



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SOBRE LOS
RECURSOS NATURALES

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN MICORRÍZICA DE LA ORQUÍDEA AMENAZADA *Rhynchostele cervantesii*

TESIS

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Opción: Recursos Bióticos

PRESENTA

M.C. ROSA ELIA MAGAÑA LEMUS

Directores:

Dra. Irene Ávila Díaz

Dr. Raymond L. Tremblay Lalande.

Comité Tutorial

Dr. Gerardo Vázquez Marrufo. FMVZ-UMSNH

Dra. Yvonne Herreras Diego. Facultad de Biología-UMSNH

Dr. Roberto Garibay Orijel. Instituto de Biología-UNAM

Morelia, Michoacán. Febrero de 2026

Declaración de originalidad

El presente documento es resultado del trabajo original de investigación realizado por la M.C. Rosa Elia Magaña Lemus, estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, desarrollado en apego a los más altos estándares éticos establecidos por esta institución.

Todos los datos presentados en esta tesis (salvo aquellos señalados explícitamente en el texto) fueron obtenidos por la M.C. Rosa Elia Magaña Lemus durante su permanencia en el Doctorado en Ciencias Biológicas, bajo la dirección de la Dra. Irene Ávila Díaz y la codirección del Dr. Raymond L. Tremblay Lalande.

Morelia, Michoacán, a 12 de febrero de 2026

Estudiante: M.C. Rosa Elia Magaña Lemus _____

Directora: Dra. Irene Ávila Díaz _____

Codirector: Dr. Raymond L. Tremblay Lalande _____

Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo, en primer lugar, a mis hijos, Ayxax y Sofía, quienes han sido mi mayor inspiración y el motor que me impulsó a perseverar en cada etapa de este camino. Su amor, apoyo y aliento fueron fundamentales para alcanzar este logro, que también les pertenece.

A mis padres, Eduardo Magaña Barrientos y Georgina Lemus Orozco, por su amor incondicional, confianza y respaldo constante, no solo durante la realización de este proyecto, sino a lo largo de toda mi vida. Gracias por ser el pilar que me ha permitido llegar hasta aquí.

A mi hermana, Tania Lisbeth Magaña Lemus, por su apoyo incondicional, fortaleza y compañía en los momentos más difíciles. Su presencia fue esencial para la culminación de este sueño.

De manera especial, a mi tío Isaac, por motivarme siempre a superarme, a creer en mí misma y a no abandonar mis metas. A mis tías Olga y Beda, por su apoyo constante y significativo durante todo este proceso, el cual fue clave para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) (Becario No. 598609) por el apoyo brindado a través de la beca que hizo posible el desarrollo de este proyecto. También expreso mi gratitud a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), así como a la Coordinación de la Investigación Científica y a la Facultad de Biología, donde recibí la formación académica que sustenta este trabajo.

A la Dra. Irene Ávila Díaz, directora de esta tesis, le expreso mi más profundo agradecimiento por concebir la idea para desarrollar el presente trabajo, así como por su compromiso y apoyo constante en la planeación, organización y realización de este trabajo. Gracias por su confianza a lo largo de tantos años, por contribuir de manera tan significativa a mi crecimiento académico y personal, por compartir generosamente su conocimiento y experiencia, y, sobre todo, por transmitirme el amor y la pasión por las orquídeas.

Mi más sincero agradecimiento al D.C. Raymond L. Tremblay Lalande, cuyo respaldo fue fundamental para llevar a cabo este trabajo. Su acompañamiento y enseñanzas marcaron una diferencia significativa en el desarrollo del proyecto y en mi formación académica y personal.

Agradezco también al Dr. Gerardo Vázquez Marrufo por su valioso apoyo en la realización de una parte esencial de esta investigación, así como por sus observaciones, las cuales enriquecieron significativamente este trabajo. Gracias también por haberme recibido en su laboratorio con tanta amabilidad.

Al Dr. Roberto Garibay Orijel, gracias por todas sus valiosas aportaciones, por sus comentarios siempre acertados, y por su guía que me ayudó a crecer como estudiante de doctorado e investigadora.

A la Dra. Yvonne Herreras Diego, mi más sincero agradecimiento por sus ideas y sugerencias, que como siempre, enriquecieron de manera significativa este trabajo de tesis. Siempre es un placer poder coincidir con usted.

Al Dr. Leonel López Toledo, por su valioso apoyo en los trámites administrativos al inicio del Doctorado, así como por sus acertadas aportaciones y comentarios siempre constructivos, los cuales contribuyeron de manera significativa al desarrollo y fortalecimiento de este trabajo.

Agradezco profundamente a la Comunidad Indígena de Santiago Tingambato por su disposición y apoyo para la realización de este trabajo en el predio de Tenderio, así como por su apertura y participación en los talleres de educación ambiental que tuvimos el privilegio de impartirles.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología de la Conservación Vegetal, especialmente a la M.C. Marisol Sales Figueroa y al M.C. Jorge de Jesús Arriaga Cardona, gracias por su invaluable apoyo tanto en campo como a lo largo de todo este proceso. Un agradecimiento muy especial a Tonatiuh Gutiérrez Zavala por su gran ayuda con las figuras incluidas en este trabajo y por tantos momentos compartidos llenos de risas.

Asimismo, agradezco al equipo del Laboratorio de Biotecnología y Conservación Microbiana, donde fui recibida con calidez durante gran parte del proceso. En particular, a la D.C. Karla Ivonne González Martínez, al M.C. Edgar Villa Villa y a la Biol. Sayra Gutiérrez Sánchez, por compartir sus conocimientos en biología molecular con tanta disposición, amabilidad y, sobre todo, paciencia.

TABLA DE CONTENIDO

I. RESUMEN GENERAL	1
II. ABSTRACT	3
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	6
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVOS	17
V.I General	17
V.II Particulares	17
V.III ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO	18
CAPÍTULO I	19
Presence of orchid mycorrhizal fungi at two developmental stages under different climatic conditions in <i>Rhynchostele cervantesii</i> (Orchidaceae).....	19
1. RESEÑA.....	19
CAPÍTULO II	21
La asociación micorrícica impacta la adecuación de las orquídeas epífitas <i>in</i> <i>situ</i>	21
Mycorrhizal association impacts fitness of epiphytic orchids <i>in situ</i>	21
1. RESUMEN.....	21
1. ABSTRACT	23
2. INTRODUCCIÓN	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Sitio y sistema de estudio	30
3.2 Micorrización y factores abióticos	31
3.3 Éxito reproductivo y viabilidad de semillas	32
3.4 Crecimiento y supervivencia	33
3.5 Análisis estadísticos	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1 Relación de la micorrización y los factores abióticos con el éxito reproductivo y viabilidad de semillas	34

4.2 Relación de la micorrización y de factores abióticos en el crecimiento y tamaño de <i>R. cervantesii</i>	37
4.3 Relación de la micorrización y factores abióticos con el tamaño de <i>R. cervantesii</i>	39
4.4 Relación de la micorrización y los factores abióticos con la sobrevivencia	44
5. DISCUSSION	44
5.1 Relación de la micorrización con el éxito reproductivo	44
5.2 Micorrización de los adultos y calidad de las semillas	45
5.3 Relación de la micorrización y de factores abióticos con el crecimiento de <i>R. cervantesii</i>	46
5.4 Relación de la micorrización y factores abióticos con el tamaño	48
5.5 Relación de la micorrización y los factores abióticos con la sobrevivencia	49
6. CONCLUSIONES	50
7. LITERATURA CITADA.....	51
CAPÍTULO III	60
Diversidad y dinámica de hongos cultivables asociados a las raíces de la orquídea endémica y amenazada <i>Rhynchostele cervantesii</i>	60
Diversity and dynamic of cultivable fungi associated with the roots of the endemic and endangered orchid <i>Rhynchostele cervantesii</i>	60
1. RESUMEN.....	60
1. ABSTRACT	61
2. INTRODUCCIÓN	62
3. MATERIALES Y MÉTODOS	64
Sistema de estudio	64
Sitio de estudio y toma de muestras.....	65
Extracción de ADN y ensayos de PCR.....	67
Análisis filogenéticos	68
Determinación de AIA (Ácido Indolacético)	69
4. RESULTADOS	69

Diversidad de hongos endófitos y micorrízicos de <i>R. cervantesii</i>	69
Dinámica de los hongos endófitos de <i>Rhynchostele cervantesii</i>	74
Determinación de AIA (Ácido Indolacético)	77
5. DISCUSIÓN	77
Diversidad de hongos asociados a las raíces de <i>R. cervantesii</i>	77
Dinámica de los hongos asociados a las raíces de <i>R. cervantesii</i>	80
6. CONCLUSIONES	82
7. LITERATURA CITADA.....	82
CAPÍTULO IV	95
Efecto de los hongos asociados a la raíz de <i>Rhynchostele cervantesii</i> en la germinación de sus semillas y desarrollo de plántulas	95
1. RESUMEN	95
1. ABSTRACT	96
2. INTRODUCCIÓN	97
3. MATERIALES Y MÉTODOS	101
3.1 Especie de estudio	101
3.2 Efecto de hongos endófitos o putativos micorrízicos aislados de <i>R. cervantesii in situ</i> , en la germinación de semillas.....	102
3.3 Efecto de los aislados en el desarrollo de plántulas de <i>R. cervantesii</i>	104
3.4 Análisis estadísticos	107
4. RESULTADOS	108
4.1 Efecto de los aislados en la germinación de semillas de <i>R. cervantesii</i>	108
4.2 Efecto de los aislados en el desarrollo de plántulas de <i>R. cervantesii</i>	109
5. DISCUSIÓN	119
6. CONCLUSIONES	123
7. LITERATURA CITADA.....	124
VI. DISCUSIÓN GENERAL.....	134

VII. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES	142
VIII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	144

I. RESUMEN GENERAL

Las micorrizas orquideoides son asociaciones simbióticas entre especies de Orchidaceae y hongos de las divisiones Basidiomycota y Ascomycota, caracterizadas por la formación de pelotones (enrollamientos hifales) en las raíces. Esta asociación es esencial para la germinación de semillas y el establecimiento de plántulas en su entorno natural. Aunque su función en orquídeas adultas aún no se comprende por completo, se sugiere que también desempeñan roles importantes en esta etapa. Por ello, es fundamental investigar estas asociaciones en distintas etapas ontogénicas de las orquídeas. El objetivo general del presente trabajo fue evaluar la dinámica de la asociación micorrízica en *Rhynchostele cervantesii* a lo largo de diferentes etapas de su ciclo de vida. Los objetivos particulares fueron: 1. Evaluar la micorrización de *R. cervantesii* en dos categorías de desarrollo en condiciones climáticas contrastantes. 2. Determinar la interacción entre el grado de colonización micorrízica y los factores abióticos con el éxito reproductivo, la viabilidad de las semillas, el desarrollo de las plantas y la supervivencia *in situ* de *R. cervantesii* como sistema modelo. 3. Analizar la diversidad y la dinámica de hongos endófitos cultivables y potencialmente micorrízicos asociados a *R. cervantesii*. 4. Analizar el efecto de hongos aislados de pelotones obtenidos *in situ* de raíces de *R. cervantesii* *in situ* sobre la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas. Para lograr el primer objetivo, en el capítulo 1 de esta tesis, se evaluó el grado de micorrización en plantas juveniles y adultas *in situ* en el Predio de Tenderio, Tingambato, Mich. bajo condiciones climáticas contrastantes (época húmeda y época seca), ya que no se encontraron suficientes protocormos o plántulas en el sitio de muestreo. Se analizó el porcentaje de micorrización, el estado de digestión de los pelotones (intactos, en estado de digestión y digeridos), y la micorrización en diferentes tipos de raíz (en contacto con el sustrato o aérea). Para cubrir el segundo objetivo (Capítulo 2), se evaluó la micorrización en 100 plantas *in situ* (50 adultas y 50 juveniles), registrando variables ambientales como luz, humedad relativa y temperatura, y correlacionando tanto la micorrización como los factores abióticos con el crecimiento, la viabilidad de semillas y la supervivencia de plantas *in situ*, durante dos años. Con el fin de alcanzar el tercer objetivo (Capítulo 3), se colectaron

cuatro protocormos y dos raíces por planta, de 12 juveniles y 12 adultas, bajo condiciones climáticas contrastantes. En condiciones de asepsia, se aislaron los hongos a partir de pelotones (método de un solo pelotón) y se identificaron molecularmente mediante los primers ITS-1 e ITS-4. Finalmente, se analizó la dinámica de los hongos según las categorías de desarrollo de la planta y las condiciones climáticas estudiadas. Por último, en el Capítulo 4, los hongos aislados y una vez identificados, se seleccionaron los géneros *Apiospora*, *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Didymella*, *Nemania*, *Penicillium* y *Xylaria*, debido a su asociación documentada con orquídeas o a su capacidad de producir compuestos potencialmente beneficiosos, así como dos cepas no identificadas (J11S y J19S) para evaluar sus posibles efectos sobre *R. cervantesii*. Estos hongos se utilizaron para la germinación simbiótica de semillas y evaluar el efecto de estos en el desarrollo de plántulas de *R. cervantesii* (cultivadas *in vitro* por un periodo de cinco años), mediante el registro del crecimiento de las partes aéreas y raíces, así como la formación y crecimiento de nuevos brotes. Los principales resultados fueron los siguientes: En el capítulo 1, el porcentaje de micorrización varió entre categorías de desarrollo y condiciones climáticas, con valores más altos en plantas adultas durante la época húmeda (41%). El promedio de pelotones intactos fue significativamente mayor en época húmeda (18) que en época seca (0.5), mientras que los pelotones digeridos fueron más abundantes en época seca (10.5) que en época húmeda (0.5). Las raíces en contacto con el sustrato (32%) presentaron una mayor micorrización que las aéreas (28%). Para el Capítulo 2, se encontró una relación positiva entre la micorrización y la viabilidad de semillas, y la sobrevivencia *in situ*, así como con el crecimiento y el tamaño de las plantas, especialmente en juveniles. La humedad relativa favoreció el desarrollo de plantas mientras que la temperatura tuvo un efecto negativo. En el Capítulo 3, se identificaron diez OTUs diferentes de hongos micorrízicos putativos pertenecientes a la división Ascomycota, distribuidos en cinco órdenes (Amphisphaeriales, Diaporthales, Eurotiales, Pleosporales y Xylariales) y en ocho géneros: *Apiospora*, *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Didymella*, *Leptosphaeria*, *Nemania*, *Penicillium* y *Xylaria*. Finalmente, en el Capítulo 4, de los hongos aislados e identificados en esta investigación,

Nemania diffusa y *Diaporthe* sp. promovieron la germinación a los 90 días, con 44% y 12%, respectivamente, mientras que *Penicillium* sp. y la cepa no identificada J11S estimularon el crecimiento. *Diaporthe* sp. indujo la formación y crecimiento de nuevos brotes. Se concluye que la micorrización en *R. cervantesii* ocurre en todas las categorías de desarrollo, incluso en plantas adultas, lo que sugiere su importancia a lo largo de todo el ciclo de vida. La humedad influye en el porcentaje de micorrización y en la digestión de los pelotones, por lo que las sequías podrían afectar negativamente esta simbiosis. Los efectos de la micorrización y de los factores climáticos fueron más evidentes en plantas juveniles, que, al igual que las adultas, mostraron mayor viabilidad de semillas y mayor sobrevivencia cuando presentaron mayor micorrización. Los hongos aislados (putativos micorrízicos), han sido reportados como endófitos en orquídeas. Se observó un reemplazo parcial de estos hongos entre categorías de desarrollo y condiciones climáticas, destacando las cepas J11S y *Penicillium* sp. en el desarrollo de plántulas, y a *Diaporthe* sp. como un hongo clave en la germinación y el crecimiento de brotes. Estos hallazgos resaltan la importancia de continuar con estudios funcionales, especialmente en escenarios de estrés hídrico.

Palabras clave: categorías de desarrollo, hongos endófitos, pelotones.

II. ABSTRACT

Orchid mycorrhizas are symbiotic associations between Orchidaceae species and fungi from the Basidiomycota and Ascomycota divisions, characterized by the formation of hyphal coils (pelotons) in the roots. This association is essential for seed germination and seedling establishment in natural habitats. Although their role in adult orchids is not yet fully understood, they are thought to play important functions at this stage as well. Therefore, it is crucial to investigate these associations across different ontogenetic stages of orchids. The general objective of this study was to evaluate the dynamics of the mycorrhizal association in *Rhyncho스테le cervantesii* throughout different stages of its life cycle. Specific objectives included: (1)

assessing mycorrhization in *R. cervantesii* at two developmental stages under contrasting climatic conditions; (2) determining the interaction between the degree of mycorrhizal colonization and abiotic factors with reproductive success, seed viability, plant growth, and *in situ* survival of *R. cervantesii* as a model system; (3) analyzing the diversity and dynamics of cultivable and potentially mycorrhizal endophytic fungi associated with *R. cervantesii*; and (4) evaluating the effect of fungi isolated from pelotons in roots of *R. cervantesii in situ* on seed germination and seedling development. To achieve the first objective, Chapter 1 assessed mycorrhization in juvenile and adult plants *in situ* at the Tenderio site, Tingambato, Michoacán, under contrasting climatic conditions (wet and dry seasons), due to the scarcity of protocorms or seedlings at the sampling site. The percentage of mycorrhization, peloton digestion state (intact, partially digested, and fully digested), and mycorrhization in different root types (substrate-contacting or aerial) were analyzed. For the second objective (Chapter 2), mycorrhization was evaluated *in situ* in 100 plants (50 adult and 50 juvenile), recording environmental variables (light, relative humidity, and temperature) and correlating mycorrhization and abiotic factors with plant growth, seed viability, and survival over two years. To achieve the third objective (Chapter 3), four protocorms and two roots per plant were collected from 12 juvenile and 12 adult plants under contrasting climatic conditions. Fungi were aseptically isolated from pelotons using the single-peloton method and molecularly identified using ITS-1 and ITS-4 primers. The dynamics of the fungi were then analyzed according to plant developmental stage and climatic conditions. In Chapter 4, the isolated fungi were identified, and representatives of the genera *Apiospora*, *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Didymella*, *Nemania*, *Penicillium* and *Xylaria* were selected due to their documented association with orchids or potential production of beneficial compounds, along with two unidentified strains (J11S and J19S) to evaluate their potential effects on *R. cervantesii*. These fungi were used for symbiotic seed germination and to assess their effects on the development of *R. cervantesii* seedlings cultivated *in vitro* for five years, monitoring the growth of aerial and root parts as well as the formation and growth of new shoots. Key results indicated that mycorrhization varied between developmental stages and climatic

conditions, with higher values in adult plants during the wet season (41%). The average number of intact pelotons was significantly higher in the wet season (18) than in the dry season (0.5), whereas digested pelotons were more abundant in the dry season (10.5) than in the wet season (0.5). Substrate-contacting roots (32%) showed higher mycorrhization than aerial roots (28%). Mycorrhization was positively correlated with seed viability, *in situ* survival, and plant growth, particularly in juvenile plants. Relative humidity favored plant development, while high temperature had a negative effect. Ten putative mycorrhizal fungal OTUs were identified, all belonging to Ascomycota, distributed across five orders (Amphisphaeriales, Diaporthales, Eurotiales, Pleosporales, and Xylariales) and eight genera (*Apiospora*, *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Didymella*, *Leptosphaeria*, *Nemania*, *Penicillium* and *Xylaria*). Among the isolated fungi, *Nemania diffusa* and *Diaporthe* sp. promoted seed germination at 90 days (44% and 12%, respectively), while *Penicillium* sp. and the unidentified strain J11S stimulated seedling growth, and *Diaporthe* sp. induced the formation and growth of new shoots. In conclusion, mycorrhization in *R. cervantesii* occurs across all developmental stages, including adults, suggesting its importance throughout the life cycle. Humidity influences both the percentage of mycorrhization and the rate of peloton digestion, suggesting that drought could negatively affect this symbiosis. The effects of mycorrhization and climatic factors were more pronounced in juvenile plants, which, like adults, showed higher seed viability and survival when mycorrhization was greater. The isolated fungi, reported as orchid endophytes, showed partial replacement across developmental stages and climatic conditions, highlighting the roles of J11S and *Penicillium* sp. in seedling development and *Diaporthe* sp. as a key fungus for germination and shoot growth. These findings emphasize the importance of continued functional studies, particularly under water-stress conditions.

Keywords: developmental stages, endophytic fungi, pelotons.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las orquídeas son un grupo monofilético, taxonómicamente complejo, su clasificación ha sido motivo de debate desde hace mucho tiempo (Hágsater *et al.* 2015). Las primeras clasificaciones de esta familia se basaron en características morfológicas, sobre todo de la flor, principalmente en el grado de organización de las polinias (Chase *et al.* 2003); sin embargo, esta forma de clasificar a las orquídeas causó muchos problemas, ya que orquídeas con una morfología floral similar no están relacionadas genéticamente, debido a que la convergencia floral es muy común en este grupo de plantas (Hagsater *et al.* 2015). El desarrollo de técnicas moleculares ha sido una herramienta muy importante en la clasificación de estas plantas, mediante las cuales se ha logrado tener un mejor conocimiento de las relaciones filogenéticas y así establecer una clasificación más precisa de las orquídeas. Actualmente la familia Orchidaceae se divide en cinco subfamilias: Apostasioideae, Cypripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae y Epidendroideae (Chase *et al.* 2015).

La familia de las orquídeas es una de las más grandes y diversas (Zhang *et al.* 2018), que ha logrado colonizar prácticamente todos los ambientes, con excepción de las zonas polares y de los desiertos muy extremos, por lo que es considerada una familia cosmopolita (Castillo-Pérez y Álvarez 2019). En el mundo se han registrado alrededor de 28,000 especies de orquídeas, divididas en 736 géneros (Chase *et al.* 2015, Christenhusz y Byng 2016, Zhang *et al.* 2018), encontrando la mayor riqueza de especies en las zonas tropicales (más del 50%), sobre todo en Centro y Sudamérica (Chase *et al.* 2015, Givnish *et al.* 2016, Nauray-Huari 2013, Rzedowski y Rzedowski 2005, Silva-Freitas *et al.* 2020).

Las orquídeas tienen una gran importancia ecológica porque proporcionan refugio a pequeños animales que viven cerca de sus raíces, principalmente hormigas, artrópodos, anfibios y aves pequeñas (Ceja *et al.* 2010). Además, algunas especies ofrecen recompensa nutricional como néctar, seudonéctar y polen, a sus polinizadores (abejas, moscas, mariposas, entre otros) a cambio de servicios de polinización. Algunas especies de *Maxillaria* producen ceras y resinas, las cuales se

sugiere son utilizadas por algunas avispas y abejas para la construcción de panales (Dondon *et al.* 2002), también ofrecen fragancias florales a los polinizadores, como en el caso del género *Gongora* que presenta interacciones estrechas con abejas Euglosinas macho, los cuales visitan las flores y recolectan compuestos químicos volátiles que recolectan en sus patas traseras, para usarlos posteriormente durante el cortejo a las hembras (Hetherington-Rauth y Ramírez 2016).

Estas plantas presentan asociaciones muy estrechas con diversos organismos, tal es el caso de la asociación que forman con hongos endófitos y micorrízicos para su germinación y el establecimiento de plántulas (Selosse *et al.* 2002, Ávila-Díaz *et al.* 2013).

Además de su importancia ecológica, las orquídeas tienen una gran relevancia económica, ya que los integrantes de esta familia han sido ampliamente utilizados desde tiempos remotos. Existen registros del uso de estas plantas desde la época precolombina, en donde se utilizaba un mucílago extraído de los pseudobulbos de algunas especies y se empleaba como pegamento (Hágsater *et al.* 2015, Emeterio-Lara *et al.* 2016, Cox-Tamay y Cervantes-Urbe 2016). Además, se les ha utilizado en ceremonias religiosas, como la celebración de Semana Santa (Solano-Gómez *et al.* 2010, Hágsater *et al.* 2015, Cox-Tamay y Cervantes-Urbe 2016) y como plantas medicinales para tratar diferentes padecimientos (Cruz-García y Balam-Narváez 2013, Cox-Tamay y Cervantes-Urbe 2016); se reporta que aproximadamente el 2% (600 especies) de las orquídeas a nivel mundial son utilizadas con estos fines (Teoh 2016). Posiblemente el uso más ampliamente conocido es como ornamentales, por la gran belleza de sus flores, por lo que es una industria muy desarrollada y se han creado una gran cantidad de híbridos y variedades nuevas. El comercio de orquídeas genera enormes ganancias económicas, tan solo en 2010 el mercado mundial de plantas y flores de orquídeas superó los mil millones de dólares (AOS 2011). Por todo lo anterior las orquídeas se consideran un recurso biótico no maderable de gran valor (Hagsater *et al.* 2005, Soto-Arenas *et al.* 2007, Emeterio-Lara *et al.* 2016; Wida-Utami y Hariyanto 2019).

En México se han registrado aproximadamente 1,260 especies y 170 géneros, siendo el porcentaje de endemismos en especies del 40%, lo que representa 504 especies aproximadamente (Espejo-Serna 2012, Hágsater *et al.* 2015, Castillo-Pérez *et al.* 2018). Mientras que en Michoacán existen aproximadamente 260 especies (Zamudio y Carranza 2019), de las cuales 16 son endémicas del país (Castillo-Pérez *et al.* 2018). Si bien México presenta una gran diversidad y un gran número de endemismos de orquídeas, muchas de estas especies se encuentran en la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) en alguna categoría de riesgo; según la actualización de 2019, se enlista un total de 191 especies, de las cuales 75 son endémicas y 19 se encuentran en Michoacán (SEMARNAT 2010, SEMARNAT 2019, Zamudio y Carranza 2019).

Dentro de las orquídeas incluidas en la Norma Oficial Mexicana se encuentran especies epífitas; tal es el caso de *Rhynchostele cervantesii*, una especie endémica de México que ha sido ampliamente extraída de sus poblaciones silvestres, ya que es conocida internacionalmente en horticultura y posiblemente las plantas que se cultivan en otros países fueron extraídas de nuestro país. Asimismo, en algunas regiones de México se comercializa una gran cantidad de plantas silvestres durante la época decembrina, que son utilizadas para la decoración de iglesias y nacimientos; todo esto aunado a la transformación y/o alteración de su hábitat ha disminuido drásticamente sus poblaciones naturales en los últimos años, razón por la cual se encuentra amenazada (Soto-Arenas y Solano-Gómez 2007). Esta especie se distribuye en los estados de Guerrero, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Veracruz. En Michoacán se distribuye en la región de la Sierra Madre del Sur y el Eje Neovolcánico Transversal (SNIB 2016).

