. R., & Read, D. J. (2006). Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist*, 171(2), 405–416. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01767.x>
- Carranza Alvarez, C., Trinidad García, K. L., Reyes Hernandez, H., Castillo Pérez, L. J., & Fortanelli Martínez, J. (2020). Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación de *Jacks. ex Andrews* (Orchidaceae). *Revista de Ciencias Biológicas y de La Salud*, XXIII(1), 5–12.
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. In *INIA Serie Actividades de Difusión*. INIA.
- Chang, D. C. N. (2008). Research and application of orchid mycorrhiza in Taiwan. *Acta Horti*, 766, 299–305.
- Chase, M. W. (2005). Classification of Orchidaceae in the Age of DNA data. *Curtis's Botanical Magazine*, 22(1), 2–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1355-4905.2005.00466.x>
- CITES. (2017). CITES, Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. *Journal of Minimal Access Surgery*, Appendices I, II, and III, CITES. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/13880290590913822>.
- Colombo Speroni, F., & De Viana, M. L. (2000). Requerimientos de escarificación en semillas de especies autóctonas e invasoras. *Ecología Austral*, 10(2), 123–131.
- Cortes, J. A., Godoy, J. A., Cortés, J. A., & Mora, R. S. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17(32 SE-Artículo de Revisión). <https://doi.org/10.25058/24629448.3639>
- Cozzolino, S., & Widmer, A. (2005). Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology & Evolution*, 20(9), 487–494. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.06.004>

- Cruz Blasi, J. (2007). Colonización micorrízica y diversidad de hongos micorrízicos de algunas especies de orquídeas epifitas tropicales en el Sureste de Chiapas, México. Colegio de Postgrados, Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Tesis de maestría.
- Da Silva, J. A. T., Galdiano, R. F., & De Martin, V. F. (2018). In vitro seed germination, seedling development, and reintroduction of the threatened Brazilian orchid *Oncidium baueri* Lindl. *Horticultura Brasileira*, 36(2), 238–244.
- Damon, A. (2018). Estrategia para el rescate, conservación y aprovechamiento sustentable de las orquídeas (Orchidaceae) en el sureste de México. *Agro Productividad*, 10(6).
- Dan, Y., Yu, X., Guo, S., & Meng, Z. (2012). Effects of forty-two strains of orchid mycorrhizal fungi on growth of plantlets of *Anoectochilus roxburghii*. *African Journal of Microbiology Research*, 6.
- Dearnaley, J. D. W., Martos, F., Selosse, M. A., & Scott, B. (2010). Exploring the diversity and ecology of fungal partners to orchids: Can we infer specificity from fungal ITS sequences? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1687), 1183–1192.
- Dodd, J. (1998). Recent advances in understanding the role of arbuscular mycorrhizas in plant production. Conference Paper. International Institute of Biotechnology
- Dressler, R. L. (1993). *Field Guide to the Orchids of Costa Rica and Panama*. Cornell University Press.
- Drogue, B., Doré, H., Borland, S., Wisniewski-Dyé, F., & Prigent-Combaret, C. (2012). Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Research in Microbiology*, 163(8), 500–510. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.08.006>
- Ercole, E., Adamo, M., Rodda, M., Gebauer, G., Girlanda, M., & Perotto, S. (2015). Temporal variation in mycorrhizal diversity and carbon and nitrogen stable isotope abundance in the wintergreen meadow orchid *Anacamptis morio*. *New Phytologist*, 205(3), 1308–1319. <https://doi.org/10.1111/nph.13109>
- Eskew, D. L., Welch, R. M., & Norvell, W. A. (1984). Nickel in Higher Plants. *Plant Physiology*, 76(3), 691–693. <https://doi.org/10.1104/pp.76.3.691>
- Fan, W., Lou, H. Q., Yang, J. L., & Zheng, S. J. (2016). The roles of STOP1-like transcription factors in aluminum and proton tolerance. *Plant Signaling & Behavior*, 11(2), e1131371. <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1131371>