La gran diversidad y distribución de las orquídeas, mencionadas anteriormente, se han atribuido en parte a la evolución, la cual involucra la interacción de varios factores, como la selección natural, las restricciones filogenéticas y la deriva génica (Steiner *et al.* 2011). En la familia Orchidaceae, la selección natural es una de las fuerzas que forman los rasgos que afectan gran cantidad de interacciones que presentan estas plantas con diversos organismos, por ejemplo, en el caso de

orquídeas epífitas, poseen especificidad con sus árboles soporte o forófitos (Fay *et al.* 2015) y con la cobertura y diversidad de briofitas (García-Cancel *et al.*, 2013). En la relación con sus polinizadores, se ha demostrado que los rasgos que afectan la especificidad de los polinizadores han sido moldeados en parte, por la selección natural (Cozzolino y Widmer 2005, Benítez-Vieyra *et al.* 2006, Tremblay *et al.* 2005). En cuanto a su relación con los hongos micorrízicos, se sugiere que esta puede estar influida por la selección natural. Aunque aún no se ha demostrado plenamente la especificidad en la elección del socio fúngico (Otero *et al.* 2005, Otero *et al.* 2011), se plantea que esta también podría constituir un rasgo evolutivo, más allá de la sola disponibilidad de hongos en el ambiente, debido a que en poblaciones simpátricas de orquídeas se han observado asociaciones con distintos hongos (Shefferson *et al.* 2007). No obstante, se requieren estudios adicionales para confirmar estas hipótesis. Lo que sí se ha podido comprobar es que existen restricciones filogenéticas que inciden en la especificidad de las micorrizas en orquídeas; es decir, los hongos micorrízicos evolucionan para diferir entre especies de orquídeas a medida que aumenta la distancia filogenética entre las plantas (Jacquemyn *et al.* 2011, Shefferson *et al.* 2007, Shefferson *et al.* 2010).

La deriva génica también actúa sobre la dependencia de los polinizadores y la limitación de la polinización; es decir, la baja producción de frutos, que, junto con la dispersión de semillas anemócoras a grandes distancias (favorecida por su pequeño tamaño), podría favorecer la formación de poblaciones separadas (Tremblay *et al.* 2005, Waterman y Bidartondo 2008). Se ha sugerido que la deriva génica también actúa sobre la relación orquídea-micorriza. Como se mencionó anteriormente, las orquídeas presentan diferentes grados de especificidad con sus hongos micorrízicos, lo cual influye de manera indirecta en la diversidad de estas plantas, al determinar los patrones de distribución de las orquídeas. Por lo anterior, una distribución irregular de los hongos micorrízicos, aunada a una alta especificidad de las micorrizas, podrían estar favoreciendo las poblaciones tan dispersas, muy comunes en la familia Orchidaceae. Esto, su vez, puede favorecer la fijación de ciertos genes que determinan dicha especificidad (Waterman y Bidartondo 2008). Tanto los polinizadores como los hongos micorrízicos pueden

favorecer tamaños de población efectivos pequeños y un flujo génico reducido estableciendo las condiciones ideales para el modelo de especiación de orquídeas basado en la selección por deriva génica (Tremblay *et al.* 2005).

Se ha reportado que la colonización del hábito epífita es otro factor que ha favorecido la gran diversidad de orquídeas, ya que los géneros epífitos son significativamente más ricos en especies que los géneros terrestres. Colonizar este tipo de hábitat requiere de un complejo conjunto de adaptaciones para hacer frente a las condiciones adversas del medio; además, el ambiente epífita se describe como fragmentado debido a la distancia entre forófitos, lo cual podría estar promoviendo la especiación alopátrica. La especificidad del forófito por parte de las orquídeas también podría favorecer la especiación (Gravendeel *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2015c). Por todo lo anterior, las orquídeas son consideradas un grupo de “modelo ideal” en cuanto a la investigación sobre la biodiversidad y la evolución de las interacciones (Selosse 2014).

Se sugiere, aunque no se ha comprobado, que esta asociación es de gran importancia a lo largo del ciclo de vida de las orquídeas (Favre-Godal *et al.* 2020, Rammitsu *et al.* 2019, Waud *et al.* 2017). Dicho ciclo de vida consta de cinco etapas: semilla, protocormo, plántula, juvenil y adulta.

Siendo las semillas de las orquídeas tan pequeñas que prácticamente no tienen endospermo, el embrión es diminuto e indiferenciado y carece de sustancias de reserva. Por tal razón, para germinar, las semillas de orquídeas necesitan una asociación con hongos micorrízicos (Parthibhan *et al.* 2017, Shubha y Srinivas 2017, Qin *et al.* 2019). Al encontrar las condiciones adecuadas de humedad, temperatura y luz, así como el hongo micorrízico adecuado, el embrión comienza a ensancharse, formando una estructura globular llamada protocormo, una característica distintiva de las orquídeas. Dentro del protocormo, el hongo se desarrolla formando pelotones que la planta digiere (Hagsater *et al.* 2015). Posteriormente comienzan a desarrollarse las primeras hojas, tallos, rizoides y/o raíces, etapa conocida como plántula. En dicha etapa, la colonización migra hacia las raíces, convirtiéndose así en una micorriza en sentido estricto, y esta relación resulta sumamente importante

para el establecimiento de plántulas en sus hábitats naturales (Ávila-Díaz *et al.* 2013, Dearnaley *et al.* 2016, Khamchatra *et al.* 2016). Durante la etapa juvenil, las orquídeas presentan hojas, tallos y raíces completamente desarrollados, aunque aún carecen de estructuras reproductoras. Al alcanzar la etapa adulta (producción de flores), se ha sugerido que las asociaciones con hongos micorrízicos establecidas en etapas tempranas pueden mantenerse hasta esta etapa (Favre-Godal *et al.* 2020, Rammitsu *et al.* 2019), lo cual es fundamental para la adquisición de agua y nutrientes (Selosse y Martos 2014, Dearnaley *et al.* 2016, Ruibal *et al.* 2017, Schweiger *et al.* 2018, Favre-Godal *et al.* 2020). Finalmente, con la polinización y la producción de frutos y semillas, se completa el ciclo de vida.

Es en las raíces de las orquídeas donde se hospedan a los hongos simbios, formadores de micorrizas. La anatomía básica de las raíces de las orquídeas consiste en un cilindro vascular central, una endodermis, el córtex, que constituye la mayor parte del volumen de la raíz, la exodermis, encargada de permitir el paso de agua del exterior hacia la raíz, y finalmente, la epidermis, que es la parte más externa (Hágsater *et al.* 2005). Los hongos formadores de micorrizas penetran las paredes celulares y forman enrollamientos hifales llamados pelotones (Peterson *et al.* 1996, Selosse *et al.* 2011, Hágsater *et al.* 2005, Zettler y Corey 2018, Yeh *et al.* 2019), cuya función es realizar el intercambio de nutrientes entre planta y hongo, a través de las membranas celulares (Waterman y Bidartondo 2008, Dearnaley *et al.* 2016, Banda-Sánchez *et al.* 2020) y dicha asociación es fundamental para la preservación de orquídeas en sus hábitats naturales (Dearnaley *et al.* 2017).

Existen trabajos en orquídeas adultas en los que se ha estudiado la micorrización de diferentes especies, tanto terrestres como epífitas y litófitas, reportando en general la presencia de hongos micorrízicos con diferentes grados de colonización en las especies analizadas. Sathiyadash *et al.* (2012), trabajaron con un total de 31 especies en Western Ghats (India), de las cuales 22 son epífitas, 8 terrestres y 1 tanto epífita como litófita; todas presentaron distintos grados de micorrización. Por otro lado, se reporta una mayor presencia de pelotones intactos en época húmeda, en comparación con la época seca, para tres especies de orquídeas epífitas:

Epidendrum stamfordianum, *Erycina crista-galli* y *Stelis quadrifida* (Bertolini *et al.* 2014).

Es muy importante conocer la identidad de los hongos que participan en estas interacciones para poder realizar un análisis más profundo de la diversidad de estos, y así tener una mejor comprensión de la manera en que orquídeas y hongos interactúan (Li *et al.* 2021). Mediante diferentes métodos, como el aislamiento de hongos de tejidos completos o de secciones de tejido, el aislamiento de siembra y trampeo *in situ* y el aislamiento de un solo pelotón, el cual se considera el método más preciso y confiable (Zettler *et al.* 2005, Batty *et al.* 2006, Zi *et al.* 2014, Zettler y Corey 2018, Li *et al.* 2021) se han logrado aislar los hongos micorrízicos de diversas especies tanto terrestres como epífitas, tales como *Disa bracteata* y *Pyrorchis nigricans* (Bonnardeaux *et al.* 2007), *Dendrobium* (Parthibhan *et al.* 2017) y *Dendrobium aphyllum* (Zi *et al.* 2014). Mientras que, gracias al desarrollo de técnicas moleculares, se ha obtenido información importante sobre la diversidad, la estructura de la comunidad, los patrones y los mecanismos moleculares de esta relación. Además, se han logrado identificar los hongos micorrízicos de alrededor de 200 géneros de orquídeas mediante el análisis de estos hongos bajo la influencia de varios factores, como las etapas de desarrollo, los hábitats o las escalas espacio-temporales (Li *et al.* 2021, Ma *et al.* 2015).

Mediante la determinación molecular se ha establecido que estas asociaciones son comunes con hongos de las divisiones Ascomycota y Basidiomycota, y con menor frecuencia con hongos de las divisiones Chytridiomycota, Glomeromycota, Zygomycota o Mucoromycota (Li *et al.* 2021, Martos *et al.* 2012, Novotná *et al.* 2018, Qin *et al.* 2019). Se han registrado un total de 17 familias de Basidiomycetes y cinco familias/géneros de Ascomycetes como micorrizas de orquídeas (Dearnaley *et al.* 2012, Li *et al.* 2021). Dentro de los Ascomycetes el orden Helotiales es el más reportado como micorrízico o putativo micorrízico de orquídeas (Ávila-Díaz *et al.* 2013, Khamchatra *et al.* 2016), mientras que para Basidiomycetes los más reportados son géneros pertenecientes a las familias Tulasnellaceae y Ceratobasidiaceae del orden Cantharellales, la familia Serendipitaceae del orden

Sebacinales (Li *et al.* 2021) y la familia Thelephoraceae, del orden Thelephorales (Duffy *et al.* 2019, Li *et al.* 2021). Tal es el caso de las orquídeas epífitas *Taeniophyllum glandulosum* y *Epidendrum marsupiale* asociadas a hongos micorrízicos pertenecientes a la división Basidiomycota (familias Ceratobasidiaceae y Serendipitaceae) (Herrera *et al.* 2019, Rammitsu *et al.* 2019).

Se han realizado diversos trabajos sobre la asociación micorrízica que mantienen las orquídeas con ciertos hongos, los cuales se han centrado principalmente en el estudio de la asociación micorrízica en la etapa de germinación de semillas (Shubha y Srinivas 2017, Qin *et al.* 2019), en el establecimiento de plántulas (Ávila-Díaz *et al.*, 2013, Dearnaley *et al.* 2016, Khamchatra *et al.* 2016), así como en el aislamiento y identificación genético molecular de las especies fúngicas (Cevallos *et al.* 2018, Qin *et al.* 2019, Favre-Godal *et al.* 2020) estos estudios se han realizado para establecer el estado micorrízico en diferentes especies de orquídeas adultas (Bertolini *et al.* 2014, Sathiyadash *et al.* 2012). Sin embargo, de acuerdo con nuestro conocimiento, no existen trabajos en los que comprueben la relación entre los hongos asociados a las raíces (incluidos los micorrízicos) y su posible papel a lo largo del ciclo de vida de las orquídeas, por lo que se considera muy importante llevar a cabo estudios sobre esta relación en diferentes etapas de desarrollo de estas plantas.

Estudiar la asociación micorrízica de orquídeas en distintas categorías de desarrollo y bajo diferentes condiciones puede ayudar a establecer su posible relación a lo largo de todo el ciclo de vida, así como a identificar distintos patrones de micorrización bajo diferentes condiciones. En específico, es importante trabajar dichos aspectos con *Rhynchostele cervantesii*, ya que, como se mencionó, es endémica de nuestro país y se encuentra como amenazada en la Norma Oficial Mexicana, NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT 2010). Mediante el estudio de los hongos micorrízicos de *R. cervantesii* se pueden plantear estrategias de manejo adecuadas, al incrementar la germinación *in vitro* de sus semillas y la de otras especies, así como incrementar el éxito en la aclimatación o el establecimiento *ex vitro* de plántulas germinadas *in vitro*, favoreciendo su propagación a gran escala.

Esto permitiría reducir la presión que se ejerce sobre las poblaciones silvestres de esta especie al ofrecer plantas de calidad en el mercado, y así desalentar la extracción de plantas silvestres (Ávila-Díaz *et al.* 2009).

En el capítulo 1 se presenta la determinación del estado de micorrización de *R. cervantesii* en dos etapas de desarrollo y bajo condiciones climáticas contrastantes. Para ello, se realizó la colecta de raíces en 50 plantas juveniles y en 50 plantas adultas, así como la evaluación del porcentaje de micorrización tanto en raíces en contacto con el sustrato como en aéreas. También se analizó la micorrización en las diferentes zonas de las raíces (basal, media y apical). Adicionalmente, se registró el estado de digestión de los pelotones, clasificándolos en intactos, en proceso de digestión o completamente digeridos.

En el capítulo 2 se analiza la interacción entre el estado de micorrización y los factores ambientales en el desarrollo *in situ* de *R. cervantesii in situ*. Para ello, se evaluó el efecto de la micorrización (promedio de pelotones por planta) y de factores abióticos, como la humedad, la luz y la temperatura sobre el éxito reproductivo de la especie, incluyendo la viabilidad de las semillas, así como el crecimiento y la supervivencia *in situ* de las plantas.

El capítulo 3 se centra en la caracterización de la diversidad y dinámica de los hongos endófitos y micorrízicos asociados a *R. cervantesii*. Para ello, se identificaron molecularmente de los hongos presentes en sus raíces. El aislamiento de los hongos se llevó a cabo mediante el método de un solo pelotón, seguido de resiembras sucesivas hasta obtener cultivos puros con potencial micorrízico. La extracción de ADN se realizó mediante el método de fenol-cloroformo y la amplificación por PCR se efectuó con los iniciadores ITS-1 e ITS-4.

En el capítulo 4 se evalúa el efecto de los hongos asociados a las raíces de *R. cervantesii* sobre la germinación de sus semillas y el desarrollo de plántulas. Para ello, se llevó a cabo la germinación simbiótica *in vitro* con algunos de los hongos identificados en el capítulo anterior. Con el fin de evaluar su efecto en plántulas, se emplearon individuos desarrollados *in vitro* bajo condiciones de cultivo controladas durante cinco años. Las inoculaciones se realizaron con alícuotas de 1×10^5

esporas por cada hongo (incluyendo *Apiospora* sp., *Aspergillus* sp., *Diaporthe* sp., *Didymella* sp., *Nemania diffusa*, *Penicillium* sp. y *Xylaria* sp.).

IV. HIPÓTESIS

La comunidad de hongos endófitos y micorrízicos putativos asociados a *Rhynchostele cervantesii* es dinámica, presenta taxones específicos y generalistas, y es relevante durante todo el ciclo de vida de esta especie en condiciones climáticas contrastantes.

V. OBJETIVOS

V.I General

Evaluar la dinámica de la asociación micorrízica en *Rhynchostele cervantesii* a lo largo de diferentes etapas de su ciclo de vida.

V.II Particulares

V.II.I Evaluar la micorrización de *R. cervantesii* en dos categorías de desarrollo en condiciones climáticas contrastantes.

V.II.II Determinar la interacción entre el grado de colonización micorrízica y los factores abióticos, con el éxito reproductivo, la viabilidad de las semillas, el desarrollo de las plantas y la sobrevivencia *in situ* de *R. cervantesii* como sistema modelo.

V.II.III Analizar la diversidad y la dinámica de los hongos endófitos cultivables y potencialmente micorrízicos asociados a *R. cervantesii*.

V.II.IV Analizar el efecto de hongos aislados de pelotones obtenidos de raíces de *R. cervantesii in situ* sobre la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas *in vitro*.

V.III ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO

Para llevar a cabo los objetivos del presente trabajo se planteó la siguiente estrategia general:

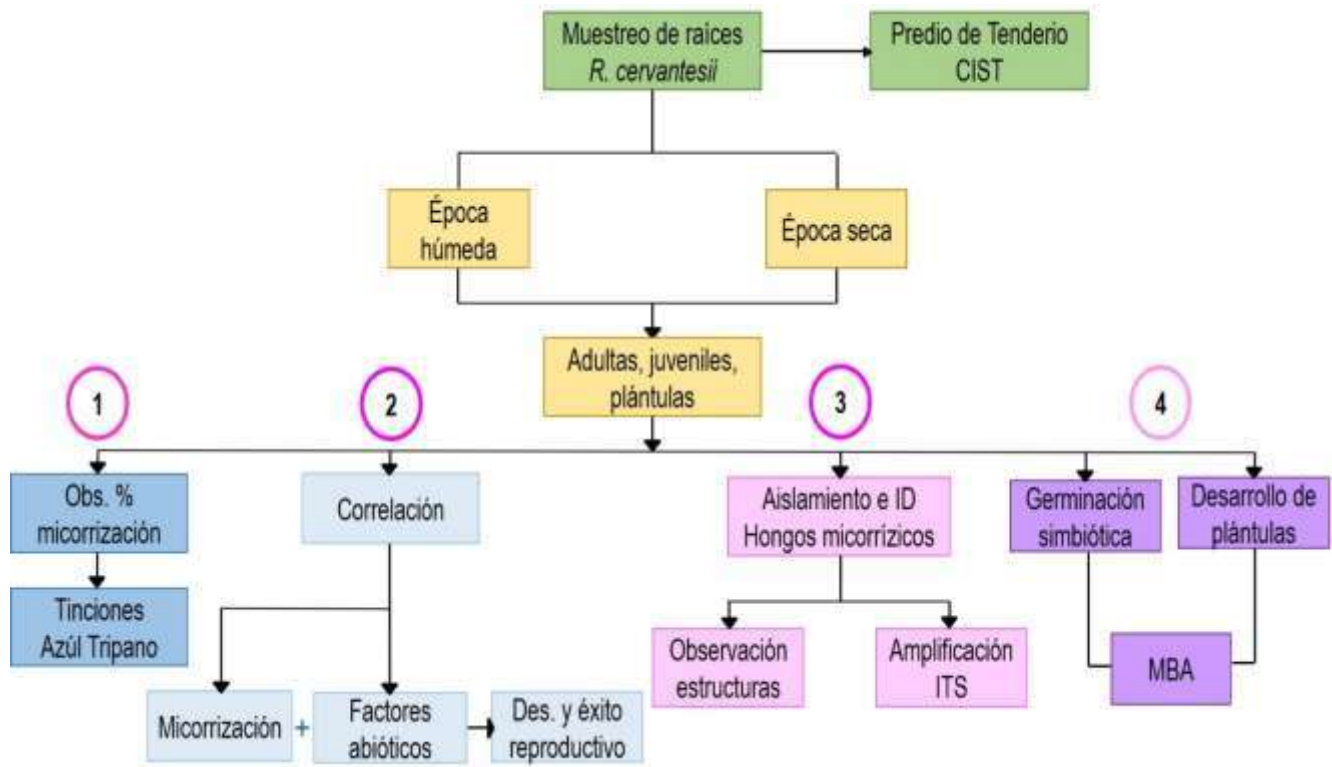


Figura 1. Estrategia General de Trabajo. CIST= Comunidad Indígena de Santiago Tingambato. Obs. % micorrización= observaciones del porcentaje de micorrización. Fac. ambientales= factores ambientales. Des. y exit. rep= desarrollo y éxito reproductivo. ID= identificación. Des. plántulas= desarrollo de plántulas. MBA= Medio Básico de Avena.

CAPÍTULO I

Presence of orchid mycorrhizal fungi at two developmental stages under different climatic conditions in *Rhynchostele cervantesii* (Orchidaceae)

Rosa Elia Magaña Lemus¹, Irene Ávila Díaz^{2*}, Roberto Garibay Orijel³

* NOTA: La versión en inglés de este trabajo fue enviada y aceptada para su publicación a Acta Botánica Mexicana. Enviado: 04-febrero-2025, aceptado: en espera.

1. RESEÑA

El estudio evalúa la micorrización en la orquídea epífita *Rhynchostele cervantesii*, especie endémica de México y catalogada como amenazada, con el objetivo de analizar la presencia y grado de asociación micorrízica en dos categorías de desarrollo (juvenil y adulta) y bajo condiciones climáticas contrastantes durante dos años. La investigación aborda un vacío de conocimiento importante, ya que la mayoría de los estudios sobre micorrización en orquídeas se centran en las etapas tempranas del desarrollo, mientras que su relevancia en plantas adultas, especialmente epífitas, ha sido poco documentada.

El trabajo se desarrolló en un bosque mesófilo de montaña en Michoacán, donde se muestrearon 100 plantas. Se evaluaron el porcentaje de micorrización, el número y estado de digestión de los pelotones, así como su distribución según el tipo (aérea o en contacto con el sustrato) y la zona (apical, media y basal) de la raíz. Los resultados muestran que la micorrización estuvo presente tanto en plantas juveniles como adultas, sin diferencias significativas entre ambas, lo que sugiere que esta asociación simbiótica es importante a lo largo de todo el ciclo de vida de *R. cervantesii*.

Se observó una clara influencia de la estacionalidad, ya que los mayores porcentajes de micorrización y la mayor abundancia de pelotones intactos se registraron durante las épocas húmedas, mientras que en las épocas secas

predominó la presencia de pelotones digeridos. Esto indica que, bajo condiciones de menor disponibilidad de agua, las plantas podrían depender más de los hongos micorrízicos para la obtención de nutrientes. Asimismo, la micorrización fue mayor en raíces en contacto con el sustrato y en la parte basal de la raíz, patrón consistente con lo reportado para otras orquídeas epífitas.

En conjunto, el estudio demuestra que la micorrización en *R. cervantesii* está fuertemente influenciada por la disponibilidad de agua y no se limita a las primeras etapas de desarrollo. Se concluye que el incremento en la frecuencia de sequías, asociado al cambio climático, podría afectar negativamente esta asociación, lo que tiene implicaciones directas para la conservación de esta orquídea amenazada. El trabajo aporta información relevante para el manejo y conservación de especies epífitas y destaca la importancia de considerar las interacciones planta-hongo en estrategias de conservación.

CAPÍTULO II

La asociación micorrícica impacta la adecuación de las orquídeas epífitas *in situ*

Mycorrhizal association impacts fitness of epiphytic orchids *in situ*

Rosa Elia Magaña Lemus¹, Irene Ávila Díaz², Raymond L. Tremblay³

¹ Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales INIRENA, UMSNH. Laboratorio de la Conservación Vegetal. Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, UMSNH.0212484e@umich.

² Facultad de Biología de la UMSNH. Laboratorio de la Conservación Vegetal. Profesor-Investigador Tit. B. UMSNH. irene.avila@umich.mx

³ Department of Biology, University of Puerto Rico, 17 Avenida Universidad Suite 1701, San Juan, Puerto Rico, 00925-2537, U.S.A.

* NOTA: La versión en inglés de este trabajo fue enviada para su posible publicación a PeerJ. Enviado: 05-diciembre-2025.

1. RESUMEN

La asociación evolutiva entre las micorrizas y las plantas tiene una larga historia, con efectos sobre el desarrollo vegetal que pueden ser positivos, negativos o neutros. En el caso de algunas epífitas, como ciertas orquídeas, la interacción con los hongos micorrízicos es esencial para la germinación de las semillas, ya que estas dependen de los nutrientes proporcionados por los hongos. Durante las primeras etapas del desarrollo (protocormos y plántulas), esta asociación es obligatoria. Aunque se ha sugerido que la relación sigue siendo importante en etapas posteriores, aún existe poca evidencia concluyente. Comprender esta relación es fundamental para determinar cómo las micorrizas contribuyen al crecimiento, la reproducción y la supervivencia de las plantas bajo condiciones ambientales naturales. Este estudio investigó la importancia ecológica de las asociaciones micorrízicas en la orquídea epífita *Rhynchostele cervantesii* como sistema modelo. Para evaluar el impacto de esta relación más allá de las etapas iniciales, se analizó la correlación entre la densidad de pelotones (estructuras de

colonización micorrízica en las raíces), sus características morfológicas (intactos o degradados), factores abióticos y el desarrollo de individuos juveniles y adultos de *R. cervantesii* bajo condiciones naturales. La micorrización se evaluó *in situ* en 100 plantas (50 adultas y 50 juveniles) durante las épocas húmeda (EH) y seca (ES) a lo largo de dos años, mediante el registro de la presencia y densidad de pelotones en las raíces. Adicionalmente, se midieron variables ambientales como la luz, la humedad relativa y la temperatura, las cuales se correlacionaron con la presencia y densidad de pelotones. La relación entre la micorrización y el éxito reproductivo, la viabilidad de las semillas, el crecimiento, el tamaño y la supervivencia de las plantas fue analizada estadísticamente. Las plantas con mayores densidades de pelotones presentaron una mayor viabilidad de semillas, así como un mayor crecimiento y supervivencia, particularmente en individuos juveniles. La temperatura afectó negativamente el desarrollo de las plantas, mientras que la humedad relativa tuvo una influencia positiva en ambas etapas del ciclo de vida. Las plantas juveniles mostraron una mayor dependencia de las interacciones micorrícicas que las plantas adultas. Los hongos micorrícicos desempeñan un papel fundamental en la promoción de la viabilidad de las semillas, el crecimiento y la supervivencia de *R. cervantesii in situ*. Su influencia se extiende más allá de la etapa de germinación, lo que resalta la importancia ecológica a largo plazo de la simbiosis micorrízica en las orquídeas epífitas.

Palabras clave: Etapas de desarrollo, factores abióticos, pelotones degradados, orquídeas epífitas, aptitud, supervivencia *in situ*, asociación micorrízica, *Rhynchostele cervantesii*.

1. ABSTRACT

The evolutionary association between mycorrhizae and plants has a long history, with effects on plant development that can be positive, negative, or neutral. In the case of some epiphytes, such as certain orchids, the interaction with mycorrhizal fungi is essential for seed germination, as these seeds rely on nutrients provided by the fungi. During the early developmental stages (protocorms and seedlings), this association is obligatory. Although it has been suggested that the relationship remains important in later stages, substantial evidence is still lacking. Understanding this relationship is crucial to determine how mycorrhizae contribute to plant growth, reproduction, and survival under natural environmental conditions. This study investigated the ecological significance of mycorrhizal associations in the epiphytic orchid *Rhynchoστεle cervantesii* as a model system. To evaluate the impact of this relationship beyond the initial stages, the correlation between peloton density (mycorrhizal colonization structures in the roots), their morphological characteristics (intact or degraded), abiotic factors, and the development of both juvenile and adult individuals of *R. cervantesii* under natural conditions was studied. Mycorrhization was assessed *in situ* in 100 plants (50 adults and 50 juveniles) during both the wet (WS) and dry (DS) seasons over two years by surveying peloton presence and density in the roots. Additionally, measurements of environmental variables such as light, relative humidity, and temperature were recorded and correlated with peloton presence and densities. The relationship between mycorrhization with reproductive success, seed viability, plant growth, size, and survival were statistically analyzed. Plants with higher peloton densities exhibited increased seed viability, growth, and survival, particularly in juvenile individuals. Temperature negatively affected plant development, while relative humidity had a positive influence across both life stages. Juvenile plants showed stronger dependence on mycorrhizal interactions than adults. Mycorrhizal fungi play a vital role in promoting seed viability, the growth, and survival of *R. cervantesii in situ*. Their influence extends beyond the seed germination stage, underscoring the long-term ecological importance of mycorrhizal symbiosis in epiphytic orchids.