- Fay, M. F. (2010). Micropropagation of orchids, 2 volume set, 2nd edn. In *Annals of Botany* (Vol. 105, Issue 4, pp. vi–vii). <https://doi.org/10.1093/aob/mcq019>
- Flores-Escobar, G., Legaria-Solano, J. P., Gil-Vasquez, I., & Colinas-Leon, M. T. (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14, 347–353.
- Fuji, M., Miura, C., Yamamoto, T., Komiyama, S., Suetsugu, K., Yagame, T., Yamato, M., & Kaminaka, H. (2020). Relative effectiveness of *Tulasnella* fungal strains in orchid mycorrhizal symbioses between germination and subsequent seedling growth. *Symbiosis*, 81(1), 53–63. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00681-0>
- Galdiano, R. F., Cortés-Penagos, C., & Núñez, L. E. (2012). Micorriza arbuscular en la propagación *in vitro* de orquídeas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(4), 741-749.
- Govaerts, R. (2023). *World Checklist of Orchidaceae*. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. https://wcsp.science.kew.org/namedetail.do?name_id=327928
- Guo, S. X., & Xu, J. T. (1990). Isolation and culture of fungi promoting seed germination of Shihu etc. medicinal plants of orchid family (Orchidaceae). *Chin Tradit Herb Drug*, 21, 30–31.
- Hadley, G. (1989). *Modern Methods in Orchid Conservation*. Cambridge University Press. <https://doi.org/DOI:10.1017/CBO9780511551307>
- Hadley, G., & Williamson, B. (1971). Analysis of the post-infection growth stimulus in orchid mycorrhiza. *New Phytologist*, 70(3), 445–455. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1971.tb02546.x>
- Hágsater, E., & Soto Arenas, M. A. (2005). *Genera Orchidacearum vol. 4. Epidendroideae (Part one)*. (A. M. Pridgeon, P. J. Cribb, M. W. Chase, & F. N. Rasmussen, Eds.). Oxford University Press. Oxford.
- Hagsater, E., Soto Arenas, M. A., Salazar Chavez, G. A., Machorro Jiménez, R., López Rosas, M. A., & Dressler, R. L. (2005). *Las orquídeas de México*. Instituto Chinoín México.
- Halbinger, F., & Soto Arenas, M. A. (1997). Laelias of Mexico. *Herbario AMO*, 160 PP.
- Harvais, G., & Hadley, G. (1967). The development of *Orchis purpurella*. In: asymbiotic and inoculated cultures. *New Phytologist*, 66(2), 217–230. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1967.tb06000.x>
- Hemanta, L., Ariina, M., Mathukmi, K., & Devi, M. P. (2021). Micropropagation of Orchids. Taran, India. (pp. 379–383).

- Herrera, H., Valadares, R., Contreras, D., Bashan, Y., & Arriagada, C. (2017). Mycorrhizal compatibility and symbiotic seed germination of orchids from the Coastal Range and Andes in south central Chile. *Mycorrhiza*, 27(3), 175–188. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0733-0>
- Hilje, L. (1964). Simbiosis: consideraciones terminológicas y evolutivas. *UNICIENCIA*, 1(1), 57–60.
- Honrubia, H. (2009). Las micorrizas: Una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 66.
- Huh, Y., Lee, J., Nam, S., Paek, K., & Suh, G. (2016). Improvement of asymbiotic seed germination and seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw. with organic additives. *Journal of Plant Biotechnology*, 43, 138–145. <https://doi.org/10.5010/JPB.2016.43.1.138>
- Izco Sevillano, J., Barreno Rodriguez, E., Bruguès, M., Costa, M., Devesa Alcaraz, J. A., Fernandez Gonzalez, F., Gallardo Garcia, T., Llimona Pàges, X., Salvo Tierra, A. E., Talavera Lozano, S., & Valdes Castrillion, B. (1997). *Botánica* (M.-H. I. de España, Ed.).
- Jacquemyn, H., Honnay, O., & Pailler, T. (2007). Range size variation, nestedness and species turnover of orchid species along an altitudinal gradient on Réunion Island: Implications for conservation. *Biological Conservation - BIOL CONSERV*, 136, 388–397. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.12.008>
- Johnson, T. R., Stewart, S. L., Dutra, D., Kane, M. E., & Richardson, L. (2007). Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)—preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90(3), 313–323. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9270-z>
- Kaur, J., Andrews, L., & Sharma, J. (2019). High Specificity Of A Rare Terrestrial Orchid Toward A Rare Fungus Within The North American Tallgrass Prairie. *Fungal Biology*, 123. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.09.010>
- Knudson, L. (1922). Symbiosis and asymbiosis relative to orchids. *New Phytologist*, 26, 328–336.
- Krikorian, A. D. (1991). Medios de cultivo: Generalidades, composición y preparación. In *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* (pp. 44–77).
- Lando, A. P., Wolfart, M. R., Fermino, P. C. P., & Santos, M. (2016). Structural effects on *Cattleya xanthina* leaves cultivated *in vitro* and acclimatized *ex vitro*. *Biologia Plantarum*, 60(2), 219–225. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0589-3>
- Lindén, B. (1980). Aseptic germination of seeds of Northern Terrestrial orchids. *Annales Botanici Fennici*, 17(2), 174–182. <http://www.jstor.org/stable/23726159>