Keywords: Developmental stages, abiotic factors, degraded pelotons, epiphytic orchids, fitness, *in situ* survival, mycorrhizal association, *Rhynchostele cervantesii*.

2. INTRODUCCIÓN

La asociación micorrízica entre plantas y hongos -una de las simbiosis más antiguas conocidas- ha desempeñado un papel clave en la evolución y adaptación de las plantas a diversos ambientes al mejorar la absorción de minerales (Smith & Read, 2008; Hoysted *et al.*, 2018). De acuerdo con Brundrett y Tedersoo (2018), este proceso evolutivo ocurrió en tres grandes oleadas: la primera, hace aproximadamente 400 millones de años, dio lugar a la aparición de las micorrizas arbusculares (MA), consideradas la forma más ancestral de micorriza; la segunda oleada, hace alrededor de 100 millones de años durante el Cretácico, marcó el origen de las micorrizas de las orquídeas (MO); y la tercera, desde el Paleógeno hasta la actualidad, se caracteriza por una mayor especialización radicular, la diversificación de los tipos de hongos micorrícicos y la adaptación a ambientes variables.

Actualmente, se proponen dos hipótesis principales sobre la evolución de la simbiosis micorrízica. La primera plantea que los hongos micorrícicos evolucionaron directamente a partir de hongos saprótrofos, pasando de un estilo de vida de vida libre a uno mutualista (Floudas *et al.*, 2012; Kohler *et al.*, 2015). La segunda, conocida como la “Hipótesis de la Sala de Espera” (*Waiting Room Hypothesis*), sugiere una trayectoria evolutiva más gradual, en la cual los hongos colonizaron inicialmente las raíces como endófitos, habitando los tejidos vegetales sin causar daño ni formar micorrizas activas (es decir, una interacción neutral). Esta fase endofítica se interpreta como una etapa intermedia que pudo haber facilitado la transición de la saprotrofia a la simbiosis mutualista (Selosse *et al.*, 2009; Selosse *et al.*, 2022).

La “Hipótesis de la Sala de Espera” propone que el endofitismo representa un estado evolutivo intermedio entre los estilos de vida saprótrofo y micorrízico, permitiendo la incorporación gradual de los hongos como socios simbióticos por parte de las plantas (Selosse *et al.*, 2007; Thoen *et al.*, 2020). Esta hipótesis complementa la idea de un origen saprótrofo de los hongos micorrícicos al resaltar el papel históricamente subestimado del endofitismo (Selosse *et al.*, 2022). Un

ejemplo claro de esta transición se encuentra en el género *Mycena*, que incluye especies capaces de actuar como saprótrofas, como endófitas en diversas plantas, o incluso como socios micorrízicos de orquídeas (Boberg *et al.*, 2008; Ogura-Tsujita *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012; Lorberau *et al.*, 2017; Osono, 2020; Thoen *et al.*, 2020).

Dentro del marco de la Hipótesis de la Sala de Espera, la mixotrofia en Orchidaceae se interpreta como una fase transicional en la evolución de sus estrategias nutricionales. Esta hipótesis sugiere que las asociaciones micorrícicas funcionales evolucionaron gradualmente a partir de interacciones endofíticas no mutualistas, permitiendo que ciertas orquídeas complementen la fotosíntesis con carbono derivado de sus simbiontes fúngicos (Selosse *et al.*, 2022). La mixotrofia -o micohéterotrofia parcial- se considera un estado nutricional intermedio entre la autotrofia estricta y la micoheterotrofia completa. Esta condición permite que orquídeas fotosintéticas obtengan carbono de sus hongos micorrízicos incluso en la etapa adulta (Dearnaley, 2007; Selosse & Martos, 2014), ofreciendo una ventaja adaptativa en hábitats con baja disponibilidad de luz, como los sotobosques densos o los ambientes epífitos (Girlanda *et al.*, 2006; Lallemand *et al.*, 2019).

La asociación entre las orquídeas y los hongos micorrízicos se considera una de las simbiosis más significativas dentro de esta familia de plantas, ya que muchas de las características distintivas de las orquídeas se atribuyen a esta relación, la cual posiblemente también ha contribuido a la notable diversificación de la familia Orchidaceae (Waterman & Bidartondo, 2008). Por otro lado, Suárez *et al.* (2016) sugieren que las micorrizas podrían desempeñar un papel más importante en la coexistencia que en la especiación, ya que reportaron una baja especificidad fúngica en el género *Teagueia*, donde una sola especie de orquídea puede asociarse con múltiples linajes micorrízicos ampliamente distribuidos. De manera similar, Ackerman *et al.* (2025) señalan que no todas las orquídeas forman asociaciones micorrícicas especializadas; algunas especies establecen relaciones generalistas.

Las orquídeas han desarrollado ciertos rasgos evolutivos como resultado de su relación con los hongos micorrízicos (Rasmussen & Rasmussen, 2014). Entre estos

rasgos se encuentra el desarrollo tardío -o incluso la ausencia total- de estructuras fotosintéticas en muchas especies, ya que obtienen carbono de los hongos y son aclorofílicas durante las primeras etapas de desarrollo (Yagame *et al.*, 2012). Otro rasgo es la ausencia de endospermo en las semillas, aunque estas suelen contener una pequeña cantidad de aceite, lo que da lugar a semillas extremadamente pequeñas (Arditti & Ghani, 2000). La ventaja de este tamaño reducido de las semillas podría haber facilitado una mayor dispersión y un mayor contacto con sitios adecuados para la germinación (Rasmussen & Rasmussen, 2014). Para asegurar el éxito reproductivo, las orquídeas también han evolucionado mecanismos como las polinias (masas de polen), flores bilateralmente simétricas y estructuras florales altamente especializadas (por ejemplo, la columna), que influyen en el comportamiento de los polinizadores (Rasmussen & Rasmussen, 2014). La polinización en las orquídeas generalmente da lugar a la producción de frutos que contienen un gran número de semillas, que puede variar entre 50 y 4,000,000 por fruto (Arditti & Ghani, 2000).

Debido a las mínimas reservas nutritivas de sus semillas, el reclutamiento de plántulas en las orquídeas es notablemente bajo. En consecuencia, las orquídeas dependen de su asociación con hongos micorrícicos para la germinación de las semillas y el establecimiento temprano de las plántulas en hábitats naturales (McCormick & Jacquemyn, 2014; Rasmussen *et al.*, 2015). También se ha sugerido, aunque no se ha demostrado de manera concluyente, que las orquídeas adultas pueden continuar dependiendo en distintos grados de esta simbiosis para la adquisición de agua y nutrientes (Favre-Godal *et al.*, 2020).

Una de las hipótesis que explica la presencia continua de hongos micorrícicos en las raíces de las orquídeas es que estos hongos confieren resistencia frente a patógenos (Yang *et al.*, 2018). Además, pueden producir reguladores del crecimiento vegetal, los cuales son críticos para el desarrollo (Tsavkelova *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2019). Sin embargo, esta relación tan estrecha también introduce vulnerabilidad: las orquídeas con asociaciones fúngicas altamente especializadas suelen ser muy sensibles a los cambios ambientales, lo que puede afectar

negativamente no solo a la planta, sino también a su socio fúngico (Djordjevic *et al.*, 2020).

Los factores abióticos como la luz, la temperatura y la humedad influyen significativamente en el crecimiento, el desarrollo y la historia de vida de las orquídeas (Rasmussen *et al.*, 2015; Tremblay *et al.*, 2010). En el caso de las orquídeas epífitas, estos factores determinan en gran medida los patrones de distribución a lo largo de las ramas y troncos de los árboles hospederos, o forófitos (Yulia & Yanti, 2011), en función de la variación en la luz y la humedad (Kusumastuti *et al.*, 2021).

Identificar los factores bióticos y abióticos que influyen en el desarrollo, el éxito reproductivo y la supervivencia de las orquídeas *in situ*, especialmente aquellas con hábito de crecimiento epífito como *Rhynchostele cervantesii*, es fundamental. Estas especies enfrentan condiciones microclimáticas extremas y variaciones en las propiedades fisicoquímicas de sus sustratos (es decir, los forófitos), lo que afecta la disponibilidad de agua y nutrientes (Rasmussen & Rasmussen, 2018). Estudios previos han demostrado que variables abióticas como la humedad relativa y la intensidad lumínica son críticas para el establecimiento de diversas especies epífitas del género *Bulbophyllum*, así como para *Dendrobium smillieae* y *Bulbophyllum baileyi* en sus hábitats naturales (Kusumastuti *et al.*, 2021; Sujalu *et al.*, 2021). Estas especies, al igual que *R. cervantesii*, presentan crecimiento simpodial y se desarrollan en ambientes con una marcada estacionalidad climática (es decir, periodos húmedos y secos bien definidos). Por lo tanto, los factores abióticos pueden desempeñar un papel decisivo en el desarrollo y la persistencia de *R. cervantesii*.

Los factores bióticos, en particular la colonización micorrízica, desempeñan un papel clave en la biología de las orquídeas epífitas. Esta asociación simbiótica ha sido reconocida como uno de los elementos más críticos para la germinación, el desarrollo y la supervivencia de las orquídeas, ya que facilita la adquisición de agua y nutrientes (Selosse & Martos, 2014; Dearnaley *et al.*, 2016; Ruibal *et al.*, 2017; Schweiger *et al.*, 2018; Favre-Godal *et al.*, 2020). Dado el papel central de los

pelotones fúngicos como los principales sitios de transferencia de nutrientes en las micorrizas de orquídeas (Dearnaley *et al.*, 2016), una mayor abundancia de estas estructuras puede representar una superficie funcional ampliada para el intercambio simbiótico (Perotto & Balestrini, 2024). En consecuencia, se espera que los individuos con mayor densidad de pelotones presenten una mayor aptitud ecológica y potencialmente evolutiva.

También se ha propuesto que los patrones de micorrización varían con el tamaño de la planta o el estadio ontogenético, siendo los individuos en etapas tempranas - como los juveniles- más dependientes de la simbiosis micorrízica que las plantas maduras (Bertolini *et al.*, 2014; Ordóñez *et al.*, 2015; Bayman *et al.*, 2016), las cuales pueden adquirir recursos de manera más eficiente mediante la fotosíntesis. En este contexto, se espera que las plantas adultas regulen el uso de los recursos derivados de la micorriza priorizando las funciones reproductivas, de acuerdo con la “hipótesis de la limitación de recursos”. Esta estrategia puede implicar un compromiso entre la inversión en la reproducción y otros procesos fisiológicos, como el crecimiento vegetativo o eventos de floración futuros (Mattila & Kuitunen, 2000; Meléndez-Ackerman *et al.*, 2000).

En conjunto, se propone que el papel de los hongos micorrízicos en las orquídeas, particularmente en las especies epífitas, es crucial no solo durante las primeras etapas del desarrollo, sino a lo largo de todo el ciclo de vida, ya que esta asociación proporciona ventajas adaptativas. Por lo tanto, en este estudio se plantearon las siguientes hipótesis: 1) Las plantas adultas de mayor tamaño pueden no traducir la asociación micorrízica en un mayor crecimiento, ya que los recursos adquiridos podrían destinarse a mejorar la calidad de las semillas y/o la supervivencia. 2) La abundancia de pelotones (es decir, el grado de micorrización en las raíces de la orquídea), junto con los factores abióticos (temperatura, humedad relativa y luz), influye en el crecimiento y el desempeño de la planta. 3) Los individuos en diferentes etapas ontogenéticas (juveniles vs. adultos) pueden presentar patrones micorrízicos distintos; las plantas juveniles, al depender más de recursos externos, podrían beneficiarse en mayor medida de la presencia/densidad de pelotones, mientras que

los adultos, con mayor capacidad fotosintética, podrían mostrar una menor dependencia.

En consecuencia, el objetivo de este estudio fue determinar la interacción entre el grado de colonización micorrízica y los factores abióticos con el éxito reproductivo, la viabilidad de las semillas, el desarrollo vegetal y la supervivencia *in situ* de *Rhynchostele cervantesii* como sistema modelo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sitio y sistema de estudio

El área de muestreo abarca aproximadamente 360 hectáreas y se localiza dentro del Área de Conservación Voluntaria de la Comunidad Indígena de Santiago Tingambato, específicamente en la Propiedad Tenderio (INEGI, 2005).

Rhynchostele cervantesii es una orquídea epífita caracterizada por pseudobulbos ovoides, ligeramente comprimidos (de 0.6 a 3 cm de ancho y de 1 a 6 cm de largo), de color verde oscuro con manchas negras. Sus hojas varían de lanceoladas a elípticas (de 0.7 a 3.7 cm de ancho y de 3.0 a 14 cm de largo), y sus flores, vistosas, son blancas con tonos rosados suaves y líneas marrón-rojizas en la base de los tépalos, que en ocasiones también están presentes en el labelo (de 2.5 a 5 cm de diámetro) (Jiménez-Machorro *et al.*, 1998; Espejo *et al.*, 2002) (Fig. 1a). Esta especie se distribuye en los bosques de la Sierra Madre Oriental, el Eje Volcánico Transmexicano y partes de la Sierra Madre del Sur (SNIB, 2016). Es altamente valorada como planta ornamental a nivel internacional (Soto-Arenas & Solano-Gómez, 2007).



Figura 1. a) Flor de *Rhynchostele cervantesii*; b) Planta adulta marcada en campo; c) Planta juvenil marcada en campo; d) Pelotones intactos (flecha blanca); e) Pelotones degradados (flecha negra).

3.2 Micorrización y factores abióticos

El número promedio de pelotones por planta y el estado de digestión de los pelotones se calcularon bajo condiciones climáticas contrastantes (véase Magaña-Lemus, 2025). Un total de 100 plantas, categorizadas por etapa de desarrollo (50 adultas y 50 juveniles), fueron marcadas y etiquetadas entre octubre y noviembre de 2021 (Fig. 1b, c). Inicialmente también se consideró la inclusión de plántulas; sin embargo, solo se encontraron cuatro individuos en el sitio de muestreo, por lo que fueron excluidos de los análisis posteriores. Las etapas ontogenéticas se definieron siguiendo a Tremblay (2000).

La colonización micorrízica en la región cortical de cada corte transversal de raíz se cuantificó utilizando el método descrito por Rasmussen & Whigham (2002). El porcentaje promedio de micorrización se obtuvo sumando los porcentajes de colonización individuales de cada sección y dividiendo entre el número total de

secciones analizadas. El número promedio de pelotones micorrízicos intactos y degradados se determinó contando el número de pelotones en cada categoría de digestión por sección transversal, y dividiendo el total de pelotones registrados en cada categoría entre el número de secciones evaluadas. Las categorías de digestión de los pelotones se establecieron de acuerdo con Rasmussen & Whigham (2002), clasificando como pelotones intactos (vivos) aquellos con hifas claramente distinguibles y sin signos visibles de digestión (Fig. 1d), y como pelotones degradados (muertos) aquellos con hifas poco definidas o visiblemente descompuestas (Fig. 1e).

El permiso para el muestreo de raíces fue otorgado por la Comunidad Indígena de Santiago Tingambato. El muestreo se realizó con cuidado para minimizar la perturbación de las plantas, y no se observó daño alguno relacionado con el muestreo al concluir el experimento.

La intensidad lumínica, la humedad relativa y la temperatura se midieron para cada planta. La luz se registró con un luxómetro digital (Esteren, modelo HER-410), mientras que la humedad relativa y la temperatura se midieron con un termohigrómetro (Rotate Stock Traceable, modelo 4040CC). Estos parámetros se registraron mensualmente durante un periodo de 18 meses, siempre a la misma hora del día (a partir de las 12:00 p.m., comenzando con la planta número 1) y posteriormente se promediaron.

3.3 Éxito reproductivo y viabilidad de semillas

Para evaluar el éxito reproductivo, se realizaron visitas de campo entre enero y marzo de 2022 y 2023, durante las cuales se registró la producción de flores y frutos. Para cuantificar la producción de frutos, se llevaron a cabo 30 polinizaciones manuales cruzadas, y también se documentó la formación de frutos por polinización natural.

Las cápsulas resultantes tanto de la polinización manual como de la natural se colectaron en ambos años para evaluar la viabilidad de las semillas. Para ello, las semillas se observaron mediante un muestreo aleatorio y el conteo de 100 semillas por cápsula, inmediatamente después de la apertura de las cápsulas. Las

categorías utilizadas para evaluar la viabilidad fueron: testa vacía, embrión deformado, embrión alargado y protocormo 1 (embrión globular dentro de la testa) (Magaña-Lemus *et al.*, 2021).

3.4 Crecimiento y supervivencia

Para evaluar el crecimiento y desarrollo de las plantas marcadas, se registraron los siguientes parámetros durante cada periodo de muestreo: Época Húmeda 1 (EH1) en octubre de 2021, Época Seca 1 (ES1) en mayo de 2022, Época Húmeda 2 (EH2) en septiembre de 2022 y Época Seca 2 (ES2) en mayo de 2023. Los parámetros registrados incluyeron: número total de hojas; largo y ancho de las dos hojas más jóvenes (considerándose la hoja 1 como la más joven y la hoja 2 como la siguiente en edad); número total de pseudobulbos; largo y ancho de los dos pseudobulbos más jóvenes; tamaño del brote más joven; número de raíces; y longitud de las dos raíces más largas. Adicionalmente, el área foliar (hojas 1 y 2) se estimó utilizando la fórmula del área de una elipse ($A = \pi \cdot a \cdot b$), y el área del pseudobulbo (pseudobulbos 1 y 2) mediante la fórmula para un ovoide ($A = \pi \cdot (\text{largo}/2) \cdot (\text{ancho}/2)$). El crecimiento se evaluó a partir de la diferencia en las mediciones entre EH1–ES1 y EH2–ES2, lo que permitió estimar el crecimiento anual y la influencia de la precipitación estacional sobre la abundancia de pelotones. La supervivencia de las plantas se registró de un periodo de muestreo al siguiente.

Al finalizar el experimento, se calculó el promedio del porcentaje de micorrización para todas las plantas, tanto para aquellas que sobrevivieron como para las que murieron. En el caso de las plantas que no sobrevivieron, el promedio se basó en los datos de micorrización registrados en los periodos anteriores. Durante el desarrollo del estudio, algunas plantas fueron extraídas por pobladores locales; estos individuos fueron excluidos de los análisis.

3.5 Análisis estadísticos

Para evaluar la relación entre la micorrización y la viabilidad de las semillas (no viable = 0, viable = 1), así como la supervivencia de las plantas (vivas o muertas), se utilizaron modelos de regresión logística. Para analizar la relación entre la micorrización y la producción de flores y frutos, se aplicó la correlación de rangos

de Spearman. La influencia del promedio de la luz, la humedad relativa y la temperatura sobre la producción de flores y frutos se examinó mediante un modelo de regresión de Poisson. La relación entre la micorrización en *R. cervantesii* y los factores abióticos (temperatura, humedad relativa y luz) con el crecimiento y tamaño de las plantas se evaluó utilizando un modelo de regresión múltiple con una función de distribución beta, dado que las variables de respuesta fueron proporciones y no siguieron una distribución normal. Para determinar qué variables explicaron mejor la variación observada, se realizó una selección de modelos utilizando el Criterio de Información de Akaike corregido (AICc). Los análisis de regresión beta se llevaron a cabo utilizando el paquete betareg (Cribari-Neto y Zeileis, 2010). Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa R, versión 4.2.1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Relación de la micorrización y los factores abióticos con el éxito reproductivo y viabilidad de semillas

4.1.1 Relación del éxito reproductivo con la micorrización

En 2022 se registraron un total de 24 plantas marcadas con varas florales (etapa reproductiva), con una producción total de 47 botones florales, 41 flores y 11 frutos. En 2023, el número total de plantas con escapos florales fue de 21, con una producción de 42 botones, 38 flores y 9 frutos. La producción promedio de flores por planta en ambos años fue de 1.8 (DE= 1.07). La producción natural de frutos fue en promedio de 0.16 frutos por planta (DE= 0.37), mientras que las polinizaciones manuales (polinización cruzada) resultaron en un promedio de 0.29 frutos por planta. La producción de frutos en 2022 fue del 46 % para el tratamiento de polinización cruzada y del 36 % para la polinización natural; mientras que en 2023 la producción de frutos fue del 46 % para la polinización cruzada y del 30 % para la polinización natural (Tabla 1).

La micorrización no se correlacionó con la producción de flores (correlación de rangos de Spearman: $p= 0.055$, $p= 0.716$) ni con la producción de frutos ($p= -0.084$, $p= 0.580$) en ninguno de los años de estudio.

Tabla 1. Producción de frutos de *R. cervantesii* en 2022 y 2023.

Tratamiento	2022			2023		
	n (número de flores)	# de frutos	<i>Fruit set</i> (%)	n (número de flores)	# de frutos	<i>Fruit set</i> (%)
Exocruza	16	7	44	13	6	46
Pol. natural	11	4	36	11	3	27

4.1.2 Relación del éxito reproductivo con los factores abióticos

Ninguno de los factores abióticos se correlacionó con la producción de flores, con los siguientes valores para la luz (modelo de regresión de Poisson: $\beta = -0.0041$, $p = 0.468$), la temperatura (modelo de regresión de Poisson: $\beta = -0.0255$, $p = 0.794$) y la humedad (modelo de regresión de Poisson: $\beta = -0.0369$, $p = 0.242$). De manera similar, no se encontraron correlaciones significativas con la producción de frutos; la luz presentó (modelo de regresión de Poisson: $\beta = 0.0004$, $p = 0.968$), la temperatura (modelo de regresión de Poisson: $\beta = -0.0035$, $p = 0.986$) y la humedad (modelo de regresión de Poisson: $\beta = -0.0445$, $p = 0.486$), en ninguno de los años evaluados.

4.1.3 Relación de la viabilidad de semillas con la micorrización

Para determinar el efecto de la micorrización sobre la viabilidad de las semillas, en 2022 se colectaron ocho frutos en buen estado de los 11 producidos por los tratamientos de polinización, de los cuales tres correspondieron a polinización natural y cinco a exocruzamientos. En 2023, se colectaron siete frutos que no habían sido parcialmente consumidos por depredadores de los nueve producidos, de los cuales tres correspondieron a polinización natural y cuatro a exocruzamientos. Se observó que las plantas con mayor micorrización produjeron frutos con semillas de mayor viabilidad, tanto en los tratamientos de exocruzamiento ($\chi^2 = 133.47$, $gl = 1$, $p < 0.001$) como en la polinización natural o abierta ($\chi^2 = 24.78$, $gl = 1$, $p < 0.001$) (Fig. 2). Dado que la correlación se mantiene al analizar el efecto de la micorrización sobre la viabilidad de las semillas de frutos producidos por polinización natural y cruzada, la Figura 2 muestra la viabilidad de las semillas para ambos tipos de frutos.

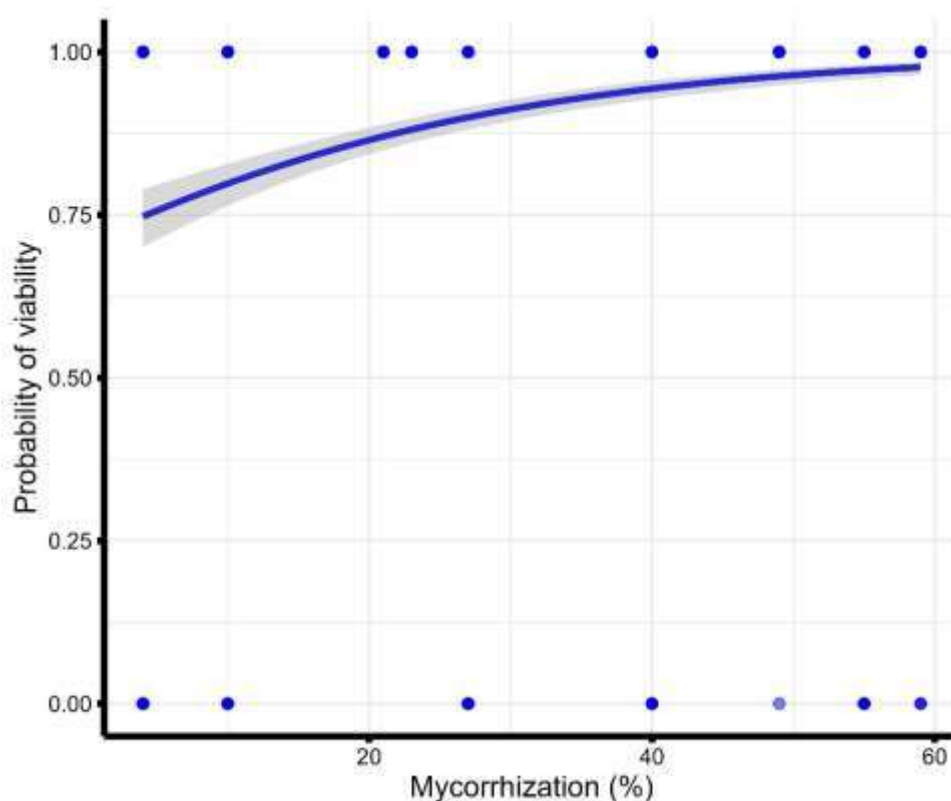


Figura 2. Regresión logística de la relación entre el porcentaje de micorrización y la viabilidad de las semillas de *R. cervantesii*. $\alpha = 0.05$. (OR= 1.05, IC 95%= [1.04, 1.06]).

4.1.4 Relación de la viabilidad de semillas con los factores abióticos

Se registró una correlación positiva entre el promedio de luz y de la humedad relativa con la viabilidad de las semillas, tanto en 2022 (modelo de regresión logística: $\chi^2 = 14.68$, gl = 1, $p < 0.001$; $\chi^2 = 9.42$, gl = 1, $p = 0.0021$, respectivamente) como en 2023 (modelo de regresión logística: $\chi^2 = 50.98$, gl = 1, $p < 0.001$; $\chi^2 = 110.14$, gl = 1, $p < 0.001$, respectivamente; Fig. 3).

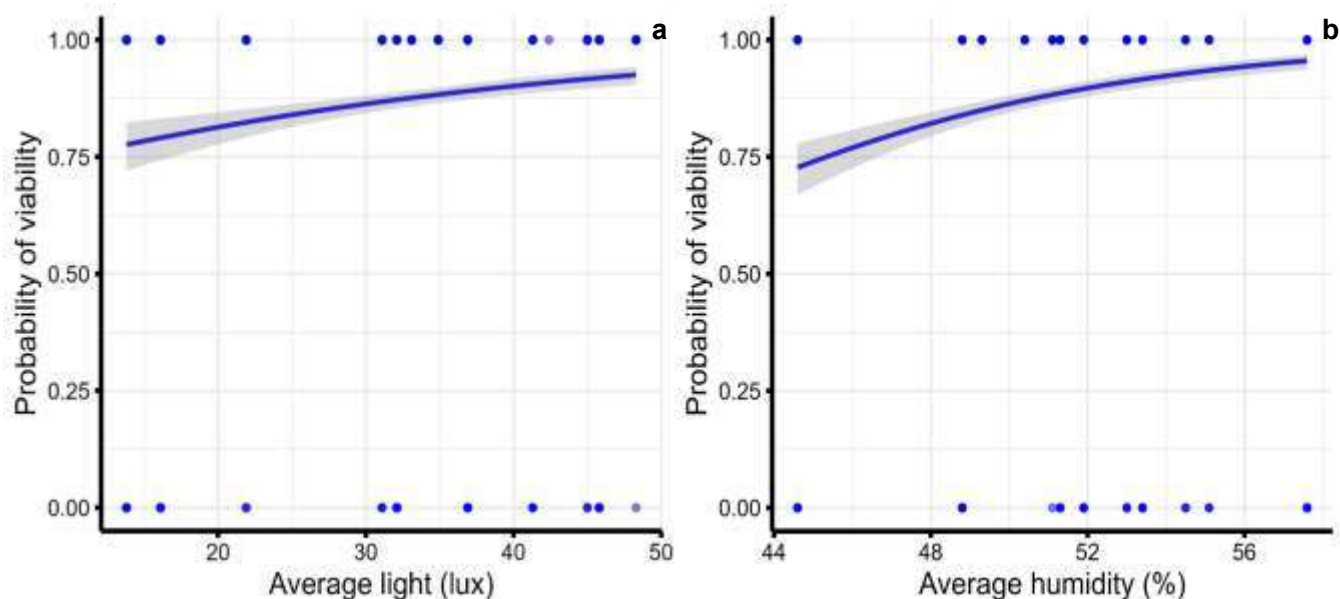


Figura 4. Regresión logística de los factores abióticos sobre la viabilidad de las semillas de *R. cervantesii*. a) Efecto de la luz promedio sobre la viabilidad de las semillas. b) Efecto de la humedad sobre la viabilidad de las semillas. $\alpha = 0.05$. Luz: (OR= 1.038; IC 95% = [1.023, 1.052]). Humedad: (OR= 1.173; IC 95%= [1.125, 1.225]).

4.2 Relación de la micorrización y de factores abióticos en el crecimiento y tamaño de *R. cervantesii*

4.2.1 Relación de la micorrización con el crecimiento

La interacción entre el estado de micorrización y los factores abióticos sobre el crecimiento mostró un efecto únicamente durante el primer periodo analizado (EH1–ES1). En general, los individuos juveniles y adultos de *R. cervantesii* exhibieron diferentes patrones de respuesta.

El número promedio de pelotones por planta (ppp) tuvo un efecto positivo sobre el tamaño del nuevo brote en plantas juveniles ($\beta = 0.0214$, IC 95 % [0.0037, 0.0392], $p = 0.018$) (Fig. 4), mientras que no se observó tal efecto en plantas adultas ($\beta = -0.0036$, IC 95 % = [-0.0108, 0.0035], $p = 0.318$). Estos resultados sugieren que, en plantas juveniles (que son más pequeñas que las adultas), un mayor grado de micorrización puede promover el crecimiento de nuevos brotes.

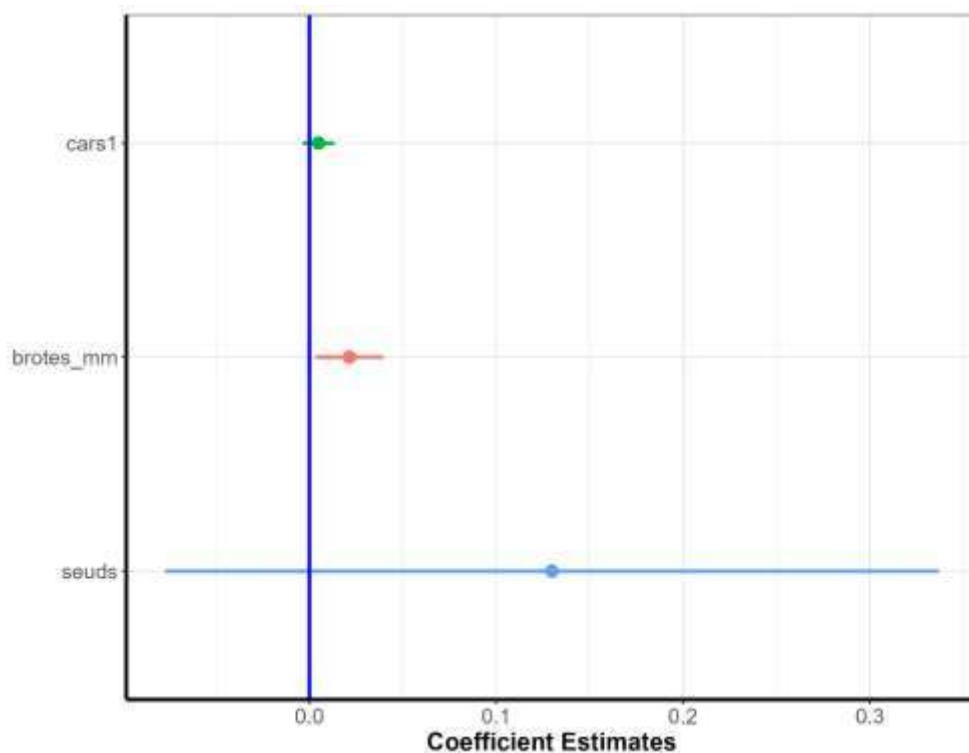


Figura 5. Efecto de la micorrización sobre el crecimiento de *R. cervantesii*. En las plantas juveniles se observó un efecto positivo del número promedio de pelotones por planta sobre el tamaño del nuevo brote ($\beta = 0.0214$, IC 95% [0.0037, 0.0392]). Los intervalos de confianza que se superponen con cero no son significativos. cars1= crecimiento en el área del pseudobulbo 1, pseuds= número de pseudobulbos, shoots= número de nuevos brotes, shoots_mm= tamaño del nuevo brote en milímetros.

4.2.2 Relación de los factores abióticos con el crecimiento

Los parámetros ambientales registrados durante el periodo de estudio fueron los siguientes: los niveles de luz promedio oscilaron entre un máximo de 43.6 lux y un mínimo de 21.3 lux; la temperatura fluctuó entre un máximo de 24.8 °C y un mínimo de 17.6 °C; y la humedad relativa promedió entre un máximo de 73.9 % y un mínimo de 22.9 %. Entre estos factores abióticos, solo la temperatura mostró un efecto negativo significativo sobre el crecimiento, específicamente sobre el número de brotes en plantas juveniles ($\beta = -0.042$, IC 95 % [-0.077, -0.007], $p = 0.019$). Estos resultados indican que las plantas más pequeñas presentaron mayor susceptibilidad y una disminución en el número de brotes con el aumento de la temperatura.

4.3 Relación de la micorrización y factores abióticos con el tamaño de *R. cervantesii*

4.3.1 Relación de la micorrización con el tamaño

El número promedio de pelotones por planta tuvo un efecto positivo sobre el número total de hojas, tanto en plantas juveniles ($\beta = 0.2526$, IC 95 %: [0.1167, 0.3884], $p = 0.0003$) como en plantas adultas ($\beta = 0.1713$, IC 95 %: [0.0586, 0.2840], $p = 0.0029$), pero un efecto negativo sobre el número de brotes en plantas adultas ($\beta = -0.2946$, IC 95 %: [-0.5488, -0.0404], $p = 0.0231$) (Fig. 5a, b). Esto indica que las plantas con un mayor número de pelotones presentaron más hojas. En contraste, las plantas adultas con un mayor número de pelotones tuvieron menos brotes.

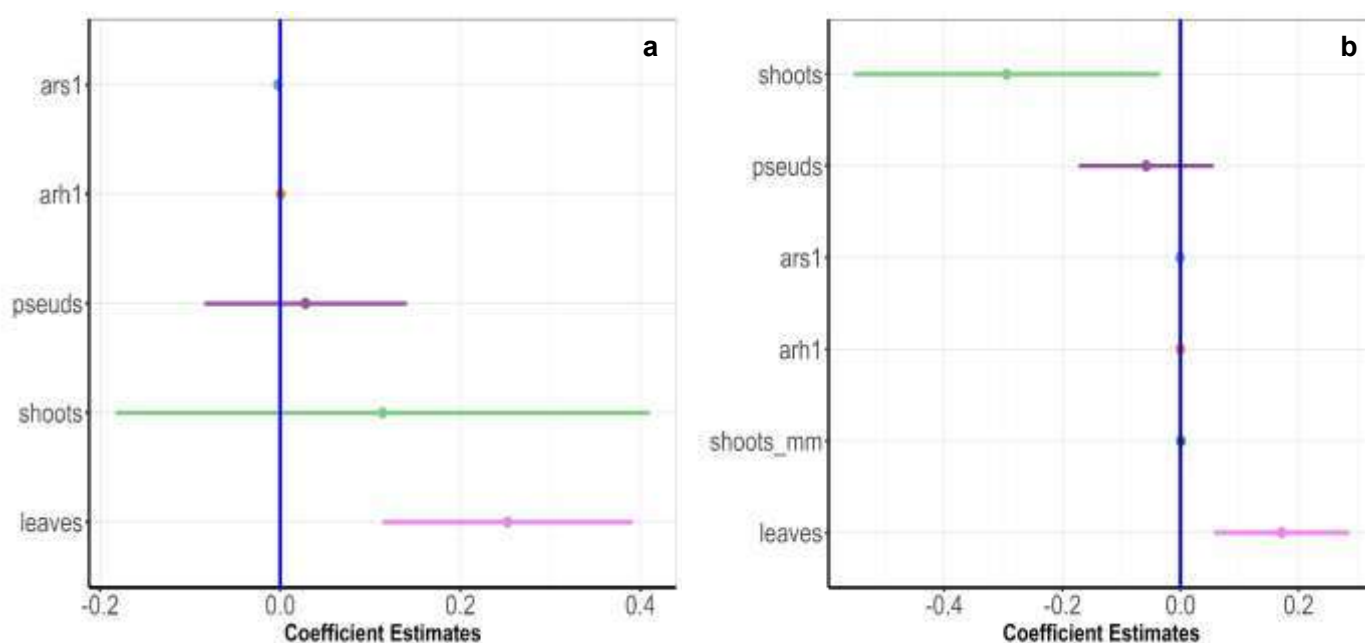


Figura 6. Correlación entre la micorrización (promedio de pelotones por planta, ppp) y el tamaño de *R. cervantesii*. a) En plantas juveniles, se observó un efecto positivo entre el número de pelotones y el número total de hojas ($\beta = 0.2526$, IC 95%: [0.116, 0.3884]). b) En plantas adultas, se observó un efecto positivo entre el número de pelotones y el número total de hojas ($\beta = 0.1713$, IC 95%: [0.0586, 0.2840]) y un efecto negativo con el número de nuevos brotes ($\beta = -0.2946$, IC 95%: [-0.5488, -0.0404]). Los intervalos de confianza que se superponen con cero no son significativos. arh1= área del pseudobulbo 1, arh1= área foliar de la hoja 1, pseudos= número total de pseudobulbos, shoots= número total de nuevos brotes, shoots_mm= tamaño del brote (mm), leaves= número total de hojas.

Considerando el estado de digestión de los pelotones (intactos y digeridos), los resultados son contrastantes. Cuando se tuvieron en cuenta únicamente los pelotones intactos (no digeridos), se observó un efecto positivo sobre el tamaño del nuevo brote y un efecto negativo sobre el número de brotes, tanto en plantas juveniles ($\beta = 0.0141$, IC 95 %: [0.0076, 0.0207], $p < 0.0001$; $\beta = -0.6330$, IC 95 %: [-1.0391, -0.2269], $p = 0.0022$) como en adultas ($\beta = 0.0143$, IC 95 %: [0.0096, 0.0190], $p < 0.0001$; $\beta = -0.8654$, IC 95 %: [-1.2581, -0.4726], $p < 0.001$). Además, se observó un efecto positivo sobre el número total de hojas en plantas juveniles ($\beta = 0.2031$, IC 95 %: [0.0433, 0.3629], $p = 0.0128$) (Fig. 6a, b).

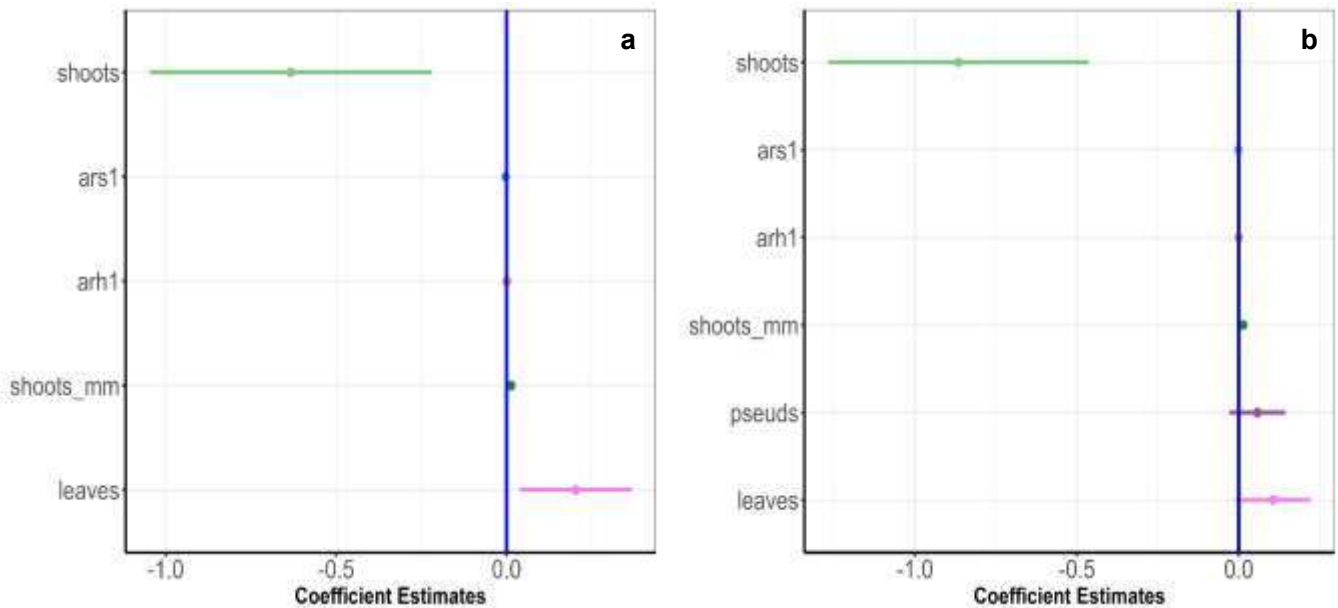


Figura 8. Efecto del número promedio de pelotones intactos sobre el tamaño de *R. cervantesii*. a) En plantas juveniles se observa un efecto positivo del número de pelotones intactos sobre el tamaño del brote ($\beta = 0.0141$, IC 95%: [0.0076, 0.0207]) y un efecto negativo sobre el número de brotes ($\beta = -0.6330$, IC 95%: [-1.0391, -0.2269]), así como un efecto positivo sobre el número total de hojas ($\beta = 0.2031$, IC 95%: [0.0433, 0.3629]). b) En plantas adultas se observa un efecto positivo del número de pelotones intactos sobre el tamaño del brote ($\beta = 0.0143$, IC 95%: [0.0096, 0.0190]) y un efecto negativo sobre el número de brotes ($\beta = -0.8654$, IC 95%: [-1.2581, -0.4726]). Los intervalos de confianza que se superponen con cero no son significativos. arh1= área del pseudobulbo 1, arh1= área foliar de la hoja 1, pseudos= número total de pseudobulbos, shoots= número total de nuevos brotes, shoots_mm= tamaño del brote (mm), leaves= número total de hojas.

Por el contrario, considerando únicamente los pelotones degradados, se registró un efecto negativo sobre el tamaño del nuevo brote en ambas categorías de desarrollo ($\beta = -0.0165$, IC 95 %: $[-0.0228, -0.0101]$, $p < 0.0001$; $\beta = -0.0114$, IC 95 %: $[-0.0159, -0.0069]$, $p < 0.001$), y un efecto positivo sobre el número de brotes tanto en plantas juveniles ($\beta = 0.6904$, IC 95 %: $[0.2970, 1.0838]$, $p = 0.0006$) como en adultas ($\beta = 0.6867$, IC 95 %: $[0.3090, 1.0644]$, $p = 0.0004$) (Fig. 7a, b).

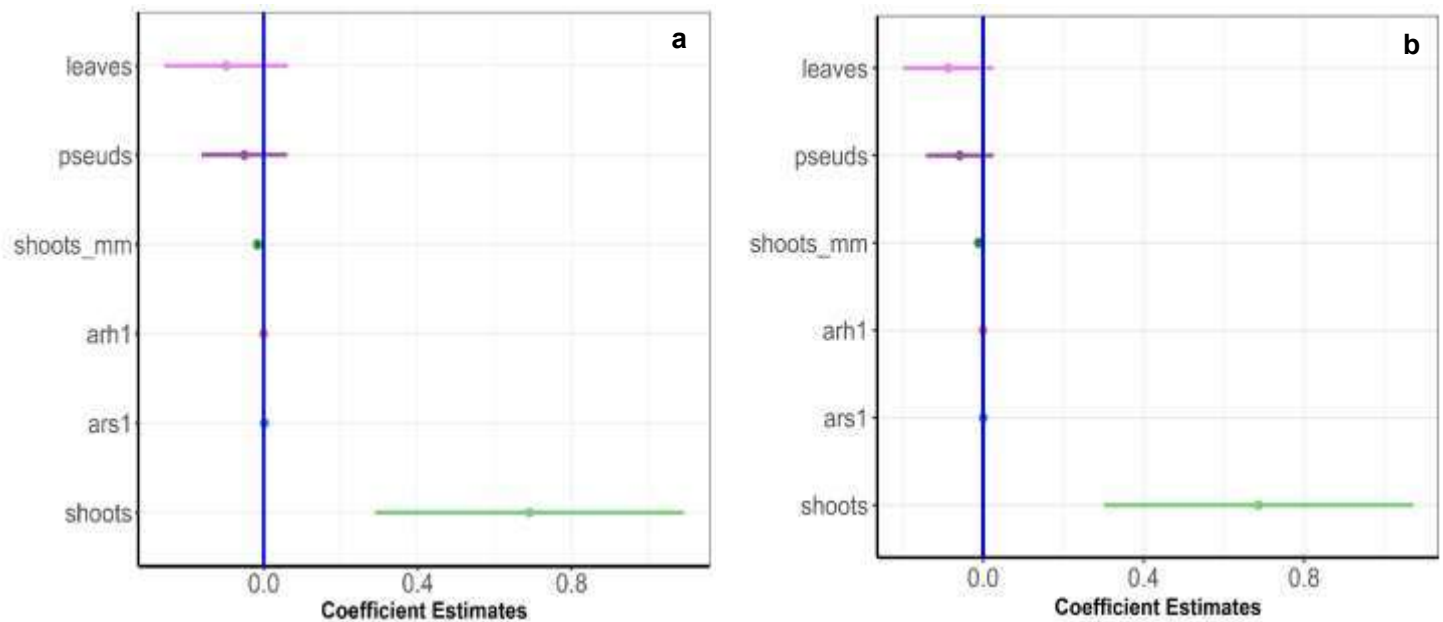


Figura 9. Efecto del número promedio de pelotones degradados sobre el tamaño de *R. cervantesii*. a) En plantas juveniles se observó un efecto positivo del número de pelotones degradados sobre el número de brotes ($\beta = 0.6904$, IC 95%: $[0.2970, 1.0838]$) y un efecto negativo sobre el tamaño del brote ($\beta = -0.0165$, IC 95%: $[-0.0228, -0.0101]$). b) En plantas adultas se observó la misma tendencia, con un efecto positivo del número de pelotones degradados sobre el número de brotes ($\beta = 0.6867$, IC 95%: $[0.3090, 1.0644]$) y un efecto negativo sobre el tamaño del brote ($\beta = -0.0114$, IC 95%: $[-0.0159, -0.0069]$). Los intervalos de confianza que se superponen con cero no son significativos. ars1= área del pseudobulbo 1, arh1= área foliar de la hoja 1, pseuds= número total de pseudobulbos, shoots= número total de nuevos brotes, shoots_mm= tamaño del brote (mm), leaves= número total de hojas.

4.3.2 Relación de los factores abióticos con el tamaño de *R. cervantesii*

Con respecto a los factores abióticos, tanto la temperatura como la humedad tuvieron un efecto sobre el tamaño de *R. cervantesii*. En plantas juveniles, se observó un efecto negativo de la temperatura sobre el número de brotes ($\beta = -0.0717$, IC 95 %: $[-0.1037, -0.0397]$, $p < 0.001$), mientras que en plantas adultas se registró un efecto positivo sobre el número de pseudobulbos ($\beta = 0.0114$, IC 95 %: $[0.0042, 0.0186]$, $p = 0.00193$) (Fig. 8a, b). Por otro lado, la humedad relativa afectó positivamente el número de brotes tanto en plantas adultas ($\beta = 0.373$, IC 95 %: $[0.203, 0.544]$, $p < 0.001$) como en juveniles ($\beta = 0.567$, IC 95 %: $[0.360, 0.774]$, $p < 0.001$), y afectó negativamente el número de pseudobulbos en plantas adultas ($\beta = -0.057$, IC 95 %: $[-0.109, -0.006]$, $p = 0.031$) (Fig. 8c, d). La luz fue el único factor abiótico que no mostró efecto sobre el tamaño de *R. cervantesii*.

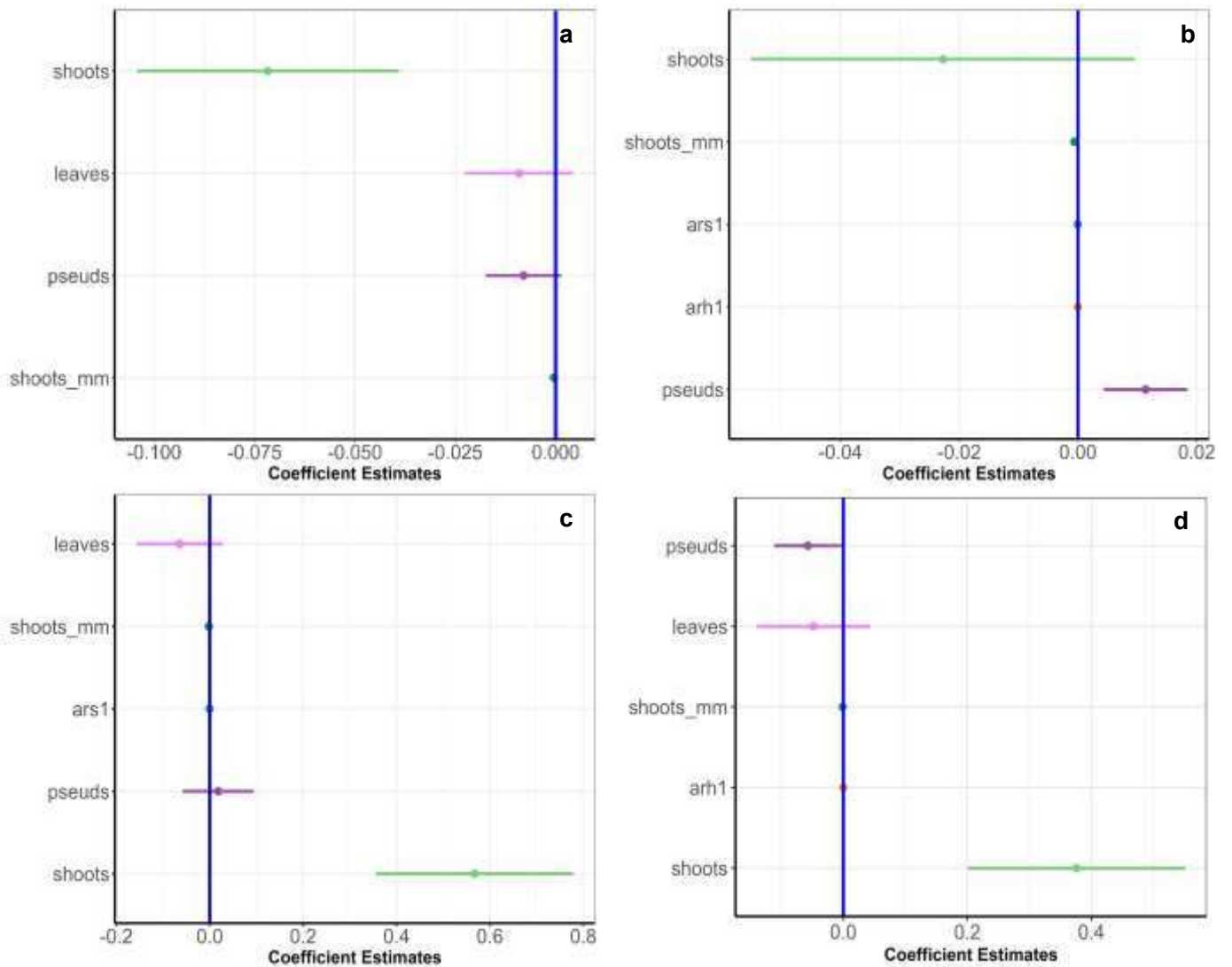


Figura 10. Efecto de la temperatura y la humedad relativa sobre el tamaño de *R. cervantesii*. a) Plantas juveniles y temperatura: se observa un efecto negativo de la temperatura sobre el número de brotes ($\beta = -0.0717$, IC 95%: [-0.1037, -0.0397]). b) Plantas adultas y temperatura: se observa un efecto positivo de la temperatura sobre el número de pseudobulbos ($\beta = 0.0114$, IC 95%: [0.0042, 0.0186]). c) Plantas juveniles y humedad: se observa un efecto positivo de la humedad relativa sobre el número de nuevos brotes ($\beta = 0.567$, IC 95%: [0.360, 0.774]). d) Plantas adultas y humedad: se observa un efecto positivo de la humedad relativa sobre el número de nuevos brotes ($\beta = 0.373$, IC 95%: [0.203, 0.544]) y un efecto negativo sobre el número de pseudobulbos ($\beta = -0.057$, IC 95%: [-0.109, -0.006]). ars1= área del pseudobulbo 1, arh1= área foliar de la hoja 1, pseudos= número total de pseudobulbos, shoots= número total de nuevos brotes, shoots_mm= tamaño del brote (mm), leaves= número total de hojas.

4.4 Relación de la micorrización y los factores abióticos con la sobrevivencia

Con respecto a la sobrevivencia de las plantas, al final del periodo de muestreo, un total de 10 plantas habían muerto, de las cuales tres eran adultas y siete juveniles. Los porcentajes de micorrización en las plantas adultas que no sobrevivieron oscilaron entre 20 % y 25 %, mientras que en las juveniles los porcentajes de micorrización oscilaron entre 15 % y 28 %. La micorrización se correlacionó de manera significativa con la sobrevivencia de las plantas ($\chi^2= 9.54$, $p= 0.0078$), observándose una mayor sobrevivencia en plantas con porcentajes más altos de micorrización (Tabla 2), lo que se traduce en una razón de probabilidades del 13 %.

Tabla 2. Porcentaje de micorrización (%) y supervivencia de las plantas (%). OR = 1.13, IC 95% = (1.04–1.26), $p = 0.0078$. El porcentaje de micorrización se evaluó al menos un año antes de determinar la supervivencia.