- Liu, H., Luo, Y., & Liu, H. (2010). Studies of Mycorrhizal Fungi of Chinese Orchids and Their Role in Orchid Conservation in China—A Review. *Botanical Review*, 76(2), 241–262.
- Luan, V., Thien, N., Khiem, D., & Nhut, D. (2006). *In vitro* germination capacity and plant recovery of some native and rare orchids. *Biotechnology in Agriculture*, 175–177.
- Marschner, P. (2012). *Chapter 15 - Rhizosphere Biology* (P. B. T.-M. M. N. of H. P. (Third E. Marschner, Ed.; pp. 369–388). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00015-7>
- McCormick, M. K., Whigham, D. F., Sloan, D., O'Malley, K., & Hodkinson, B. (2006). Orchid-fungus fidelity: a marriage meant to last? *Ecology*, 87(4), 903–911. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[903:ofammt\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[903:ofammt]2.0.co;2)
- Menezes Gonçalves, L., Machado P.S., M. F., Ballesta, P., Mora, F., Milaneze Gutierrez, M. A., & Aparecida Mangolin, C. (2016). Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). *IDESIA*, 34(1), 47–54.
- Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S., & Manoch, L. (2011). Symbiotic seed germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume and *Dendrobium draconis* Rchb. f., native orchids of Thailand. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 303–308. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.040>
- Ordóñez C, N. F., Otero, J. T., & Diez G, M. C. (2012). Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta Agronómica*, 61(3), 282–290.
- Otero, J. T., Ackerman, J. D., & Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89(11), 1852–1858. <https://doi.org/https://doi.org/10.3732/ajb.89.11.1852>
- Otero Ospina, J. T., & Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. *Acta Agronómica; Vol. 58, Núm. 4 (2009)*.
- Pant, B., Shah, S., Shrestha, R., Pandey, S., & Joshi, P. (2017). An Overview on Orchid Endophytes. In *Mycorrhiza - Nutrient Uptake, Biocontrol, Ecorestoration: Fourth Edition* (pp. 503–524). https://doi.org/10.1007/978-3-319-68867-1_26
- Pereira, O. L., Kasuya, M. C. M., Borges, A. C., & Araújo, E. F. de. (2005). Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of Botany*, 83(1), 54–65. <https://doi.org/10.1139/b04-151>

- Peterson, R. L., Yukari, U., & Carla, Z. (1998). *Fungal symbioses with orchid protocorms*. 25, 29–55.
- Peterson, R., & Massicotte, H. (2004). Exploring structural definitions of mycorrhizas, with emphasis on nutrient-exchange interfaces. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique - CAN J BOT*, 82, 1074–1088. <https://doi.org/10.1139/b04-071>
- Pierik, R. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. *Mundi-Prensa*.
- Piri, H., Pathak, P., & Bhanwra, R. K. (2013). Asymbiotic germination of immature embryos of a medicinally important epiphytic orchid *Acampe papillosa* (Lindl.) Lindl. *African Journal of Biotechnology*, 12, 162–167.
- Porras-Alfaro, A., & Bayman, P. (2011). Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 291–315. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081831>
- Preusser, S., Poll, C., Marhan, S., Angst, G., Mueller, C. W., Bachmann, J., & Kandeler, E. (2019). Fungi and bacteria respond differently to changing environmental conditions within a soil profile. *Soil Biology and Biochemistry*, 137, 107543. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.107543>
- Puerta Quintero, G. I. (2011). Composición química de una taza de café. *Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé)*, 414, 1–12.
- Ramsay, R. R., Sivasithamparam, K., & Dixon, K. W. (1986). Patterns of infection and endophytes associated with Western Australian orchids. *Lindleyana*, 1, 203–214.
- Rasmussen, H. N. (1995). Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plants. *Cambridge University Press*, 433.
- Rasmussen, H. N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*, 244, 149–163.
- Rasmussen, H. N., Andersen, T. F., & Johansen, B. (1990). Temperature sensitivity of *in vitro* germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant Cell and Environment*, 13, 171–177.
- Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersakova, J., & Tesitelova, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of Botany*, 116(3), 391–402. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv087>
- Rasmussen, H. N., & Rasmussen, F. N. (2009). Orchid Mycorrhiza: Implications of a Mycophagous Life Style. *Oikos*, 118(3), 334–345.