	Total y % de plantas	Promedio de micorrización (%)
Vivas	85 (89.5)	32.9 ^a
Muertas	10 (10.5)	22.5 ^b

Ninguno de los factores abióticos registrados mostró correlación con la sobrevivencia de las plantas a lo largo del periodo de muestreo.

5. DISCUSSION

5.1 Relación de la micorrización con el éxito reproductivo

En nuestro estudio con *R. cervantesii*, no se observó una relación significativa entre el porcentaje de micorrización y el número de flores producidas. Este resultado contrasta con lo reportado en plántulas desarrolladas *in vitro* de *Cymbidium aloifolium* y *C. giganteum*, donde la inoculación con una cepa de *Ceratobasidium* sp. promovió la floración temprana y mejoró la calidad floral (Hossain *et al.*, 2013). De manera similar, en híbridos de *Doritaenopsis* y especies de *Phalaenopsis*, la

inoculación con una cepa de *Rhizoctonia* sp. estimuló el desarrollo reproductivo, aumentando tanto el número como el tamaño de las flores (Chang, 2008).

5.2 Micorrización de los adultos y calidad de las semillas

Se detectó una relación positiva significativa entre el porcentaje de micorrización y la viabilidad de las semillas en *R. cervantesii*. Este hallazgo respalda nuestra hipótesis de que, en plantas de mayor tamaño, la asociación micorrízica no se traduce necesariamente en un incremento del crecimiento vegetativo, sino que los recursos obtenidos podrían redirigirse hacia la mejora de la calidad de las semillas. Este patrón se alinea con la hipótesis de la “limitación de recursos” en orquídeas, que propone que una alta inversión en la producción de frutos y semillas puede comprometer tanto el crecimiento vegetativo como la capacidad de refluoración en ciclos reproductivos posteriores. Un fenómeno similar ha sido documentado en *Compactia falcata*, donde un aumento en la producción de frutos en un año se asoció con una reducción en la producción del año siguiente, junto con un incremento en las tasas de aborto y una disminución de la floración en ciclos reproductivos posteriores (Meléndez-Ackerman *et al.*, 2000).

Una posible asociación que podría confundir la relación entre la viabilidad de las semillas y un mayor grado de micorrización podría estar relacionada con el reclutamiento de una mayor diversidad de hongos micorrízicos durante la fase reproductiva. Durante este periodo, estos hongos podrían contribuir al suministro de nutrientes esenciales necesarios para los procesos de floración y fructificación (Li *et al.*, 2021). Este fenómeno ha sido documentado en *Neottia ovata*, donde se observó un aumento en la diversidad fúngica al inicio de la floración (Oja *et al.*, 2015). Asimismo, en especies terrestres como *Anacamptis morio* subsp. *champagneuxii* y *Bletilla striata*, se ha registrado una mayor riqueza micorrízica en individuos en floración en comparación con la etapa de dormancia (Herrera-Rus *et al.*, 2020; Zeng *et al.*, 2021).

En orquídeas, también se ha demostrado que la viabilidad de las semillas está influenciada por características morfológicas, particularmente la proporción entre el tamaño del embrión y el tamaño total de la semilla. Oikonomidis & Thanos (2024)

analizaron la capacidad de germinación de semillas considerando diversos factores bióticos y abióticos, como el tipo de hábitat, la forma de crecimiento, el grado de mixotrofia fúngica y la zona climática, y encontraron que las semillas con embriones más grandes presentan mayores tasas de germinación. Además, observaron que las especies epífitas de hábitats con alta disponibilidad de luz y mixotrofia parcial tienden a desarrollar embriones más grandes, lo que favorece la germinación. En contraste, en ambientes sombreados y en especies completamente mixotróficas, la evolución ha favorecido semillas con embriones más pequeños. Aunque estas semillas son más eficientes para la dispersión a larga distancia, dependen en mayor medida de los hongos micorrízicos para completar la germinación.

Otro factor que podría influir en la calidad de las semillas es la calidad del polen del progenitor masculino, así como la interacción entre el genoma del padre (polinios) y la madre (Tremblay, 1994), como se ha demostrado previamente en *R. cervantesii*, donde los frutos resultantes de la polinización cruzada mostraron semillas con menor viabilidad que aquellas provenientes de polinización natural (Magaña-Lemus *et al.*, 2021).

5.3 Relación de la micorrización y de factores abióticos con el crecimiento de *R. cervantesii*

Según la literatura revisada, ningún estudio previo ha documentado la relación entre la micorrización y el crecimiento y desarrollo de orquídeas a lo largo de diferentes etapas del ciclo de vida bajo condiciones *in situ*. La evidencia disponible hasta la fecha se ha centrado principalmente en las etapas tempranas de desarrollo. Por ejemplo, en *Dendrobium officinale*, se observó que el hongo micorrízico *Tulasnella calospora* mejoraba el crecimiento de plántulas cultivadas *in vitro* (Zhang *et al.*, 2022), mientras que dos cepas fúngicas del género *Serendipita* sp. mostraron efectos significativos sobre el desarrollo y la resistencia de las plántulas de la misma especie (Meng *et al.*, 2017).

En el presente estudio, se registró un efecto de la interacción entre la micorrización y los factores abióticos sobre el crecimiento de *R. cervantesii* durante el periodo EH1–ES1. En contraste, no se observaron efectos significativos durante el periodo

EH2–ES2. Este patrón podría atribuirse al hecho de que, en esta fase posterior, las estructuras vegetativas evaluadas podrían haber alcanzado su desarrollo máximo. Esta interpretación es consistente con el hábito de crecimiento simpodial característico de *R. cervantesii*. En orquídeas con un tipo de crecimiento similar, como *Oncidium “Goldiana”*, se ha documentado que los recursos, principalmente fotoasimilados, generados por los primeros brotes pueden redistribuirse hacia brotes e inflorescencias posteriores (Yong & Hew, 1995). En este sentido, el patrón de crecimiento simpodial podría influir directamente en el desarrollo de los individuos mediante la transferencia de recursos almacenados en los pseudobulbos entre diferentes periodos de crecimiento (Lee, 2018).

Con respecto al efecto de los factores abióticos sobre el crecimiento, únicamente se registró un efecto negativo de la temperatura sobre el desarrollo de nuevos brotes durante la primera evaluación (EH1–ES1). Sin embargo, en los periodos posteriores (EH2–ES2) no se observaron efectos significativos atribuibles a los factores abióticos, probablemente por la misma razón mencionada anteriormente. Cabe destacar que durante los periodos de muestreo se registró un incremento en la temperatura media anual en el sitio de estudio. En este contexto, se ha señalado que el crecimiento de las orquídeas está regulado por rangos óptimos de temperatura, y desviaciones por encima o por debajo de estos pueden afectar negativamente tanto el crecimiento como el desarrollo de las plantas (Arditti & Pridgeon, 1997).

Finalmente, no se detectó un efecto significativo de la luz sobre el crecimiento de *R. cervantesii*. Este resultado podría explicarse de manera similar a lo observado en algunas especies epífitas, donde también se ha documentado una influencia limitada de la luz sobre el crecimiento. Por ejemplo, en el híbrido epífita *Cattleya forbesii* Lindl. × *Laelia tenebrosa* Rolfe, expuesto a dos intensidades de luz (90 % y 22.5 %) en condiciones de invernadero, se registraron variaciones en el volumen de los pseudobulbos que no dependían directamente de la intensidad lumínica (Stancato *et al.*, 2002).

5.4 Relación de la micorrización y factores abióticos con el tamaño

La micorrización ha demostrado ser un proceso relevante a lo largo de todas las etapas del ciclo de vida de *R. cervantesii* tal como ha sido sugerido previamente para otras especies de orquídeas, particularmente epífitas (Ávila-Díaz *et al.*, 2013; McCormick y Jacquemyn, 2014; Cevallos *et al.*, 2017; Rasmussen & Rasmussen, 2018).

En el caso de *R. cervantesii*, los resultados obtenidos en el presente estudio revelan un efecto significativo del número promedio de pelotones por planta sobre la producción total de hojas, tanto en individuos juveniles como adultos. Específicamente, se observó que las plantas con un mayor número de pelotones presentaban también una mayor producción foliar. Estos hallazgos respaldan la hipótesis planteada en este trabajo, según la cual la abundancia de pelotones micorrízicos influye positivamente en el crecimiento y desempeño vegetativo de la especie. La relación entre la densidad de pelotones y la aptitud de las plantas aún no ha sido documentada en otras orquídeas en condiciones naturales, aunque existen algunos estudios *in vitro* que muestran efectos similares. Por ejemplo, en *Dendrobium officinale*, la inoculación con cepas de *Tulasnella calospora* promovió de manera significativa el crecimiento de plántulas, aumentando tanto el número como la longitud de raíces, así como el tamaño y ancho de las hojas y el peso total de la planta (Zhang *et al.*, 2022). Estos resultados sugieren que la colonización micorrízica puede desempeñar un papel clave en el desarrollo vegetativo de las orquídeas.

Para *R. cervantesii*, los datos indican que el número promedio de pelotones intactos tuvo un efecto negativo sobre la producción de brotes, mientras que el número promedio de pelotones degradados mostró un efecto positivo sobre esta misma variable, tanto en plantas juveniles como adultas. Este patrón sugiere que las plantas utilizan activamente los hongos micorrízicos como fuente de nutrientes para la producción de nuevos brotes. Específicamente, un mayor número de pelotones intactos (no digeridos) se asocia con una menor producción de brotes, mientras que una mayor proporción de pelotones degradados, indicadores de digestión fúngica

por la planta, se relaciona con un aumento en la generación de nuevos brotes. En este sentido, es posible que los hongos micorrízicos asociados con *R. cervantesii* desempeñen un papel activo en la promoción del desarrollo vegetativo, tal como se ha documentado en otras orquídeas epífitas. Por ejemplo, en plántulas *in vitro* de *Rhynchostylis retusa*, la inoculación con *Leptosphaerulina chartarum*, aislada de raíces de *Dendrobium moniliforme*, promovió el desarrollo de brotes más grandes (Shah *et al.*, 2019).

En plantas adultas de *R. cervantesii*, se observó un efecto reducido tanto de la micorrización como de los factores abióticos sobre el desarrollo, en comparación con los individuos juveniles. Estos resultados respaldan la hipótesis de que los individuos en diferentes etapas ontogenéticas pueden exhibir patrones distintos de micorrización. Las plantas juveniles, al depender más de recursos externos para su desarrollo, podrían beneficiarse de manera más intensa de la asociación micorrízica, mientras que las plantas adultas, con mayor capacidad fotosintética, serían relativamente menos dependientes de esta simbiosis. Esta interpretación concuerda con reportes en *Masdevallia coccinea*, especie en la que se observó un patrón de mayor colonización micorrízica en individuos juveniles en comparación con adultos, aunque sin diferencias estadísticamente significativas (Ordoñez *et al.*, 2015). En contraste, en *Ionopsis utricularioides* no se encontró correlación significativa entre el porcentaje de micorrización y el tamaño de la planta (Osorio-Gil *et al.*, 2008). Esta ausencia de relación podría explicarse por la variabilidad en la edad/tamaño de los individuos dentro de la categoría “adultos” (Osorio-Gil *et al.*, 2008).

5.5 Relación de la micorrización y los factores abióticos con la supervivencia

En *R. cervantesii*, se observó una mayor supervivencia en las plantas que presentaban porcentajes más altos de micorrización. Esta relación ha sido documentada previamente en estudios con plantas cultivadas *in vitro*. En *Cymbidium giganteum* (terrestre) y *C. aloifolium* (epífita), se registró un aumento en la supervivencia tras la inoculación de plántulas con una cepa de *Ceratobasidium* sp. (Hossain *et al.*, 2013). De manera similar, en la orquídea epífita *Acampe*

praemorsa, la inoculación con una cepa de *Epulorhiza* sp. permitió la transferencia exitosa a condiciones *ex vitro*, alcanzando una supervivencia del 100 % (Sathiyadash *et al.*, 2013). Estos resultados podrían explicarse por el papel de los hongos micorrízicos en la activación de la expresión y síntesis de metabolitos secundarios, como fitoalexinas, isoflavonoides y glicerol, que contribuyen a la protección de las plantas frente al estrés causado por factores tanto bióticos como abióticos. Este mecanismo ha sido identificado como clave durante el proceso de aclimatación en orquídeas desarrolladas *in vitro* (Hossain *et al.*, 2013).

6. CONCLUSIONES

La micorrización mostró una influencia positiva sobre la viabilidad de las semillas, el crecimiento vegetativo -especialmente en plantas juveniles-, el tamaño de las plantas y la producción foliar. Además, el estado de digestión de los pelotones micorrízicos resultó determinante: los pelotones degradados se asociaron con un mayor número de brotes, mientras que los pelotones intactos mostraron el efecto contrario, lo que sugiere un uso activo de los recursos fúngicos por parte de la planta.

En cuanto a los factores abióticos, la humedad relativa y la luz tuvieron efectos positivos sobre la viabilidad de las semillas, y la humedad relativa también promovió el crecimiento vegetativo tanto en individuos juveniles como adultos. En contraste, la temperatura afectó negativamente la producción de brotes en plantas juveniles, lo que podría indicar una menor tolerancia térmica en esta etapa. No se detectaron efectos significativos de los factores abióticos sobre la producción de estructuras reproductivas.

Finalmente, se observó una relación positiva entre el grado de colonización micorrízica y la supervivencia de las plantas *in situ*, siendo esta menor en los individuos juveniles. Estos hallazgos destacan la importancia ecológica de la simbiosis micorrízica para el establecimiento, desarrollo y persistencia de *R. cervantesii*, particularmente en distintas etapas ontogenéticas.

En consecuencia, los resultados demuestran que tanto los factores bióticos como los abióticos influyen de manera significativa en el desarrollo de las orquídeas epífitas, presentando efectos diferenciados a lo largo de las distintas etapas de vida de estas plantas.

7. LITERATURA CITADA

Ackerman J. D., Tremblay R. L., Arias T., Zotz G., Sharma J., Salazar G. A. & Kaur J. 2025. Persistent Habitat Instability and Patchiness, Sexual Attraction, Founder Events, Drift and Selection: A Recipe for Rapid Diversification of Orchids. *Plants*, 14(8): 1193. <https://doi.org/10.3390/plants14081193>.

Arditti, J. and Ghani, A. K. A. 2000. Tansley Review No. 110. *New Phytologist*, 145(3): 367-421. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00587.x>.

Ávila-Díaz I., Garibay-Orijel R., Magaña-Lemus R. E. & Oyama K. 2013. Molecular evidence reveals fungi associated within the epiphytic orchid *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. *Botanical Sciences*, 91(4): 523-529.

Bayman P., Mosquera-Espinosa A. T., Saladini-Aponte C. M., Hurtado-Guevara N. C., & Viera-Ruiz N. L. 2016. Age-dependent mycorrhizal specificity in an invasive orchid, *Oeceoclades maculata*. *American Journal of Botany*, 103(11): 1880-1889. <https://doi.org/10.3732/ajb.1600127>.

Bertolini V., Cruz-Blasi J., Damon A. & Mora J. V. 2014. Seasonality and mycorrhizal colonization in three species of epiphytic orchids in southeast Mexico. *Acta Botanica Brasilica*, 28: 512-518. <https://doi.org/10.1590/0102-33062014abb3436>.

Boberg J., Finlay R.D., Stenlid J., Näsholm T. & Lindahl B.D. 2008. Glucose and ammonium additions affect needle decomposition and carbon allocation by the litter degrading fungus *Mycena epipterygia*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 995-999. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.11.005>.

- 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/10.1111/nph.14976>.
- Cevallos S., Sánchez-Rodríguez A., Decock C., Declerck S. & Suárez J. P. 2017. Are there keystone mycorrhizal fungi associated to tropical epiphytic orchids?. *Mycorrhiza*, 27(3): 225-232. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0746-8>.
- Chang D.C.N. 2008. Research and application of orchid mycorrhiza in Taiwan. *Acta Horticulturae*, 766:299-305. [10.17660/ActaHortic.2008.766.39](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.766.39).
- Cribari-Neto F. & Zeileis A. 2010. Beta regression in R. *Journal of statistical software*, 34(1): 1-24. [doi:10.18637/jss.v034.i02](https://doi.org/10.18637/jss.v034.i02).
- Dearnaley J. D. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17(6): 475-486. <https://doi.org/10.1007/s00572-007-0138-1>.
- Dearnaley J., Perotto S. & Selosse M. A. 2016. Structure and development of orchid mycorrhizas. *Molecular mycorrhizal symbiosis*, 63-86. <https://doi.org/10.1002/9781118951446.ch5>.
- Djordjevic' V., Tsiftsis S., Lakus'ic' D., Jovanovic' S., Jakovljevic' K., Stevanovic V. 2020. Patterns of distribution, abundance and composition of forest terrestrial orchids. *Biodiversity and Conservation*, 29: 4111-4134. <https://doi.org/10.1007/s10531-020-02067-6>.
- Espejo-Serna A., García-Cruz J., López-Ferrari A.R., Jiménez-Machorro R. & Sánchez-Saldaña L. 2002. Orquídeas del estado de Morelos. *Orquídea* 16:1–332.
- Favre-Godal Q., Gourguillon L., Lordel-Madeleine S., Gindro K. & Choisy, P. 2020. Orchids and their mycorrhizal fungi: an insufficiently explored relationship. *Mycorrhiza*, 30(1): 5-22. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00934-2>.
- Floudas D, Binder M, Riley R, et al. 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336: 1715-1719. [DOI: 10.1126/science.1221748](https://doi.org/10.1126/science.1221748).

Girlanda M., Selosse M. A., Cafasso D., Brilli F., Delfine S., Fabbian R., Ghignone S., Pinelli P., Segreto R., Loreto F., Cozzolino S. & Perotto, S. 2006. Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology*, 15(2): 491-504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02770.x>.

Herrera-Rus I., Pastor J. E. & Juan R. 2020. Fungal colonization associated with phenological stages of a photosynthetic terrestrial temperate orchid from the Southern Iberian Peninsula. *Journal of plant research*, 133(6), 807-825. <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01225-9>.

Hossain M.M., Rahi P., Gulati A., y Sharma M. 2013. Improved ex vitro survival of asymbiotically raised seedlings of Cymbidium using mycorrhizal fungi isolated from distant orchid taxa. *Scientia Horticulturae*, 159: 109-116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.003>.

Hoysted G. A., Kowal J., Jacob A., Rimington W. R., Duckett J. G., Pressel S., Orchard S., Ryan M. H., Field K. J. & Bidartondo, M. I. 2018. A mycorrhizal revolution. *Current Opinion in Plant Biology*, 44: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.12.004>.

INEGI, 2005. Serie III. Mapa de tipos de vegetación. Aguascalientes, Instituto de Estadística Geografía e Informática. <https://www.inegi.org.mx/temas/usosuelo/>. Consultada en noviembre de 2021.

Jiménez Machorro, R., Sánchez Saldaña, L. M., & García-Cruz, J. 1998. Familia Orchidaceae: Tribu Maxillarieae (Fascículo 67). Instituto de Ecología A.C., Centro Regional del Bajío. <https://doi.org/10.21829/fb.274.1998.67>

Kohler A., Kuo A., Nagy L.G., et al. 2015. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature Genetics*, 47: 410-415. <https://doi.org/10.1038/ng.3223>.

Kusumastuti N., Suratman, Pitoyo A. 2021. Orchids diversity on six forest types in Wasur National Park, Merauke, Papua, Indonesia. *Asian Journal of Forestry*, 5 (2): 101-110. DOI: 10.13057/asianjfor/r050206.

Lallemant, F., Figura, T., Damesin, C., Fresneau, C., Griveau, C., Fontaine, N., Zeller B. & Selosse, M. A. 2019. Mixotrophic orchids do not use photosynthates for perennial underground organs. *New Phytologist*, 221(1): 12-17. <https://doi.org/10.1111/nph.15443>.

Lee, Y. I. 2018. Vegetative propagation of orchids. In *Orchid propagation: from laboratories to greenhouses-methods and protocols* (pp. 403-425). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_22.

Li T., Yang W., Wu S., Selosse M. A. & Gao J. 2021. Progress and prospects of mycorrhizal fungal diversity in orchids. *Frontiers in Plant Science*, 12: 646325. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.646325>.

Lorberau K.E., Botnen S.S., Mundra S., Aas A.B., Rozema J., Eidesen P.B. & Kauserud H. 2017. Does warming by open-top chambers induce change in the root associated fungal community of the arctic dwarf shrub *Cassiope tetragona* (Ericaceae)? *Mycorrhiza* 27: 513–524. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0767-y>.

Magaña-Lemus R.E., Ávila-Díaz I., Herrerías Diego Y. 2021. Mating system and female reproductive success of the endemic and endangered epiphyte *Rhynchostele cervantesii* (Orchidaceae) in a cloud forest in Michoacan, Mexico. *Plant Ecology and Evolution*, 154 (1): 56–62. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2021.1551>.

Mattila E. & Kuitunen M. T. 2000. Nutrient versus pollination limitation in *Platanthera bifolia* and *Dactylorhiza incarnata* (Orchidaceae). *Oikos*, 89(2): 360-366. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.890217.x>.

McCormick M.K., y Jacquemyn H. 2014. What constrains the distribution of orchid populations?. *New Phytologist* (2014) 202: 392-400. Doi: 10.1111/nph.12639.

- Meléndez-Ackerman E. J., Ackerman J. D. & Rodríguez-Robles J. A. 2000. Reproduction in an Orchid Can Be Resource-Limited over its Lifetime 1. *Biotropica*, 32(2): 282-290. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2000.tb00471.x>.
- Meng P., Shao, S.C., Peng, G.H. 2017. Effects of Different Endophytic Fungi on *Dendrobium officinale* Seedling Growth. *Guizhou Agricultural Sciences*, 45(6), 106-110.
- Ogura-Tsujita Y., Gebauer G., Hashimoto T., Umata H. & Yukawa T. 2009. Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 276 (1657): 761-767. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1225>.
- Oikonomidis S. & Thanos C. A. 2024. Orchid embryo-to-seed (E: S) ratio as an indicator of germination behaviour and its ecological implications. *Seed Science Research*, 34(4): 218-227. doi:10.1017/S0960258524000242.
- Oja J., Kohout P., Tedersoo L., Kull T. & Kõljalg U. 2015. Temporal patterns of orchid mycorrhizal fungi in meadows and forests as revealed by 454 pyrosequencing. *New Phytologist*, 205(4): 1608-1618. <https://doi.org/10.1111/nph.13223>.
- Ordóñez N., Otero O., J. T. & Díaz L. 2015. Interacciones Micorrízicas de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. *Orquideología*, 31(2): 123-135.
- Osono T. 2020. Functional diversity of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecological Research*, 35:30-43. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12063>.
- Osorio-Gil E. M., Forero-Montaña J., Otero, J. T. 2008. Variation in mycorrhizal infection of the epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidiaceae) on different substrata. *Caribbean Journal of Science*, 44(1): 130-132. <https://doi.org/10.18475/cjos.v44i1.a15>.

- Perotto S. & Balestrini R. 2024. At the core of the endomycorrhizal symbioses: intracellular fungal structures in orchid and arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, 242(4), 1408-1416. <https://doi.org/10.1111/nph.19338>.
- Rasmussen H.N, Dixon K.W., Jersáková J., y Tešitelová T. 2015. Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of Botany*, 116: 391-402. Doi:10.1093/aob/mcv087.
- Rasmussen, H. N. & Rasmussen, F. N. 2014. Seedling mycorrhiza: a discussion of origin and evolution in Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 175(3), 313-327. <https://doi.org/10.1111/boj.12170>.
- Rasmussen H. N. & Rasmussen F. N. 2018. The epiphytic habitat on a living host: reflections on the orchid–tree relationship. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186(4): 456-472. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/box085>.
- Rasmussen H. N. & Whigham D. F. 2002. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytologist*, 154(3): 797-807. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00422.x>.
- Ruibal M. P., Triponéz Y., Smith L. M., Peakall R. & Linde C. C. 2017. Population structure of an orchid mycorrhizal fungus with genus-wide specificity. *Scientific Reports*, 7(1): 5613. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05855-3>.
- Sathiyadash K., Muthukumar T., Murugan S. B., Sathishkumar R., Uma E., Jaison S., y Priyadharsini, P. 2013. In vitro asymbiotic seed germination, mycorrhization and seedling development of *Acampe praemorsa* (Roxb.) Blatt. & Mc Cann, a common south Indian orchid. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2(2): 114-118. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(13\)60130-X](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(13)60130-X).
- Schweiger J. M. I., Bidartondo M. I. & Gebauer G. 2018. Stable isotope signatures of underground seedlings reveal the organic matter gained by adult orchids from mycorrhizal fungi. *Functional Ecology*, 32(4): 870-881. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13042>.

Shah S., Shrestha R., Maharjan S., Selosse M. A., y Pant B. 2019. Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic fungi from the roots of *Dendrobium moniliforme*. *Plants*, 8(1): 5. <https://doi.org/10.3390/plants8010005>.

SNIB. 2016. Orquídea Lirio (*Rhynchostele cervantesii*). Colaboración de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Naturalista. <http://www.naturalista.mx/taxa/206214-Rhynchostele-cervantesii>. Consultada en abril de 2022.

Selosse M.A., Dubois M.P. & Alvarez N. 2009. Do Sebacinales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycological Research*, 113: 1062-1069. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.07.004>.

Selosse, M. A., & Martos, F. 2014. Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon?. *Trends in Plant Science*, 19(11): 683-685. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.09.005>.

Selosse M. A., Petrolli R., Mujica M. I., Laurent L., Perez-Lamarque B., Figura T., Bourceret A., Jacquemyn H., Li T., Gao J., Minasiewicz J. y Martos F. 2022. The waiting room hypothesis revisited by orchids: were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes? *Annals of Botany*, 129(3): 259-270. <https://doi.org/10.1093/aob/mcab134>.

Selosse M.A., Setaro S., Glatard F., Richard F., Urcelay C. & Weiß M. 2007. Sebacinales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist* 174: 864–878. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02064.x>.

Smith S.E., Read D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Cambridge, UK: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-370526-6.x5001-6>.

Soto-Arenas M. A. & Solano-Gómez A. R. 2007. *Ficha técnica de Rhynchostele cervantesii*. En: Soto-Arenas M. A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoin & Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A. C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México, D.F.

Stancato, G. C., Mazzafera, P., y Buckeridge, M. S. 2002. Effects of light stress on the growth of the epiphytic orchid *Cattleya forbesii* Lindl. X *Laelia tenebrosa* Rolfe. *Brazilian Journal of Botany*, 25, 229-235. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042002000200011>.

Suárez J. P., Eguiguren J. S., Herrera P. & Jost, L. 2016. Do mycorrhizal fungi drive speciation in *Teagueia* (Orchidaceae) in the upper Pastaza watershed of Ecuador?. *Symbiosis*, 69(3): 161-168. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0399-6>.

Sujalu A. P., Syahfari H., Astuti P., Jannah N. & Sutejo H. 2021. A Correlation between the Microclimate Forest to the Diversity of Orchids at Climate of the Lowland Dipterocarp Forest in Malinau Regency. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 709(1): 012007. DOI 10.1088/1755-1315/709/1/012007.

Thoen E., Harder C.B., Kauserud H., Botnen S. S., Vik U., Taylor A. F. & Skrede I. 2020. *In vitro* evidence of root colonization suggests ecological versatility in the genus *Mycena*. *New Phytologist*, 227: 601-612. <https://doi.org/10.1111/nph.16545>.

Tsavkelova, E. A., Bömke, C., Netrusov, A. I., Weiner, J. and Tudzynski, B. 2008. Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain. *Fungal genetics and Biology*, 45(10): 1393-1403. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.07.011>.

Tremblay R. L. 1994. Frequency and consequences of multi-parental pollinations in a population of *Cypripedium calceolus* var. *pubescens* (ORCHIDACEAE). *Lindleyana*, 9(3): 161-167.

Tremblay, R. L. 2000. Plant longevity in four species of *Lepanthes* (Pleurothallidinae; Orchidaceae). *LINDLEYANA-WEST PALM BEACH*-, 15(4), 257-266.

Tremblay R. L., Ackerman J. D. & Pérez M. E. 2010. Riding across the selection landscape: fitness consequences of annual variation in reproductive characteristics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1539): 491-498. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0239>.

- Waterman R. J. & Bidartondo M. I. 2008. Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. *Journal of Experimental Botany*, 59(5): 1085-1096. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm366>.
- Yagame, T., Orihara, T., Selosse, M. A., Yamato, M., & Iwase, K. 2012. Mixotrophy of *Platanthera minor*, an orchid associated with ectomycorrhiza-forming Ceratobasidiaceae fungi. *New Phytologist*, 193(1): 178-187. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03896.x>.
- Yang A., Zeng S., Yu L., He M., Yang Y., Zhao X., Jiang C., Hu D. & Song, B. 2018. Characterization and antifungal activity against *Pestalotiopsis* of a fusaricidin-type compound produced by *Paenibacillus polymyxa* Y-1. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 147: 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.08.012>.
- Yulia N.D., Yanti R.M. 2011. Epiphytic orchids and host trees diversity at Gunung Manyutan Forest Reserve, Wilis Mountain, Ponorogo, East Java. *BIODIVERSITAS*, 12 (1): 22-27. DOI: 10.13057/biodiv/d120105.
- Yong J. W. H., y Hew C. S. 1995. The importance of photoassimilate contribution from the current shoot and connected back shoots to inflorescence size in the thin-leaved sympodial orchid *Oncidium Goldiana*. *International Journal of Plant Sciences*, 156(4): 450-459. <https://doi.org/10.1086/297267>.
- Zeng X., Ni Z., Diao H., Jiang K., Hu C., Shao L. & Huang W. 2021. Root endophytic fungal community and carbon and nitrogen stable isotope patterns differ among *Bletilla* species (Orchidaceae). *Journal of Fungi*, 7(2), 69. <https://doi.org/10.3390/jof7020069>.
- Zhang L., Chen J., Lv Y., Gao C. & Guo S. 2012. *Mycena* sp., a mycorrhizal fungus of the orchid *Dendrobium officinale*. *Mycological Progress*, 11(2): 395-401. <https://doi.org/10.1007/s11557-011-0754-1>.
- Zhang Y., Huo W., Hou J., Liu L., Yu X., Xu L. 2022. Effects and Benefits of Orchid Mycorrhizal Symbionts on *Dendrobium officinale*. *Horticulturae*, 8(10), 861. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100861>.

CAPÍTULO III

Diversidad y dinámica de hongos cultivables asociados a las raíces de la orquídea endémica y amenazada *Rhynchostele cervantesii*

Diversity and dynamic of cultivable fungi associated with the roots of the endemic and endangered orchid *Rhynchostele cervantesii*

Rosa Elia Magaña Lemus¹, Irene Ávila Díaz², Gerardo Vázquez Marrufo³

¹ Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales INIRENA, UMSNH. Laboratorio de la Conservación Vegetal. Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, UMSNH.0212484e@umich.

² Facultad de Biología de la UMSNH. Laboratorio de la Conservación Vegetal. Profesor-Investigador Tit. B. UMSNH. irene.avila@umich.mx

³ Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la UMSNH. Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología.

* NOTA: La versión en inglés de este trabajo fue enviada para su posible publicación en Symbiosis. Enviado: 04-diciembre-2025.

1. RESUMEN

Los hongos endófitos y micorrízicos son esenciales para la supervivencia de las orquídeas, ya que estas plantas carecen de reservas nutricionales y dependen completamente de los simbiontes para su crecimiento temprano y el establecimiento de plántulas. Comprender la diversidad de estos hongos, especialmente las especies micorrízicas que forman pelotones, estructuras de hifas enrolladas dentro de las células corticales de las raíces, es crucial para esclarecer su papel en el desarrollo de las orquídeas. Este estudio investigó los hongos endófitos cultivables y potencialmente micorrízicos asociados a la orquídea mexicana endémica y amenazada *Rhynchostele cervantesii*. Se aislaron dieciséis cepas fúngicas y se identificaron mediante secuenciación del ITS, lo que reveló diez OTUs distintas, todas pertenecientes al filo Ascomycota y asignadas a los géneros *Apiospora*, *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Didymella*, *Leptosphaeria*, *Nemania*, *Penicillium* y *Xylaria*. La comunidad de endófitos radicales cultivables presentó variaciones entre

estaciones y etapas de desarrollo. Los roles funcionales de estos hongos en el apoyo al crecimiento vegetal y la resistencia al estrés abiótico aún deben ser plenamente esclarecidos. De particular interés, *Diaporthe* sp. mostró la capacidad de favorecer el cultivo *in vitro* de la orquídea, mientras que *Apiospora* parece ser importante a lo largo de todo el ciclo de vida de la especie.

Palabras clave: Endófitos ascomicetos, orquídea endémica, micorriza, hongos radiculares, pelotones.

1. ABSTRACT

Endophytic and mycorrhizal fungi are vital to the life cycle of orchid species, which lack nutrient reserves and rely entirely on these symbionts for early growth and seedling establishment in their natural environment. Identifying the symbiotic fungi of orchids enhances understanding of this relationship, particularly mycorrhizal fungi characterized by pelotons, structures formed by the coiling of hyphae within the cortical cells of roots. This study aimed to analyze the diversity and dynamics of cultivable endophytic and putatively mycorrhizal fungi associated with the Mexican endemic and endangered orchid species *Rhynchostele cervantesii*. Sixteen fungal strains were isolated, and their ribosomal internal transcribed region (ITS) was sequenced. Ten OTUs were identified, all belonging to the phylum Ascomycota, within the genera *Apiospora*, *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Didymella*, *Leptosphaeria*, *Nemania*, *Penicillium*, and *Xylaria*. The community of culturable endophytic fungi associated with *R. cervantesii* roots shows seasonal and developmental variation. The specific roles of these taxonomic groups in establishing and providing resistance to abiotic stress in *R. cervantesii* remain to be clarified. Notably, *Diaporthe* sp. stands out as a strain capable of supporting *in vitro* culture of the plant, while *Apiospora* seems to play a significant role throughout the life cycle of this endangered species.

Keywords: Ascomycete endophytes, endemic orchid, mycorrhiza, root fungi, pelotons.

2. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas establecen relaciones endófitas y micorrízicas esenciales con hongos en sus sistemas radiculares (Sathiyadash *et al.*, 2020; Bhatti *et al.*, 2022). Se han identificado distintos taxones fúngicos asociados a las raíces de diversas especies de orquídeas. Entre los hongos micorrízicos, las especies dominantes del filo Basidiomycota incluyen miembros de los órdenes Atractiellales, Cantharellales y Sebaciniales (Beltrán-Nambo *et al.*, 2018; Mosquera-Espinosa *et al.*, 2010; Riofrío *et al.*, 2013; Yokoya *et al.*, 2015; Ávila-Díaz *et al.*, 2013). Los géneros más frecuentemente reportados son *Ceratobasidium* y *Tulasnella* (Graham y Dearnaley, 2012; Khamchatra *et al.*, 2016; Novotná *et al.*, 2018; Zi *et al.*, 2014). Por ejemplo, orquídeas epífitas del género *Epidendrum* se han asociado con hongos micorrízicos de las familias Ceratobasidiaceae y Tulasnellaceae (Zettler *et al.*, 2011; Riofrío *et al.*, 2013; Cevallos *et al.*, 2017). Sin embargo, varios estudios también reportan posibles relaciones micorrízicas con hongos del filo Ascomycota, particularmente dentro del orden Helotiales (Dearnaley *et al.*, 2012; Martos *et al.*, 2012; Oberwinkler *et al.*, 2017; May *et al.*, 2020; Xing *et al.*, 2020) y del género *Tuber* (May *et al.*, 2020; Xing *et al.*, 2020). Menos frecuentemente, se han observado asociaciones micorrízicas con especies de Chytridiomycota, Glomeromycota y Mucoromycota (Novotná *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021). Con respecto a los hongos endófitos radiculares de orquídeas, se han documentado al menos 72 géneros en los órdenes Sordariomycetes, Dothideomycetes y Leotiomyces de Ascomycota, así como 32 géneros el orden Agaricomycetes de Basidiomycota (Ma *et al.*, 2015).

Tanto las asociaciones endófitas como micorrízicas son vitales para el desarrollo de las orquídeas y su resistencia frente a estrés biótico y abiótico. Sin hongos micorrízicos, la germinación de las semillas no ocurriría, lo cual es esencial para el establecimiento y el desarrollo temprano de las orquídeas en su ambiente natural (Ávila-Díaz *et al.*, 2013; McCormick y Jacquemyn, 2014; Rasmussen *et al.*, 2015). Además, los hongos micorrízicos favorecen el crecimiento vegetal y aumentan la resistencia a patógenos (Li *et al.*, 2021). Asimismo, los hongos endófitos proporcionan resistencia a la sequía y a infecciones por patógenos, además de promover el crecimiento de la planta (Ye *et al.*, 2019; Chand *et al.*, 2020; Liu *et al.*,

2022). Tanto los hongos micorrízicos como los endófitos radiculares pueden estimular el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos, incluyendo la solubilización de fosfatos y la producción de fitohormonas como el ácido indolacético (IAA) (Chand *et al.*, 2020; Shah *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2025; Wen *et al.*, 2025).

Se ha documentado un recambio de hongos micorrízicos a lo largo de distintas etapas del desarrollo de las orquídeas. Ciertos hongos que promueven la germinación de semillas son específicos de etapas tempranas, como la semilla, protocormo y la plántula, mientras que otros se establecen en etapas posteriores (Zhao *et al.*, 2021; Fernández *et al.*, 2023). Además, la estacionalidad (época húmeda vs. seca) se ha identificado como un factor clave en la dinámica micorrízica, ya que puede afectar la presencia y la abundancia de pelotones. Varios estudios han reportado niveles más altos de colonización micorrízica durante la época húmeda en comparación con la seca, tanto en especies de orquídeas terrestres como en epífitas (Durán *et al.*, 2007; Bertolini *et al.*, 2014; Ercole *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016). Dado que las comunidades fúngicas endófitas y micorrízicas radiculares son dinámicas, muestran cambios en las especies dominantes según la etapa de desarrollo de la planta (Chen *et al.*, 2019; Cao *et al.*, 2022) y variaciones estacionales (Zeng *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2022).

Comprender la diversidad y la dinámica de los hongos asociados a las raíces durante las distintas etapas de desarrollo de las orquídeas y bajo diferentes condiciones climáticas es vital para generar estrategias integrales y sostenibles de manejo y conservación (Jasinge *et al.*, 2018; Phillips *et al.*, 2020; Reiter *et al.*, 2020; Bhatti *et al.*, 2022). Esto es especialmente relevante para especies de orquídeas endémicas o geográficamente restringidas como *Rhynchostele cervantesii* (Lex.) Soto Arenas & Salazar, una orquídea epífita endémica de México actualmente catalogada como especie amenazada bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2019. Posee importancia ecológica y de conservación y es altamente valorada por su belleza ornamental, lo que aumenta su relevancia para la investigación científica y hortícola. En México, se comercializa especialmente durante la temporada navideña, cuando se utiliza para decorar nacimientos e

iglesias (Soto-Arenas y Solano-Gómez, 2007). Además, *R. cervantesii* se considera un modelo ideal para estudiar micorrizas de orquídeas debido a su tamaño relativamente pequeño y a su facilidad de germinación y cultivo *in vitro*. Tanto los esfuerzos de conservación como la posible producción comercial de esta especie endémica se ven limitados por el conocimiento insuficiente sobre los hongos asociados a su sistema radicular, que podrían ser importantes para la resistencia al estrés o para el crecimiento rápido *in vitro*. Por ello, el objetivo de este estudio fue analizar la diversidad y la dinámica de los hongos endófitos cultivables y putativamente micorrízicos asociados a *R. cervantesii*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema de estudio

Rhynchostele cervantesii es una hierba epífita caracterizada por pseudobulbos de color verde oscuro con manchas negras, de forma ovoide a globosa. Produce flores vistosas de color blanco con líneas concéntricas rojizo-marrones en la base de los pétalos y sépalos, y ocasionalmente también en el labelo (Espejo-Serna *et al.*, 2002) (Fig. 1). *R. cervantesii* es una especie endémica de México, distribuida en los bosques de la Sierra Madre Oriental, el Eje Volcánico Transmexicano y de la Sierra Madre del Sur (SNIB, 2016).



Figura 1. Planta de *Rhynchostele cervanteii*.

Sitio de estudio y toma de muestras

El estudio se llevó a cabo en el Predio de Tenderio, ubicado dentro del Área de Conservación Voluntaria de la Comunidad Indígena de Santiago Tingambato, en las coordenadas 19°30' de latitud norte y 101°51' de longitud oeste (Fig. 2), con una extensión aproximada de 360 ha (INEGI 2005). *R. cervantesii* se encuentra en este sitio dentro de un tipo de vegetación clasificada como Bosque Mesófilo de Montaña de Barrancas, según Hagsater *et al*, 2015. Este ecosistema se sitúa entre los 1400 y 2300 m de altitud y se caracteriza por una alta humedad relativa durante el verano y el otoño, lo que lo convierte en uno de los bosques más húmedos del centro de México.

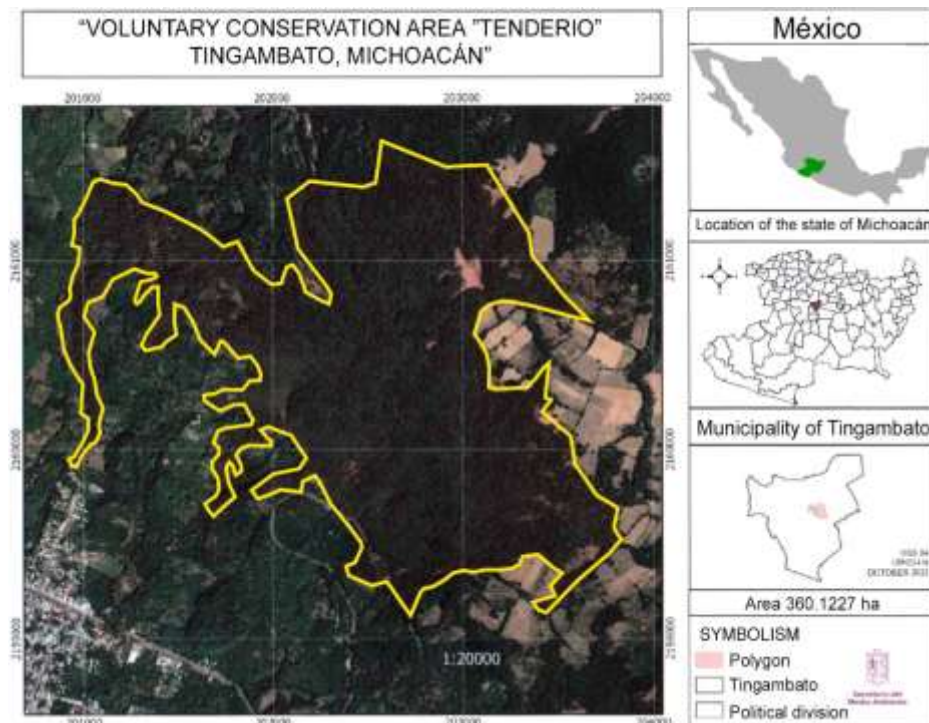


Figura 2. Ubicación geográfica del predio Tenderio, perteneciente a la Comunidad Indígena de Santiago Tingambato.

Para evaluar la diversidad y la dinámica de los hongos endófitos y putativamente micorrízicos asociados a *R. cervantesii*, se realizaron muestreos en las épocas húmedas de 2021 (EH1) y 2022 (EH2), así como en las épocas secas de 2022 (ES1) y 2023 (ES2). En cada período de muestreo, se recolectaron aleatoriamente dos raíces de tres plantas juveniles y tres de tres plantas adultas, lo que resultó en un total de 24 individuos (12 juveniles y 12 adultos) y 48 raíces analizadas a lo largo del estudio. La Comunidad Indígena de Santiago Tingambato otorgó el permiso para la recolección de raíces. Al finalizar el experimento no se observó daño relacionado con la toma de muestras. Cabe señalar que durante EH1 solo se encontraron tres protocormos. Dado que *R. cervantesii* es una especie endémica y amenazada, el número de muestras por temporada se limitó a seis plantas. Las raíces recolectadas se colocaron en tubos de ensayo estériles de 10 mL con tapa de rosca, cada uno conteniendo algodón humedecido, y posteriormente se transportaron en hielera al Laboratorio de Biología de la Conservación Vegetal de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) para su análisis.

El aislamiento de los hongos asociados a las raíces de *R. cervantesii* se realizó en condiciones estériles en una campana de flujo laminar. Las secciones corticales de las raíces se obtuvieron según el protocolo descrito por Zettler *et al.* (2003). El lavado, la desinfección y la preparación de raíces se efectuaron con una solución que contenía 0.03% de eritromicina y 0.01% de gentamicina (Ortega-Larrocea, 2008).

Cada segmento de raíz se colocó en una placa de Petri con 1 mL de agua destilada estéril, en la que se realizaron cortes finos del córtex para extraer tres pelotones micorrízicos por segmento. Estos pelotones se transfirieron individualmente mediante una pipeta Pasteur estéril, a placas de Petri que contenían medio de cultivo fúngico estéril (Zettler y Corey, 2018). Se utilizaron como medios de aislamiento Oatmeal Agar (Difco, EE. UU.) y Potato Dextrose Agar (Difco, EE. UU.). Las placas con los medios descritos se incubaron en oscuridad a 25–27 °C. Una vez observado el crecimiento fúngico, se realizaron subcultivos en medio PDA para obtener cultivos axénicos.

Extracción de ADN y ensayos de PCR

La extracción de ADN a partir del micelio de los aislados obtenidos se realizó mediante el método de fenol–cloroformo, que incluyó la disrupción de la muestra y la lisis celular. Cada muestra se colocó en un tubo de microcentrífuga con 400 μ L de tampón de lisis (Tris·HCl 100 mM, pH 8.0; SDS 2%; NaCl 100 mM; EDTA 50 mM) y se centrifugó a $1,500 \times g$ durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 400 μ L de fenol–cloroformo (1:1 v/v), la mezcla se agitó vigorosamente en vórtex durante 5 minutos y se centrifugó nuevamente a $1,500 \times g$ durante 10 minutos. La fase acuosa superior se recuperó cuidadosamente y se transfirió a un tubo limpio. El ADN se precipitó agregando un volumen igual de isopropanol frío, seguido de incubación a -20°C durante 1 hora. Las muestras se centrifugaron como se describió anteriormente, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 250 μ L de etanol al 70%. Finalmente, las muestras se dejaron secar al aire a temperatura ambiente y el pellet de ADN se resuspendió en 50 μ L de agua desionizada estéril. La calidad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con SYBR Green (Invitrogen, EE. UU.).

Para amplificar las regiones del espaciador transcrito interno (ITS1 e ITS2), se utilizaron los pares de cebadores ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). La mezcla de reacción de PCR (volumen final: 15 μ L) contenía 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1.5 mM MgCl_2 ; 0.2 mM de cada dNTP; 1 μ M de cada iniciador; 0.5 U de *Taq* ADN polimerasa recombinante (Invitrogen, EE. UU.) y 50 ng de ADN molde. Las condiciones de PCR incluyeron una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos y 72°C por 2 minutos, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con SYBR Green (Invitrogen, EE. UU.). El producto amplificado (~650 bp) se purificó y se secuenció en Elim Biopharmaceuticals (Hayward, CA, EE. UU.).

Análisis filogenético

La calidad de las secuencias obtenidas se evaluó mediante el análisis de los electroferogramas en BioEdit v7.7.1.0 (<https://thalljiscience.github.io/>). Las secuencias ITS se sometieron a búsquedas con BLASTN tanto en la base de datos general como en la base de datos curada de GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias de referencia se seleccionaron en función de los puntajes de identidad y se complementaron con secuencias previamente utilizadas en análisis filogenéticos de los taxones correspondientes, según lo reportado en la literatura.

El archivo FASTA que contenía las secuencias obtenidas de GenBank para cada género se utilizó para realizar un alineamiento múltiple de secuencias mediante el servidor MAFFT (Kato *et al.*, 2019). El alineamiento resultante se recortó manualmente en los extremos 5' y 3' para eliminar regiones en las que no era posible comparar los nucleótidos correspondientes entre todas las secuencias. Este alineamiento se empleó para determinar el mejor modelo evolutivo para cada conjunto de secuencias, seguido de un análisis filogenético utilizando el criterio de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood, ML) con 1000 iteraciones para obtener valores de soporte ultrarrápido de bootstrap (UFBoot) para cada bifurcación. Ambos análisis se realizaron en el servidor de IQ-TREE (Nguyen *et al.*, 2015; Trifinopoulos *et al.*, 2016).

Para la reconstrucción filogenética bajo el criterio bayesiano, se utilizó MrBayes v3.2 (Ronquist *et al.*, 2012), ejecutando cuatro cadenas de Monte Carlo de Markov (MCMC) con una topología inicial aleatoria y un *burn-in* del 25%. Los árboles filogenéticos resultantes se editaron con el software FigTree (Rambaut, 2009). Las cepas pertenecientes al mismo género o a taxones estrechamente relacionados se analizaron en un mismo árbol filogenético.

Cabe destacar que, tras las reacciones de PCR, la amplificación de ADN de la cepa J11S no resultó exitosa.

Determinación de AIA (Ácido Indolacético)

Tras la identificación molecular de las cepas fúngicas aisladas de las raíces de *R. cervantesii* y considerando que algunas especies del género *Diaporthe* han sido reportadas en la literatura como productoras de ácido indol-3-acético (IAA) (Deepthi y Ray, 2019), se evaluó la producción de esta fitohormona en la cepa de *Diaporthe* aislada en este estudio.

La cuantificación de IAA se realizó mediante el ensayo colorimétrico de Salkowski (Patten y Glick, 2002). Brevemente, la cepa fúngica se cultivó en caldo de dextrosa de papa (PDB) y en medio PDB suplementado con triptófano, en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio. Cada tratamiento se realizó por duplicado y comprendió las siguientes condiciones: (a) PDB con *Diaporthe*; (b) PDB sin inocular (control negativo); (c) PDB con triptófano y *Diaporthe*; y (d) PDB con triptófano sin inocular (control negativo). En los tratamientos inoculados se utilizó un 10% de inóculo fúngico. Todos los cultivos se incubaron a 37 °C durante 14 días.

4. RESULTADOS

Diversidad de hongos endófitos y micorrízicos de *R. cervantesii*

Se aislaron un total de 17 cepas fúngicas de las raíces de *R. cervantesii*. Los aislamientos se realizaron a partir de muestras recolectadas en diferentes etapas de desarrollo y durante las estaciones húmeda y seca. De estas, las regiones de ADN ITS de 16 cepas fueron amplificadas y secuenciadas con éxito (Tabla 1). Todas las cepas identificadas pertenecen al filo Ascomycota y se clasifican en las familias Apiosporaceae, Didymellaceae, Diaporthaceae, Leptosphaeriaceae, Trichocomaceae y Xylariaceae, correspondientes a los órdenes Asferiales, Diaporthales, Eurotiales, Pleosporales y Xylariales.

Tabla 1. Diversidad de hongos aislados de *R. cervantesii*. ¹Número de acceso de las secuencias obtenidas en este estudio. ²Números de acceso de secuencias consultadas en GenBank.

Accession number ¹	Strain	Taxa	% Identity	% Coverage	E-value	Closest GenBank match	Accession number ²
-------------------------------	--------	------	------------	------------	---------	-----------------------	-------------------------------

PX630686	R2	<i>Apiospora</i> sp.	99.65	100	0	<i>Apiospora marii</i>	NR_166043.1
			99.82	100	0	<i>Arthrinium phaeospermum</i>	OR514929.1
PX630687	R11	<i>Aspergillus</i> sp.	99.80	78	0	<i>Aspergillus proliferans</i>	NR_135339.1
			99.80	71	0	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	NR_135336.1
PX630688	R8	<i>Diaporthe</i> sp.	94.30	99	6e-99	<i>Diaporthe acericola</i>	NR_152507.1
			88.37	94	1e-95	<i>Diaporthe novem</i>	NR_111855.1
PX630689	R7	<i>Didymella</i> sp.	99.80	98	0	<i>Didymella keratinophila</i>	NR_158275.1
			99.59	98	0	<i>Didymella prosopidis</i>	NR_137836.1
PX630690	R16	<i>Leptosphaeria biglobosa</i>	95.27	76	0	<i>Leptosphaeria biglobosa</i>	KM056325.1
			88.16	76	2e-171	<i>Ochrocladosporium frigidarii</i>	NR_156512.1
PX630691	R12	<i>Nemania diffusa</i>	100	100	0	<i>Nemania diffusa</i>	JQ761654.1
			97.48	83	0	<i>Nemania cyclobalanopsina</i>	NR_172972.1
PX630692	R3	<i>Nemania rubi</i>	96.59	85	0	<i>Nemania rubi</i>	NR_177562.1
			92.13	90	2e-174	<i>Nemania yunnanensis</i>	NR_173237.1
PX630694	R5	<i>Penicillium</i> sp.	100	92	0	<i>Penicillium chrysogenum</i>	NR_077145.1
			99.81	80	0	<i>Penicillium flavigenum</i>	NR_103695.1
PX630693	R1	<i>Penicillium citrinum</i>	100	100	0	<i>Penicillium citrinum</i>	NR_121224.1
			99.37	96	0	<i>Penicillium hetheringtonii</i>	NR_111482.1
PX630695	R6	<i>Xylaria karsticola</i>	96.52	100	0	<i>Xylaria karsticola</i>	OQ457211.1
			90.87	84	1e-164	<i>Xylaria bambusicola</i>	NR_153200.1

El análisis filogenético respalda la identificación de *Leptosphaeria biglobosa* (Fig. 3), *Nemania rubi* y *Nemania diffusa* (Fig. 4), *Penicillium citrinum* (Fig. 5) y *Xylaria karsticola* (Fig. 6). Las cepas restantes se asignaron a los géneros *Apiospora*, *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Didymella* y *Penicillium*.