- Reis, M. G., Faria, A. D. de, Bittrich, V., Amaral, M. do C. E., & Marsaioli, A. J. (2000). The chemistry of flower rewards -- *Oncidium* (Orchidaceae). In *Journal of the Brazilian Chemical Society* (Vol. 11). scielo.
- Robinson, M., Riov, J., & Sharon, A. (1998). Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 5030–5032. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.12.5030-5032.1998>
- Salazar-Mercado, S. A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombrain (Orchidaceae). In *Acta Agronómica* (Vol. 61, pp. 69–78). scieloco.
- Salgado-Garciglia, R. (2006). Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas, para colaborar en su conservación. *Revista Biológicas*, 8, 138–149.
- Santos Pérez, U. I., Pedraza Santos, M. E., Salgado Garciglia, R., Martínez Palacios, A., Chávez Bárcenas, A. T., & González Arnao, M. T. (2019). Efectividad de métodos para desinfectar semillas de *Laelia autumnalis* para la conservación en nitrógeno líquido. *Nova Scientia*, 11(23), 143–164. <https://doi.org/10.21640/ns.v11i23.1855>
- Sathiyadash, K., Karthikeyan, V., Rajendran, K., Muthukumar, T., Sathiyadash, K., Thangavelu, M., Karthikeyan, V., & Rajendran, K. (2020). Orchid Mycorrhizal Fungi: Structure, Function, and Diversity (pp. 239–280). https://doi.org/10.1007/978-981-32-9456-1_13
- Sathiyadash, K., Muthukumar, T., Bala Murugan, S., Sathishkumar, R., Uma, E., Jaison, S., & Priyadharsini, P. (2013). *In vitro* asymbiotic seed germination, mycorrhization and seedling development of *Acampae praemorsa* (Roxb.) Blatt. & McCann, a common South Indian orchid. *Asian Pac J Reprod*, 2, 114–118.
- Sebano, G., Manzo, A., Roldán, R., & Castellanos, J. A. (2015). Propagación *in vitro* de orquídeas y otras ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1, 451–456.
- Segundo Campos, R. (2016). Pruebas de germinación simbiótica y asimbiótica de orquídeas, desarrollo y supervivencia de plántulas, *in vitro* y *ex vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Shoresh, M., Harman, G. E., & Mastouri, F. (2010). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 21–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114450>
- Smith, S. E. (1966). Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytologist*, 65(4), 488–499. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1966.tb05972.x>

- Smith, S. E., Facelli, E., Pope, S., & Andrew Smith, F. (2010). Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil*, 326(1), 3–20. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9981-5>
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008a). 6 - Structure and development of ectomycorrhizal roots. In *Mycorrhizal symbiosis* (3rd ed., pp. 191–268). Academic Press.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008b). 13 - Orchid mycorrhizas. In S. E. Smith & D. J. B. T.-M. S. (Second E. Read (Eds.), *Mycorrhizal symbiosis* (third, pp. 389–418). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012652840-4/50014-0>
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008c). *Mycorrhizal Symbiosis* (3rd Edition). Academic Press.
- Sneh, B., Burpee, L., & Ogoshi, A. (1991). *Identification of Rhizoctonia species*. APS press.
- Soto Arenas, M. A. (2005). Laelia. In A. M. Pridgeon, P. J. Cribb, M. W. Chase, & F. N. Rasmussen (Eds.), *Genera Orchidacearum vol. 4. Epidendroideae (Part one)* (pp. 265–271). Oxford University Press. Oxford.
- Soto Arenas, M. A., Solano Gómez, R., & Hagsater, E. (2007). Risk of extinction and patterns of diversity loss in mexican orchids. *Lankesteriana*, 7(1–2), 114–121.
- Sreeramanan Subramaniam, Pavallekoodi Gnasekaran, Xavier Rathinam, U. R. S. (2009). A Study on the Use of Organic Additives on the Protocorm-like Bodies (PLBS) Growth of *Phalaenopsis violacea* Orchid. *Journal of Phytology*, 2(1 SE-Research Article).
- Stewart, S. L., & Kane, M. E. (2007). Symbiotic Seed Germination and Evidence for in vitro Mycobiont Specificity in *Spiranthes brevilabris* (Orchidaceae) and Its Implications for Species-Level Conservation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 43(3), 178–186.
- Stone, bacon, & White, J. (2000). An overview of endophytic microbes: Endophytism defined. In *Microbial endophytes* (Vol. 1, pp. 29–33).
- T., M., & M., S. (2018). Vegetative anatomy of the orchid *Bulbophyllum sterile* (Orchidaceae: Epidendroideae). *Lankesteriana*, 18, 13–22.
- Tanner, R. S. (2007). Cultivation of Bacteria and Fungi. In *Manual of Environmental Microbiology* (pp. 69–78). Wiley. <https://doi.org/10.1128/9781555815882.ch6>
- Teixeira da Silva, J. A., Tsavkelova, E. A., Zeng, S., Ng, T. B., Parthibhan, S., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., & Rao, M. V. (2015). Symbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*: fungal and bacterial partners and their influence on

plant growth and development. *Planta*, 242(1), 1–22.
<https://doi.org/10.1007/s00425-015-2301-9>