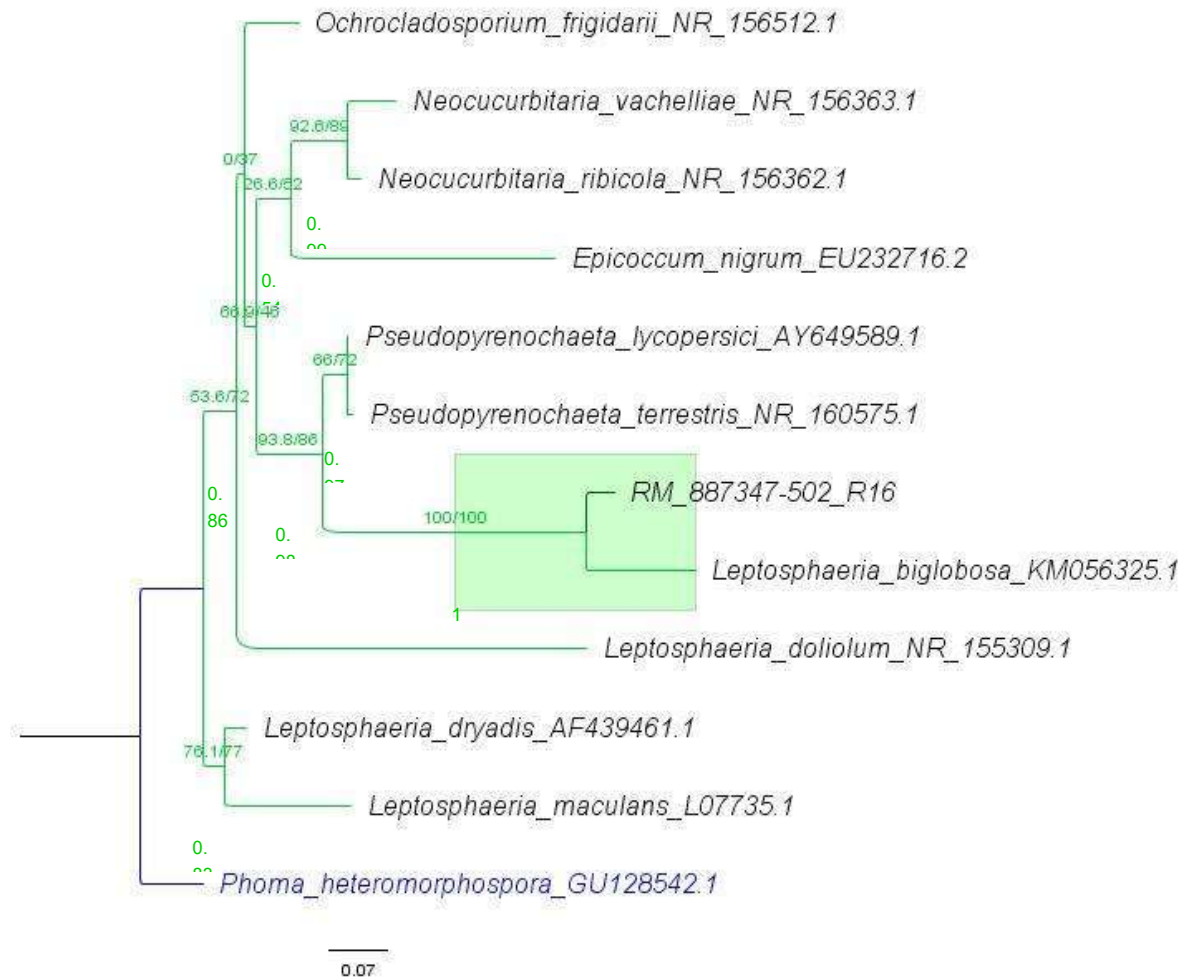


Figura 3. Árbol filogenético generado a partir de la secuencia del rDNA-ITS de la cepa R16 (*Leptosphaeria biglobosa*). El árbol se construyó utilizando el criterio de Máxima Verosimilitud (ML), con el modelo de sustitución TPM2+F+G4. La barra de escala representa 0.07 sustituciones por sitio. Los valores en los nodos indican el soporte de bootstrap (arriba de las ramas) y la probabilidad posterior (debajo de las ramas). Se utilizó *Phoma heteromorphospora* como taxón externo.

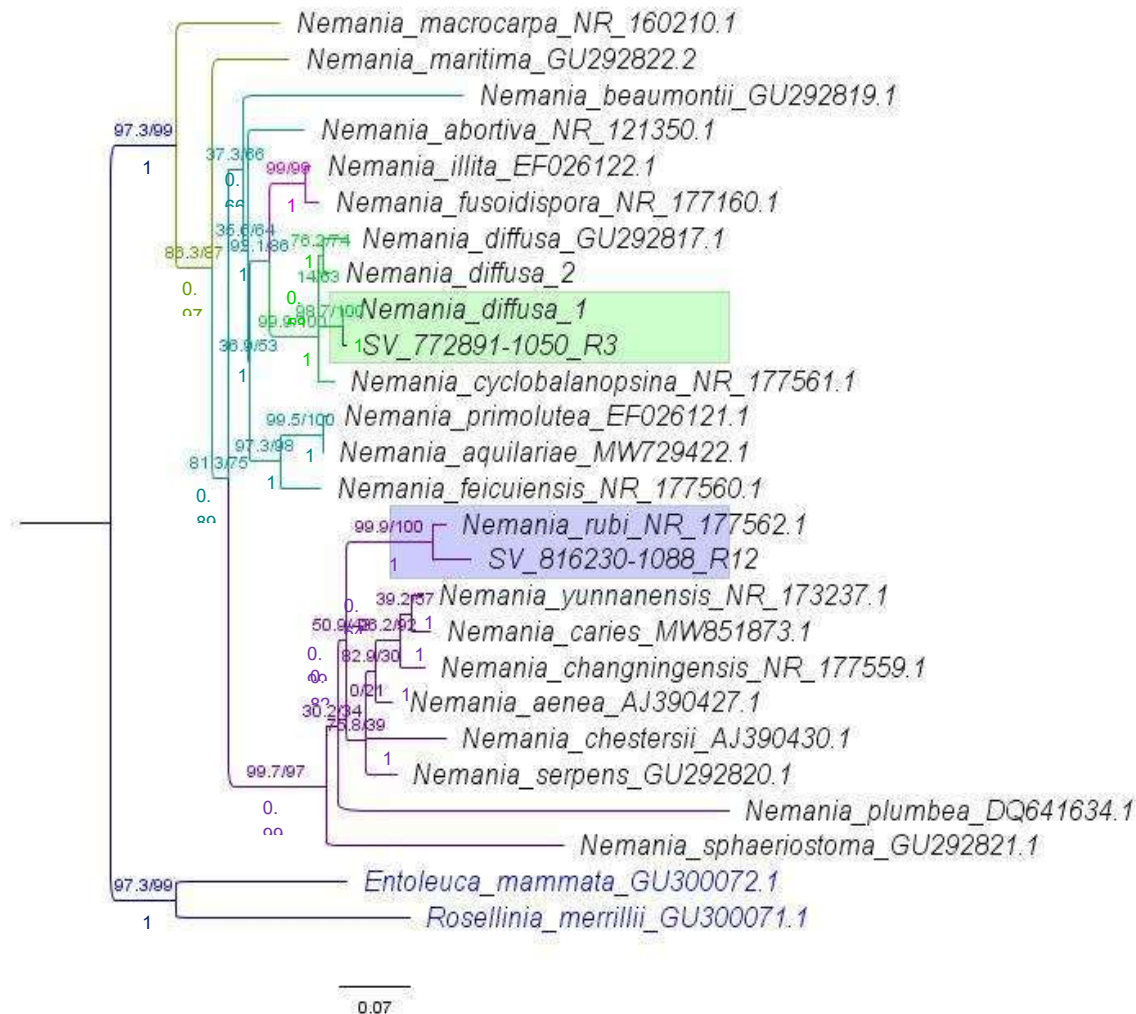


Figura 5. Árbol filogenético generado a partir de las secuencias del rDNA-ITS de las cepas R3 (*Nemanium rubi*) y R12 (*N. diffusa*). El árbol se construyó utilizando el criterio de Máxima Verosimilitud (ML), con el modelo de sustitución TIM3e+G4. La barra de escala representa 0.07 sustituciones por sitio. Los valores en los nodos indican el soporte de bootstrap (arriba de las ramas) y la probabilidad posterior (debajo de las ramas). Se utilizaron *Entoleuca mammata* y *Rosellinia merrillii* como taxones externos.

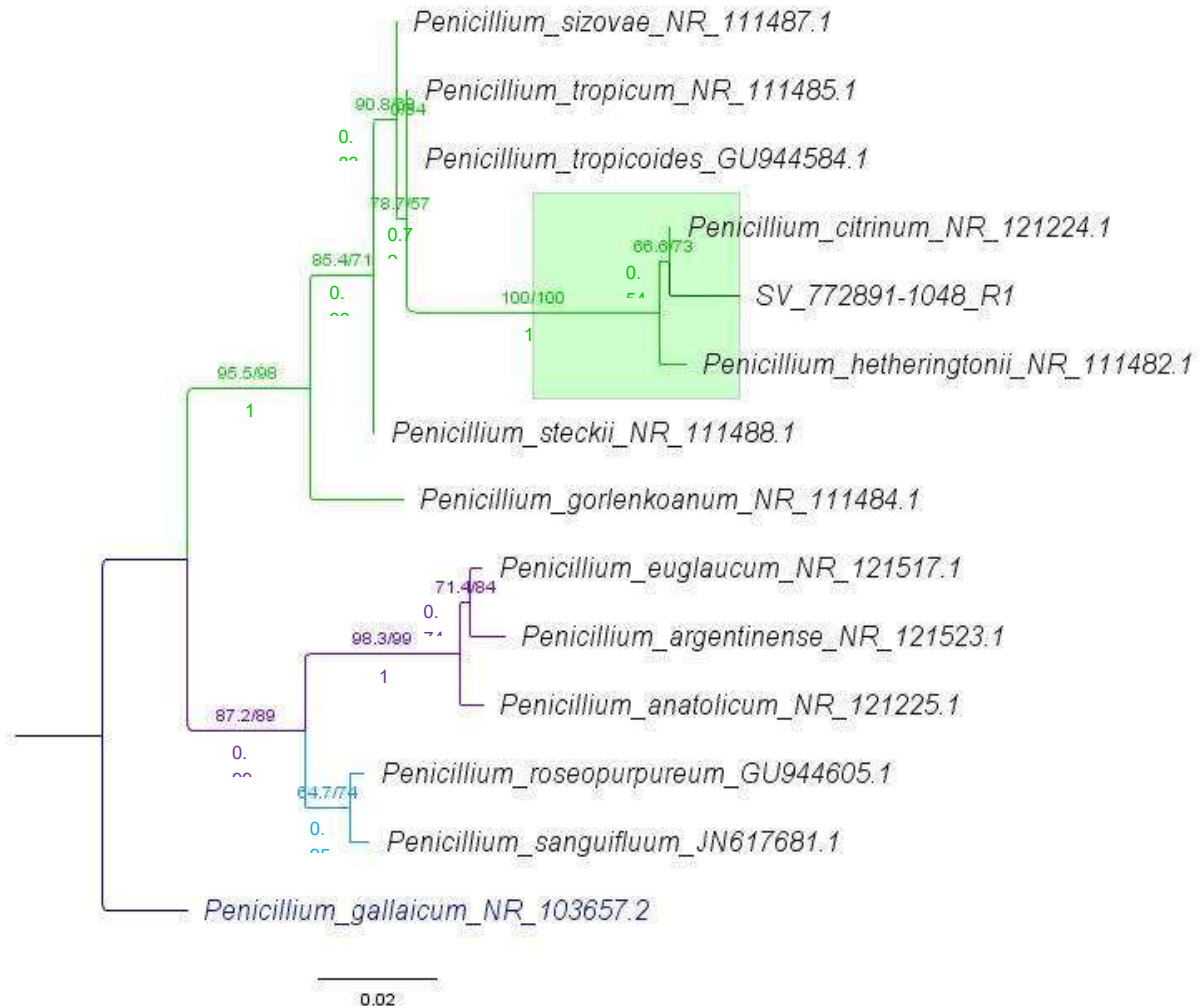


Figura 7. Árbol filogenético generado a partir de la secuencia del rDNA-ITS de la cepa R1 (*Penicillium citrinum*). El árbol se construyó utilizando el criterio de Máxima Verosimilitud (ML), con el modelo de sustitución TIM2+F+I. La barra de escala representa 0.02 sustituciones por sitio. Los valores en los nodos indican el soporte de bootstrap (arriba de las ramas) y la probabilidad posterior (debajo de las ramas). Se utilizó *Penicillium gallaicum* como taxón externo.

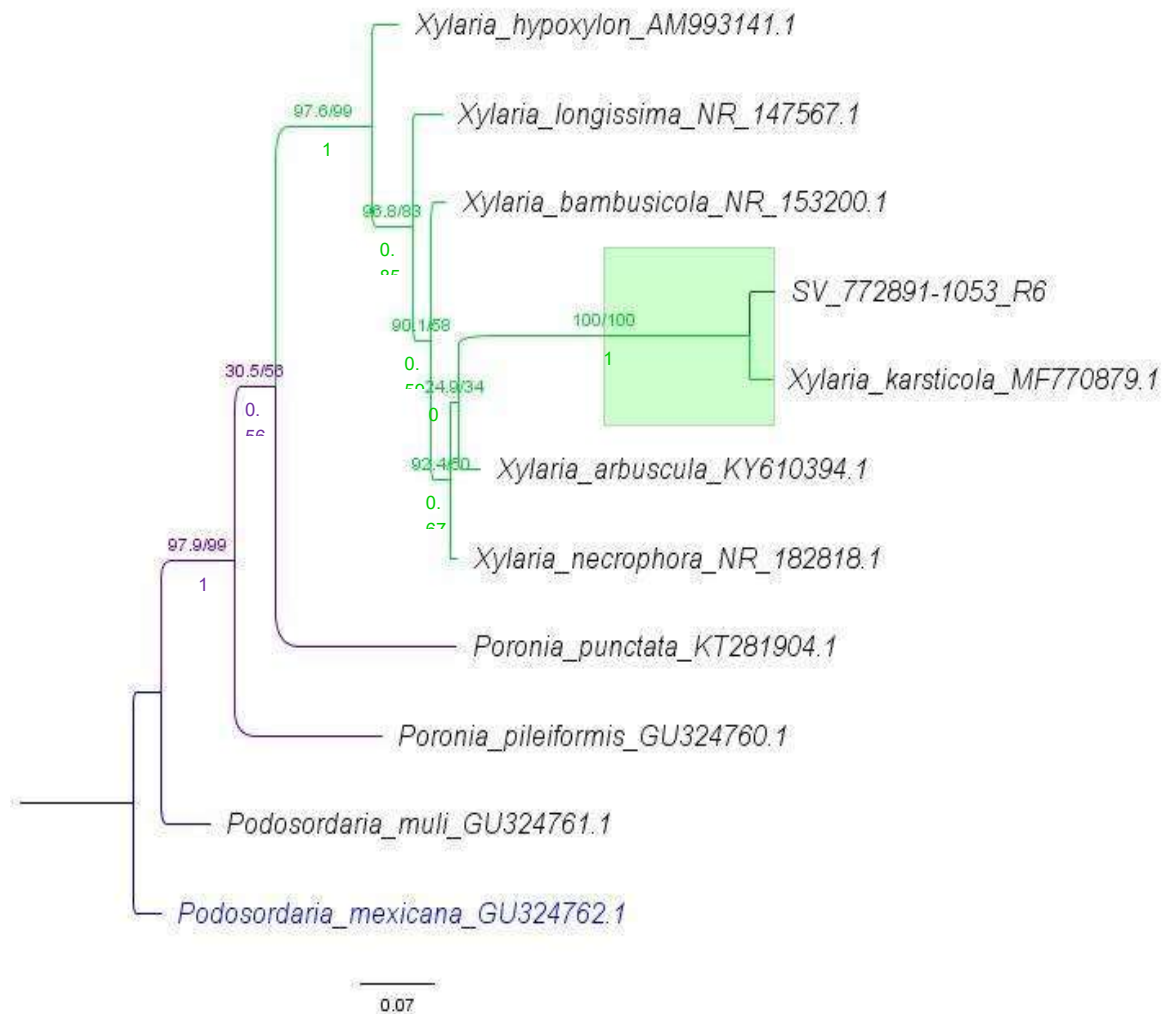


Figura 9. Árbol filogenético generado a partir de la secuencia del rDNA-ITS de la cepa R6 (*Xylaria karsticola*). El árbol se construyó utilizando el criterio de Máxima Verosimilitud (ML), con el modelo de sustitución TIM2e+G4. La barra de escala representa 0.07 sustituciones por sitio. Los valores en los nodos indican el soporte de bootstrap (arriba de las ramas) y la probabilidad posterior (debajo de las ramas). Se utilizó *Podosordaria mexicana* como taxón externo.

Dinámica de los hongos endófitos de *Rhynchostele cervantesii*

Las cepas fúngicas asociadas a los diferentes estadios de desarrollo de *R. cervantesii* (protocormos, individuos juveniles y plantas adultas) se muestran en la Tabla 2. *Apiospora* sp. fue el único taxón presente en todos los estadios de desarrollo, mientras que *Aspergillus* sp. se encontró únicamente en un individuo

juvenil y en una planta adulta. Los demás taxones mostraron distribuciones distintas según el estadio de desarrollo.

Tabla 2. Dinámica de las cepas fúngicas endófitas y putativas micorrízicas en las raíces de *Rhynchosstele cervantesii* a lo largo de las distintas categorías de desarrollo.

Developmental stage	<i>Apiospora</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Didymella</i> sp.	<i>Leptosphaeria biglobosa</i>	<i>Nemania diffusa</i>	<i>N. rubi</i>	<i>Penicillium</i> sp.	<i>P. citrinum</i>	<i>Xylaria karsticola</i>	J11S	Total
Protocorm	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	3
Juvenile	1	1	1	2	1	1	-	-	-	-	1	8
Adult	1	1	-	-	-	-	1	2	-	1	-	6

La diversidad fúngica a lo largo de los distintos estadios de desarrollo de *R. cervantesii* se evaluó mediante el índice de diversidad de Shannon (H') y el índice de Simpson ($1-D$), como se muestra en la Tabla 3. Se observó que la diversidad fúngica varió entre los distintos estadios. El estadio juvenil presentó la mayor diversidad ($H' = 2.14$; $1-D = 0.88$), seguido del estadio adulto ($H' = 1.89$; $1-D = 0.84$). El estadio de protocormo mostró la menor diversidad ($H' = 1.23$; $1-D = 0.66$).

Tabla 3. Diversidad de hongos endófitos y putativos micorrízicos asociados a las raíces de *R. cervantesii* en diferentes categorías de desarrollo. Índices de diversidad de Shannon (H') y Simpson ($1-D$).

Categorías de desarrollo	Shannon (H')	Simpson ($1-D$)
Protocormos	1.23	0.66
Juveniles	2.14	0.88
Adulta	1.89	0.84

Se aislaron ocho taxones fúngicos durante la temporada de lluvias y cuatro durante la temporada seca; únicamente un taxón, *Apiospora*, fue aislado en ambas temporadas (Tabla 4).

Tabla 4. Dinámica del número de cepas fúngicas endófitas y putativas micorrízicas de raíz de *R. cervantesii* bajo diferentes condiciones climáticas.

Taxa	EH1	ES1	EH2	ES2	Total
<i>Apiospora</i> sp.	2	-	1	1	4
<i>Aspergillus</i> sp.	-	1	-	1	2
<i>Diaporthe</i> sp.	1	-	-	-	1
<i>Didymella</i> sp.	-	-	2	-	2
<i>Leptosphaeria biglobosa</i>	-	1	-	-	1
<i>Nemania diffusa</i>	1	-	-	-	1
<i>N. rubi</i>	-	1	-	-	1
<i>Penicillium</i> sp.	2	-	-	-	2
<i>P. citrinum</i>	1	-	-	-	1
<i>Xylaria karsticola</i>	-	-	1	-	1
J11S	-	-	1	-	1

* EH1= época húmeda 1, ES1= época seca 1, EH2= época húmeda 2, ES2= época seca 2.

La diversidad fúngica de *R. cervantesii* bajo diferentes condiciones climáticas se representa en la Tabla 5. Los resultados indican un recambio de taxones fúngicos entre las distintas condiciones climáticas, con la mayor diversidad registrada durante el primer muestreo de la época húmeda (EH1) ($H' = 1.54$; $1-D = 0.77$), mientras que el segundo muestreo de la época seca (ES2) presentó la menor diversidad ($H' = 0.69$; $1-D = 0.50$). El mismo patrón se observó para la riqueza; siete cepas aisladas en EH1 y solo dos en ES2.

Tabla 5. Diversidad fúngica de *R. cervantesii* bajo diferentes condiciones climáticas.

Época	Shannon (H')	Simpson (1-D)	Riqueza
EH1	1.54	0.77	7
ES1	1.09	0.66	3

EH2	1.33	0.72	5
ES2	0.69	0.50	2

*EH1= época húmeda 1, ES1= época seca 1, EH2= época húmeda 2, ES2= época seca 2. Shannon (H') y Simpson (1-D) índices de diversidad.

Determinación de AIA (Ácido Indolacético)

Se observó que *Diaporthe* comenzó a producir AIA a partir del tercer día, alcanzando su máxima producción a los 14 días, con un promedio de 2.48 µg/mL de AIA (Fig. 7).

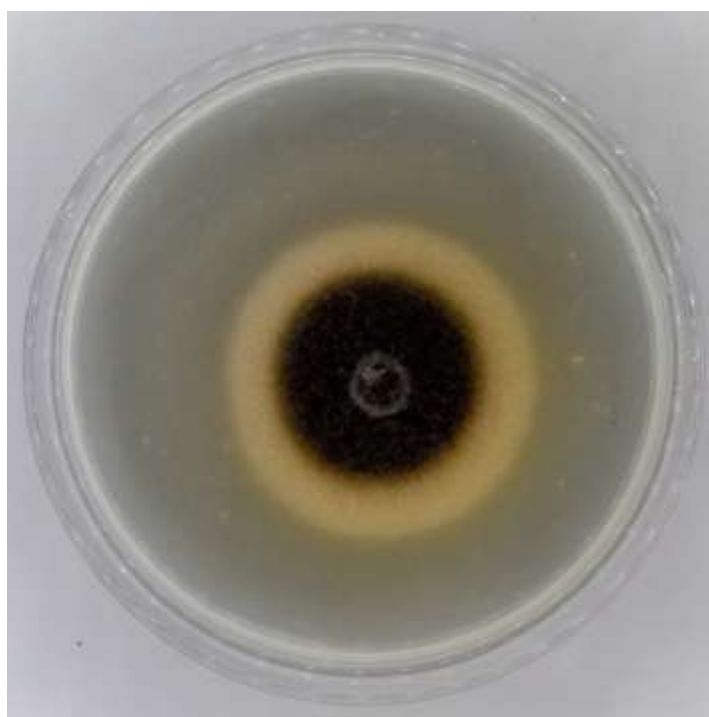


Figura 11. Cultivo de *Diaporthe* sp. en medio PDA, 7 días después de la siembra, a 25 °C. (Foto: J. Tonatiuh Gutiérrez Zavala).

5. DISCUSIÓN

Diversidad de hongos asociados a las raíces de *R. cervantesii*

En este estudio analizamos la diversidad de especies fúngicas cultivables asociadas a las raíces de la orquídea endémica *R. cervantesii*. Asimismo, evaluamos el

recambio en la composición de las especies identificadas a lo largo de los distintos estadios de desarrollo y entre estaciones. Todas las cepas fúngicas aisladas a partir de los pelotones presentes en el córtex radical pertenecen al filo Ascomycota y no a Basidiomycota, el grupo tradicionalmente reportado como el típico de los hongos micorrízicos en orquídeas (Graham y Dearnaley 2012; Martos *et al.* 2012; Novotná *et al.* 2018; Oberwinkler *et al.* 2017; Zi *et al.* 2014). Esta discrepancia podría deberse a una proporción relativamente baja de basidiomicetos en las raíces de *R. cervantesii*, en comparación con la dominancia de ascomicetos en estos tejidos.

Todos los géneros y especies fúngicas identificados en este estudio han sido previamente reportados como endófitos radicales de distintas especies de orquídeas. Por ejemplo, especies del género *Apiospora* han sido encontradas como endófitas en las raíces de la orquídea epífita *Dendrobium harveyanum* en el suroeste de China y el norte de Tailandia (Ma *et al.* 2022). Especies del género *Aspergillus* han sido detectadas como endófitas en raíces, pseudobulbos y hojas de las orquídeas epífitas *Bulbophyllum neilgherrense* y *Vanda testacea* (Sudheep y Sridhar 2012), así como en las raíces de *Caladenia formosa* (Huynh *et al.* 2009). Endófitos radicales del género *Diaporthe* han sido descritos en la orquídea epífita *Acampe praemorsa* (Deepthi y Ray 2018) y en la orquídea terrestre *Calanthe discolor* (Lee *et al.* 2024). En orquídeas, especies de *Penicillium* han sido reportadas como endófitas en las raíces de *Dendrobium longicornu* (Shah *et al.* 2022) y en hojas, pseudobulbos, raíces y flores de *Stanhopea tigrina* (Salazar-Cerezo *et al.* 2018), así como en la orquídea micoheterótrofa *Arachnitis uniflora* (Herrera *et al.* 2019). En cuanto al género *Didymella*, este ha sido previamente reportado como endófito en las raíces de la orquídea epífita *Holcoglossum flavescens* (Tan *et al.* 2012). Especies de *Nemania* han sido registradas como endófitas en diversas orquídeas epífitas, incluidos brotes y raíces de *Dendrobium* spp. (Ma *et al.* 2022), mientras que *Leptosphaeria biglobosa* ha sido encontrada en las raíces de la orquídea terrestre *Cephalanthera longibracteata* (Lee *et al.* 2017). Finalmente, especies del género *Xylaria* han sido documentadas como endófitos comunes en brotes y raíces de *Dichaea andina* (Alomía *et al.* 2022) y en orquídeas del género *Dendrobium* (Ma *et al.* 2022). De manera interesante, hasta donde tenemos

conocimiento, *Xylaria karsticola*, asociada en este estudio a las raíces de *R. cervantesii*, no ha sido reportada previamente como endófita de orquídeas u otras plantas.

En todos los grupos taxonómicos de hongos, los endófitos descritos aquí a nivel de género o especie han sido documentados como protectores de sus hospedadores frente a estreses bióticos y abióticos, y en varios de ellos se conoce la producción de metabolitos que promueven el crecimiento vegetal o inhiben el crecimiento de patógenos. Por ejemplo, especies de *Aspergillus* promueven el crecimiento de las plantas, presentan actividad antimicrobiana y producen toxinas como mecanismos de defensa frente a herbívoros (Khan *et al.* 2011; Salas-Marina *et al.* 2011; Sudheep y Sridhar 2012; Daigham *et al.* 2024). *Apiospora* spp. pueden producir una amplia gama de metabolitos secundarios, incluidos terpenoides, policétidos y péptidos no ribosomales (Overgaard *et al.* 2023). Asimismo, especies de los géneros *Didymella*, *Nemania* y *Penicillium* sintetizan metabolitos extracelulares con actividad antifúngica y antibacteriana (Hossain *et al.* 2007; Khan *et al.* 2015).