Utami, E., & Hariyanto, S. (2020). Organic Compounds: Contents and Their Role in Improving Seed Germination and Protocorm Development in Orchids. *International Journal of Agronomy*, 2020, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2020/2795108>

Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3), 243–254.
<https://doi.org/10.1007/s10658-007-9165-1>

Vasudevan, R., & Van Staden, J. (2010). *In vitro* asymbiotic seed germination and seedling growth of *Ansellia africana* Lindl. *Scientia Horticulturae*, 123(4), 496–504.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.11.010>

Velázquez, V. N., Quijano-Avila, J., & Rodríguez-Ávila, N. (2016). Análisis de diferentes sustratos en la germinación y multiplicación *in vitro* de orquídeas silvestres del estado de Campeche. *Revista Del Centro de Graduados e Investigación. Instituto Tecnológico de Mérida*, 31(63), 27–31.

Waes, J. M., & Debergh, P. C. (1986). *In vitro* germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*, 67(2), 253–261. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb02452.x>

Warcup, J. H. (1981). The mycorrhizal relationships of australian orchids. *New Phytologist*, 87(2), 371–381. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1981.tb03208.x>

Waud, M., Brys, R., Van Landuyt, W., Lievens, B., & Jacquemyn, H. (2017). Mycorrhizal specificity does not limit the distribution of an endangered orchid species. *Molecular Ecology*, 26(6), 1687–1701. <https://doi.org/10.1111/mec.14014>

Waud, M., Busschaert, P., Lievens, B., & Jacquemyn, H. (2016). Specificity and localised distribution of mycorrhizal fungi in the soil may contribute to co-existence of orchid species. *Fungal Ecology*, 20, 155–165.
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2015.12.008>

Wu, J. Y., Qin, J., & Zheng, S. Z. (2002). A preliminary study on ingredient of secretion from fungi of orchid mycorrhiza. *Chin J Appl Ecol*, 13, 845–848.

Yagame, T., Yamato, M., Mii, M., & Iwase, K. (2012). Efficient symbiotic germination of *Cephalanthera falcata* *in vitro* by associating with *Ceratobasidium oryzae*: A fungus isolated from a natural habitat of this orchid. *Mycorrhiza*, 22(1), 1–9.

Yang, Y. L., Lai, P. F., & Jiang, S. P. (2008). Research development in *Dendrobium officinale*. *J Shandong Univ TCM*, 32, 82–85.

- Yang, Y. L., Liu, Z. Y., & Zhu, G. S. (2008). Study on symbiotic seed germination of *Pleione bulbocodioides* (Franch) Rolfe. *Microbiology (Reading, England)*, 35, 909–912.
- Zelmer, C. D., Cuthbertson, L., & Currah, R. S. (1996). Fungi associated with terrestrial orchid mycorrhizas, seeds, and protocorms. *Mycoscience*, 37, 439–448.
- Zettler, L. (1997). *Orchid-fungal symbiosis and its value in conservation*. *Mcllvaneia* 13:40–45
- Zettler, L. W., & Corey., L. L. (2018). In: Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols. In *Orchid Mycorrhizal Fungi: Isolation and Identification Techniques*. Springer Protocols Handbooks. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_2.
- Zettler, L. W., Poulter, S. B., McDonald, K. I., & Stewart, S. L. (2007). Conservation-driven Propagation of an Epiphytic Orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a Mycorrhizal Fungus. *HortScience*, 42(1), 135–139. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.1.135>
- Zhang, J., Wang, C., Guo, S., Chen, J., & Xiao, P. (1999). [Studies on the plant hormones produced by 5 species of endophytic fungi isolated from medicinal plants (Orchidacea)]. *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 21(6), 460–465.
- Zhang, S., Yang, Y., Li, J., Qin, J., Zhang, W., Huang, W., & Hu, H. (2018). Physiological diversity of orchids. *Plant Diversity*, 40(4), 196–208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.06.003>
- Zhang, Y., Li, Y.-Y., Chen, X.-M., Guo, S.-X., & Lee, Y.-I. (2020). Effect of different mycobionts on symbiotic germination and seedling growth of *Dendrobium officinale*, an important medicinal orchid. *Botanical Studies*, 61(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s40529-019-0278-6>