Al tratarse de una especie amenazada, es importante considerar los hongos asociados que puedan contribuir al crecimiento de *R. cervantesii*, tanto por su relevancia en el ambiente natural como por su potencial para el cultivo *in vitro*. Se ha reportado previamente que *Diaporthe hongkongensis*, aislada de las raíces de la orquídea terrestre *Calanthe discolor*, mejora el desarrollo vegetal en inoculaciones *in vitro* al incrementar el número y la longitud de las hojas, así como la formación de raíces (Lee *et al.* 2024). Además, Deepthi y Ray (2019) identificaron a *Diaporthe eucalyptorum* como un potente productor de AIA en *Acampe praemorsa*, lo que respalda su posible papel en la promoción del crecimiento vegetal. Basándose en estos antecedentes, en este estudio se realizó un ensayo complementario para evaluar la producción de AIA por la cepa de *Diaporthe* aislada, la cual mostró una producción de la fitohormona de 2.48 µg/mL. Por lo tanto, esta cepa fúngica es un candidato prometedor para ensayos de propagación *in vitro* de *R. cervantesii*.

Desde una perspectiva evolutiva, estos resultados son especialmente relevantes en el marco de la “Hipótesis de la Sala de Espera”, que propone que el endofitismo

constituye una etapa transicional en la evolución de las asociaciones micorrízicas. De acuerdo con este modelo, los hongos colonizaron inicialmente las raíces como simbiontes neutrales antes de desarrollar interacciones mutualistas completas, lo que refleja una transición gradual de un estilo de vida saprotrófico a uno simbiótico (Selosse *et al.* 2007; Thoen *et al.* 2020; Selosse *et al.* 2022). La dominancia de ascomicetos endófitos en *R. cervantesii* podría, por tanto, indicar una fase intermedia dentro de este continuo evolutivo, similar a lo observado en especies del género *Mycena*, que pueden exhibir comportamientos saprotróficos, endófitos o micorrízicos con orquídeas (Boberg *et al.* 2008; Ogura-Tsujita *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2012; Lorberau *et al.* 2017; Osono 2020).

Dinámica de los hongos asociados a las raíces de *R. cervantesii*

En *R. cervantesii* se observó un reemplazo parcial de micobiontes, de acuerdo con la definición propuesta por Ventre-Lespiauq *et al.* (2021), ya que la mayoría de las cepas fúngicas identificadas en sus raíces fueron sustituidas por otras a lo largo de los distintos estadios de desarrollo y bajo diferentes condiciones climáticas. No obstante, algunos taxones, como *Apiospora* sp. y *Aspergillus* sp., permanecieron presentes de manera constante en todas o en la mayoría de estas categorías y periodos de muestreo. La ontogenia de la planta ha sido identificada como un factor clave que influye en las asociaciones micorrízicas, lo que refleja posibles cambios en las demandas fisiológicas a lo largo del desarrollo (Wagner *et al.* 2014; McCormick *et al.* 2021). Sin embargo, esta relación solo ha sido demostrada en un estudio previo en orquídeas epífitas, específicamente en *Dichaea eburnea*, *Masdevallia nidifica* y *Oncidium klotzschianum* (Fernández *et al.* 2023). En contraste, algunas especies terrestres, como *Tipularia discolor*, conservan sus hongos simbiontes a lo largo de todo su ciclo de vida, mientras que otras, como *Cremastra appendiculata*, experimentan un recambio completo de sus hongos simbiontes (McCormick *et al.* 2021; Zahn *et al.* 2022).

En cuanto a la distribución de los hongos entre los estadios ontogenéticos, solo *Apiospora* sp. y *Penicillium citrinum* fueron aislados de protocormos. En contraste, se recuperaron siete taxones en plantas juveniles y seis en plantas adultas. El

reemplazo parcial de micobiontes ha sido descrito previamente en orquídeas epífitas como *Dichaea eburnea*, *Masdevallia nidifica* y *Oncidium klotzschianum*, donde se considera que este patrón ocurre a lo largo del desarrollo de la planta. En estos casos, algunas cepas persisten desde el estadio juvenil, mientras que nuevos simbiontes se incorporan durante la fase reproductiva (Fernández *et al.* 2023).

En *R. cervantesii* también se observó una disminución de la riqueza de micobiontes en función de las condiciones climáticas, con un mayor número de aislamientos fúngicos durante la primera época húmeda (EH1), cuando se recuperaron siete cepas, y una menor riqueza durante la segunda época seca (ES2), con solo dos aislamientos. Estos resultados indican una influencia estacional en la dinámica de las asociaciones micorrízicas de esta especie. Hallazgos similares han sido reportados para la orquídea terrestre *Anacamptis morio*, en la que las asociaciones micorrízicas varían entre estaciones. En contraste, otras especies como *Paphiopedilum spicerianum* no muestran cambios significativos en la composición fúngica asociados al clima (Han *et al.* 2016).

De manera interesante, *Apiospora* fue el único género presente en todos los estadios ontogenéticos y en ambos periodos climáticos, lo que sugiere que este taxón podría desempeñar un papel ecológico clave en *R. cervantesii*. Por ello, se justifica la realización de estudios adicionales para comprender plenamente los efectos de este hongo en plántulas y en estadios más avanzados de desarrollo, así como para evaluar su capacidad de producir compuestos promotores del crecimiento bajo condiciones naturales o controladas.

El estatus de *R. cervantesii* como especie amenazada y su potencial valor como planta ornamental justifican la realización de futuros estudios mediante técnicas de metabarcoding o de metagenómica, con el fin de comprender mejor la comunidad fúngica asociada a las raíces y la dinámica de su recambio. Sin embargo, este mismo estatus y su distribución geográfica limitada restringen considerablemente la capacidad de muestreo para realizar análisis ecológicos más profundos en esta orquídea de gran importancia.

6. CONCLUSIONES

Los géneros fúngicos a los que pertenecen las cepas descritas en este estudio pertenecen a la división Ascomycota y han sido reportados como endófitos de raíz en diversas especies de orquídeas epífitas y terrestres. De manera similar, la comunidad de hongos endófitos cultivables asociados a las raíces de *R. cervantesii* presenta fluctuaciones estacionales y relacionadas con el desarrollo. Los roles específicos que cada uno de estos grupos taxonómicos puede desempeñar en el establecimiento y la resistencia al estrés abiótico en *R. cervantesii* aún no han sido completamente dilucidados. De manera interesante, *Diaporthe* sp. destaca como una cepa capaz de favorecer el cultivo *in vitro* de la planta, mientras que *Apiospora* parece desempeñar un papel importante a lo largo de todo el ciclo de vida de esta especie en peligro de extinción.

7. LITERATURA CITADA

- Alomía YA, Otero JT, Jersáková J, Stevenson PR (2022) Cultivable fungal community associated with the tropical orchid *Dichaea andina*. *Fungal Ecology* 57: 101158. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2022.101158>.
- Ávila-Díaz I, Garibay-Orijel R, Magaña-Lemus RE, Oyama K (2013) Molecular evidence reveals fungi associated within the epiphytic orchid *Laelia speciosa* (HBK) SCHLTR. *Botanical Sciences* 91 (4): 523-529.
- Bhatti SK, Thakur M (2022) An Overview on Orchids and their Interaction with Endophytes. *The Botanical Review* 88: 485-504. <https://doi.org/10.1007/s12229-022-09275-5>.
- Beltrán-Nambo MA, Martínez-Trujillo M, Montero-Castro JC, Salgado-Garciglia R, Otero-Ospina JT, Carreón-Abud Y (2018) Fungal diversity in the roots of four epiphytic orchids endemic to Southwest Mexico is related to the breadth of plant distribution. *Rhizosphere* 7: 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.07.001>.

- Bertolini V, Cruz-Blasi J, Damon A, Valle-Mora J (2014) Seasonality and mycorrhizal colonization in three species of epiphytic orchids in southeast Mexico. *Acta Botanica Brasilica* 28(4): 512-518. 2014. <https://doi.org/10.1590/0102-33062014abb3436>.
- Boberg J, Finlay RD, Stenlid J, Näsholm T, Lindahl BD (2008) Glucose and ammonium additions affect needle decomposition and carbon allocation by the litter degrading fungus *Mycena epipterygia*. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 995-999. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.11.005>.
- Cevallos S, Sánchez-Rodríguez A, Decock C, Declerck S, Suárez JP (2017) Are there keystone mycorrhizal fungi associated to tropical epiphytic orchids?. *Mycorrhiza* 27(3): 225-232. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0746-8>.
- Chand K, Shah S, Sharma J, Paudel MR, Pant B (2020) Isolation, characterization, and plant growth-promoting activities of endophytic fungi from a wild orchid *Vanda cristata*. *Plant signaling & behavior* 15(5): 1744294. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1744294>.
- Chen L, Wang YC, Qin LY, He HY, Yu XL, Yang MZ, Zhang HB (2019) Dynamics of fungal communities during *Gastrodia elata* growth. *BMC Microbiology* 19(1): 158. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1501-z>.
- Cao X, Wang X, Wang T, Chen Y, Yao N (2022) Dynamic shifts in the root microbiota of cultivated *Paphiopedilum armeniacum* during different stages of growth. *Diversity* 14(5): 321. <https://doi.org/10.3390/d14050321>.
- Daigham GE, Mahfouz AY, Abdelaziz AM, Nofel MM, Attia MS (2024) Protective role of plant growth-promoting fungi *Aspergillus chevalieri* OP593083 and *Aspergillus egyptiacus* OP593080 as biocontrol approach against *Alternaria* leaf spot disease of *Vicia faba* plant. *Biomass Conversion and Biorefinery* 14(18): 23073-23089. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-04510-4>.

- Dearnaley JDW, Martos F, Selosse MA (2012) Orchid Mycorrhizas: Molecular Ecology, Physiology, Evolution and Conservation Aspects. Fungal Associations, 2nd Edition. The Mycota IX B. Hock (Ed.) P.p. 2007-230.
- Deepthi AS, Ray JG (2018) Endophytic diversity of hanging velamen roots in the epiphytic orchid *Acampe praemorsa*. *Plant Ecology & Diversity* 11(5-6): 649-661. <https://doi.org/10.1080/17550874.2019.1610911>.
- Deepthi AS, Ray JG (2019) Applications of endophytic-fungal-isolates from velamen root of wild orchids in floriculture. *Brazilian Journal of Biological Sciences* 6(14): 577-589.
- Durán C, Rivero M, Seemann P (2007) Identification of endomycorrhizae in the native orchid *Gavilea araucana* (Phil.) Correa. *Agro Sur* 35(2): 67-69. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2007.v35n2-32>.
- 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>.
- Espejo-Serna A, García-Cruz J, López-Ferrari AR, Jiménez-Machorro R, Sánchez-Saldaña L (2002) Orquídeas del estado de Morelos. *Orquídea* 16:1–332.
- Fernández M, Kaur J, Sharma J (2023) Co-occurring epiphytic orchids have specialized mycorrhizal fungal niches that are also linked to ontogeny. *Mycorrhiza* 33: 87-105. <https://doi.org/10.1007/s00572-022-01099-w>.
- Graham RR, Dearnaley JDW (2012) The rare Australian epiphytic orchid *Sarcochilus weinthalii* associates with a single species of *Ceratobasidium*. *Fungal Diversity* 54(1): 31-37. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0106-0>.
- Hágsater E, Soto MA, Salazar GA, Jiménez R, López MA, Dressler RL (2015) Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, A.C., México, D.F.
- Han JY, Xiao H, Gao J (2016) Seasonal dynamics of mycorrhizal fungi in *Paphiopedilum spicerianum* (Rchb. f) Pfitzer-A critically endangered orchid

- from China. *Global Ecology and Conservation* 6: 327-338. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.03.011>
- Herrera H, Soto J, de Bashan LE, Sampedro I, Arriagada C (2019) Root-associated fungal communities in two populations of the fully mycoheterotrophic plant *Arachnitis uniflora* phil.(Corsiaceae) in Southern Chile. *Microorganisms* 7(12): 586. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120586>.
- Hossain MM, Sultana F, Kubota M, Koyama H, Hyakumachi M (2007) The plant growth-promoting fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 induces resistance in *Arabidopsis thaliana* by activation of multiple defense signals. *Plant and cell physiology* 48(12): 1724-1736. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm144>.
- Huang M, Gao D, Lin L, Wang S, Xing S (2022) Spatiotemporal dynamics and functional characteristics of the composition of the main fungal taxa in the root microhabitat of *Calanthe sieboldii* (Orchidaceae). *BMC Plant Biology* 22(1): 556. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03940-y>.
- INEGI (2005) Serie III. Mapa de tipos de vegetación. Aguascalientes, Instituto de Estadística Geografía e Informática. <https://www.inegi.org.mx/temas/usosuelo/>. Accessed November 2021.
- Huynh TT, Thomson R, Mclean CB, Lawrie AC (2009) Functional and genetic diversity of mycorrhizal fungi from single plants of *Caladenia formosa* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 104(4): 757-765. doi:10.1093/aob/mcp153.
- Jasinge NU, Huynh T, Lawrie AC (2018) Changes in orchid populations and endophytic fungi with rainfall and prescribed burning in *Pterostylis revoluta* in Victoria, Australia. *Annals of Botany* 121(2): 321-334. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx164>.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20(4): 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>.

- Khan AL, Hamayun M, Kim YH, Kang SM, Lee JH, Lee IJ (2011) Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. *Process biochemistry* 46(2): 440-447. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.09.013>.
- Khan AL, Waqas M, Hussain J, Al-Harrasi A, Hamayun M, Lee, IJ (2015) Phytohormones enabled endophytic fungal symbiosis improve aluminum phytoextraction in tolerant *Solanum lycopersicum*: An examples of *Penicillium janthinellum* LK5 and comparison with exogenous GA3. *Journal of Hazardous Materials* 295: 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.04.008>.
- Khamchatra N, Dixon K, Chayamarit K, Apisitwanich S, Tantiwiwata S (2016) Using *in situ* seed baiting technique to isolate and identify endophytic and mycorrhizal fungi from seeds of a threatened epiphytic orchid, *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f. (Orchidaceae). *Agriculture and Natural Resources* 50(1): 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.01.002>.
- Lee BH, Kwon WJ, Kim JY, Park JS, Eom AH (2017) Differences among endophytic fungal communities isolated from the roots of *Cephalanthera longibracteata* collected from different sites in Korea. *Mycobiology* 45(4): 312-317. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.312>.
- Lee SM, Park H, Eom AH (2024) Effects of Inoculation with Symbiotic Fungi Isolated from Orchid Roots on the Growth of *Calanthe discolor* Seedlings. *The Korean Journal of Mycology* 52(4), 293-299. <https://doi.org/10.4489/kjm.520408>.
- Li T, Yang W, Wu S, Selosse MC, Gao J (2021) Progress and Prospects of Mycorrhizal Fungal Diversity in Orchids. *Frontiers in Plant Science* 12: 1-20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.646325>.
- Li Y, Kang Z, Zhang X, Sun P, Jiang X, Han Z (2021) The mycorrhizal fungi of *Cymbidium* promote the growth of *Dendrobium officinale* by increasing

- environmental stress tolerance. *PeerJ* 9: e12555. <https://doi.org/10.7717/peerj.12555>.
- Li Z, Ye Y, Wang X, Peng S, Chen B, Li S, Li M, *et al* (2025) Mycorrhizal fungus BJ1, a new species of *Tulasnella* sp.: its biological characteristics and promoting effect on seed germination of *Bletilla striata*. *Frontiers in Plant Science* 16: 1542585. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1542585>.
- Liu N, Jacquemyn H, Liu Q, Shao SC, Ding G, Xing X (2022) Effects of a dark septate fungal endophyte on the growth and physiological response of seedlings to drought in an epiphytic orchid. *Frontiers in Microbiology* 13: 961172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.961172>.
- Lorberau KE, Botnen SS, Mundra S, Aas AB, Rozema J, Eidesen PB, Kauserud H (2017) Does warming by open-top chambers induce change in the root associated fungal community of the arctic dwarf shrub *Cassiope tetragona* (Ericaceae)? *Mycorrhiza* 27: 513–524. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0767-y>.
- Ma X, Chomnunti P, Doilom M, Daranagama DA, Kang J (2022) Multigene phylogeny reveals endophytic Xylariales novelties from *Dendrobium* species from Southwestern China and Northern Thailand. *Journal of Fungi* 8(3): 248. <https://doi.org/10.3390/jof8030248>.
- Ma X, Kang J, Nontachaiyapoom S, Wen T, Hyde KD (2015) Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids. *Current Science* 72-87.
- Martos F, Munoz F, Pailler T, Kottke I, Gonneau C, Selosse MA (2012) The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology* 21: 5098-5109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05692.x>.
- May M, Jąkowski M, Novotná A, Dietel J, Ayasse M, Lallemand F, Figura T, Minasiewicz J, Selosse MA (2020) Three-year pot culture of *Epipactis helleborine* reveals autotrophic survival, without mycorrhizal networks, in a

- mixotrophic species. *Mycorrhiza* 30(1): 51-61. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00932-4>.
- McCormick M, Burnett R, Whigham D (2021) Protocorm-supporting fungi are retained in roots of mature *Tipularia discolor* orchids as mycorrhizal fungal diversity increases. *Plants* 10(6), 1251. <https://doi.org/10.3390/plants10061251>.
- McCormick MK, Jacquemyn H (2014) What constrains the distribution of orchid populations?. *New Phytologist* 202: 392-400. <https://doi.org/10.1111/nph.12639>.
- Mosquera-Espinosa AT, Bayman P, Otero JT (2010) *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronómica* 59(3): 316-326.
- Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ (2015) IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32:268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>.
- Novotná A, Benítez A, Herrera P, Cruz D, Filipczykova E, Suárez JP (2018) High diversity of root-associated fungi isolated from three epiphytic orchids in southern Ecuador. *Mycoscience* 59(1): 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.07.007>.
- Oberwinkler F, Cruz D, Suárez JP (2017) Biogeography and ecology of Tulasnellaceae. In: Tedersoo L (ed) Biogeography of mycorrhizal symbiosis. *Ecological Studies*, vol 230. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_12.
- Ogura-Tsujita Y, Gebauer G, Hashimoto T, Umata H, Yukawa T (2009). Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276(1657): 761-767. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1225>.

- Ortega-Larrocea MP (2008) Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de restauración edafocológica. pp. 85-96. En: Álvarez-Sánchez, J. y Monroy-Ata, A. (Comp.). Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración. Facultad de Ciencias, UNAM. México D. F.
- Osono T (2020) Functional diversity of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecological Research*, 35: 30-43. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12063>.
- Overgaard ML, Aalborg T, Zeuner EJ, Westphal KR, Lau FA, Nielsen VS, *et al.* (2023) Quick guide to secondary metabolites from *Apiospora* and *Arthrinium*. *Fungal Biology Reviews* 43: 100288. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2022.10.001>.
- Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8): 3795–3801. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002>.
- Phillips RD, Reiter N, Peakall R (2020) Orchid conservation: from theory to practice. *Annals of Botany*. 126(3): 345-362. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa093>.
- Qin J, Zhang W, Ge ZW, Zhang SB (2019) Molecular identifications uncover diverse fungal symbionts of *Pleione* (Orchidaceae). *Fungal Ecology* 37:19-29. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.10.003>.
- Rambaut A (2009) FigTree v1. 3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rasmussen HN, Dixon KW, Jersáková J, Tešitelová T (2015) Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of Botany* 116: 391-402. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv087>.
- Reiter N, Phillips RD, Swarts ND, Wright M, Holmes G, Sussmilch FC, *et al.* (2020) Specific mycorrhizal associations involving the same fungal taxa in common

- and threatened *Caladenia* (Orchidaceae): implications for conservation. *Annals of Botany* 126(5): 943-955. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa116>.
- Riofrío ML, Cruz D, Torres E, de la Cruz M, Iriondo JM, Suárez JP (2013) Mycorrhizal preferences and fine spatial structure of the epiphytic orchid *Epidendrum rhopalostele*. *American Journal of Botany* 100(12): 2339-2348. <https://doi.org/10.3732/ajb.1300069>.
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61(3): 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- Salas-Marina MA, Silva-Flores MA, Cervantes-Badillo MG, Rosales-Saavedra MT, Islas-Osuna MA, Casas-Flores S (2011) The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *J Microbiol Biotechnol* 21(7): 686-96. <https://doi.org/10.4014/jmb.1101.01012>.
- Salazar-Cerezo S, Martinez-Montiel N, Cruz-Lopez MDC, Martinez-Contreras RD (2018) Fungal diversity and community composition of culturable fungi in *Stanhopea trigrina* cast gibberellin producers. *Frontiers in microbiology* 9: 612. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00612>.
- Sathiyadash K, Muthukumar T, Karthikeyan V, Rajendran K (2020) Orchid mycorrhizal fungi: structure, function, and diversity. In S. M. Khasim, S.N. Hegde, M. T. González-Arno, K. Thammasiri (Edits). *Orchid biology: recent trends & challenges*. Springer Singapore. pp. 239-280. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9456-1_13.
- Selosse MA, Petrolli R, Mujica MI, Laurent L, Perez-Lamarque B, Figura T, Bourceret A, Jacquemyn H, Li T, Gao J, Minasiewicz J, Martos F (2022) The waiting room hypothesis revisited by orchids: were orchid mycorrhizal fungi

- recruited among root endophytes? *Annals of Botany* 129(3): 259-270.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcab134>.
- Selosse M.A, Setaro S, Glatard F, Richard F, Urcelay C, Weiß M (2007) Sebaciniales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist* 174: 864–878. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02064.x>.
- Shah S, Shah B, Sharma R, Rekadwad B, Shouche YS, Sharma J, Pant B (2022) Colonization with non-mycorrhizal culturable endophytic fungi enhances orchid growth and indole acetic acid production. *BMC Microbiology* 22(1): 101. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02507-z>.
- SNIB (2016) Orquídea Lirio (*Rhynchoatele cervantesii*). Colaboración de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Naturalista. <http://www.naturalista.mx/taxa/206214-Rhynchoatele-cervantesii>. Accessed April 2022.
- Soto-Arenas MA, Solano-Gómez AR (2007) *Ficha técnica de Rhynchoatele cervantesii*. En: Soto-Arenas M. A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoín & Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A. C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México, D.F.
- Sudheep NM, Sridhar KR (2012) Non-mycorrhizal fungal endophytes in two orchids of Kaiga forest (Western Ghats), India. *Journal of Forestry Research* 23: 453-460. <https://doi.org/10.1007/s11676-012-0284-y>.
- Tan XM, Chen XM, Wang CL, Jin XH, Cui JL, Chen J, Guo SX, Zhao LF (2012) Isolation and identification of endophytic fungi in roots of nine *Holcoglossum* plants (Orchidaceae) collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan provinces of China. *Current Microbiology* 64(2): 140-147. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-0045-8>.

- Thoen E, Harder CB, Kauserud H, Botnen SS, Vik U, Taylor AF, Skrede I (2020) *In vitro* evidence of root colonization suggests ecological versatility in the genus *Mycena*. *New Phytologist* 227: 601-612. <https://doi.org/10.1111/nph.16545>.
- Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research* 44(W1): W232–W235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>.
- Ventre-Lespiauq A, Jacquemyn H, Rasmussen HN, Méndez M (2021) Temporal turnover in mycorrhizal interactions: a proof of concept with orchids. *New Phytologist* 230(5): 1690-1699. <https://doi.org/10.1111/nph.17291>.
- Wagner MR, Lundberg DS, Coleman-Derr D, Tringe SG, Dangl JL, Mitchell-Olds T (2014) Natural soil microbes alter flowering phenology and the intensity of selection on flowering time in a wild *Arabidopsis* relative. *Ecology letters* 17(6): 717-726. <https://doi.org/10.1111/ele.12276>.
- Wen S, Hao X, Song J (2025) The Characteristics of Rhizosphere and Endophytic Fungi in Two Wild *Cymbidium* Orchid Species from the Qinling Mountains. *Rhizosphere* 101125. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2025.101125>.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky T.J. White, Editors. Academic Press, Inc., New York. pp. 315–322.
- Xing X, Gao Y, Zhao Z, Waud M, Duffy KJ, Selosse MA, Jakalski M, Liu N, Jacquemyn H, Guo S (2020) Similarity in mycorrhizal communities associating with two widespread terrestrial orchids decays with distance. *Journal of Biogeography* 47(2): 421-433. <https://doi.org/10.1111/jbi.13728>.
- Ye W, Jiang J, Lin Y, Yeh KW, Lai Z, Xu X, Oelmüller R (2019) Colonisation of *Oncidium* orchid roots by the endophyte *Piriformospora indica* restricts *Erwinia chrysanthemi* infection, stimulates accumulation of NBS-LRR resistance gene

- transcripts and represses their targeting micro-RNAs in leaves. *BMC Plant Biology* 19(1): 601. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2105-3>.
- Yokoya K, Zettler LW, Kendon JP, Bidartondo MI, Stice AL, Skarha S, Corey LL, Knight AC, Sarasan V (2015) Preliminary findings on identification of mycorrhizal fungi from diverse orchids in the Central Highlands of Madagascar. *Mycorrhiza* 25(8): 611-625. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0635-6>.
- Zahn FE, Lee YI, Gebauer G (2022) Fungal association and root morphology shift stepwise during ontogenesis of orchid *Cremastra appendiculata* towards autotrophic nutrition. *AoB Plants*, 14(3): 1-10. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plac021>.
- Zhang L, Chen J, Lv Y, Gao C, Guo S (2012) *Mycena* sp., a mycorrhizal fungus of the orchid *Dendrobium officinale*. *Mycological Progress* 11(2): 395-401. <https://doi.org/10.1007/s11557-011-0754-1>.
- Zhao DK, Selosse MA, Wu L, Luo Y, Shao SC, Ruan YL (2021) Orchid reintroduction based on seed germination-promoting mycorrhizal fungi derived from protocorms or seedlings. *Frontiers in plant science* 12: 701152. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.701152>.
- Zeng X, Diao H, Ni Z, Shao L, Jiang K, Hu C *et al.* (2020) Temporal variation in community composition of root associated endophytic fungi and carbon and nitrogen stable isotope abundance in two *Bletilla species* (Orchidaceae). *Plants* 10(1): 18. <https://doi.org/10.3390/plants10010018>.
- Zettler LW, Corey LL (2018) Orchid Mycorrhizal Fungi: Isolation and Identification Techniques. Capítulo 2, P.p 27-58. Yung-I Lee and Edward Chee-Tak Yeung (eds.), Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses-Methods and Protocols, Springer Protocols Handbooks, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_2.

- Zettler LW, Corey LL, Richardson LW, Ross AY, Moller-Jacobs L (2011) Protocorms of an epiphytic orchid (*Epidendrum amphistomum* A. Richard) recovered *in situ*, and subsequent identification of associated mycorrhizal fungi using molecular markers. *European Journal of Environmental Sciences* 1(2). <https://doi.org/10.14712/23361964.2015.53>.
- Zettler LW, Sharma J, Rasmussen F (2003) Mycorrhizal diversity (Chapter 11, pp 185–203). In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ (eds) Orchid conservation. Natural History Publications, Kota Kinabalu, pp 205–226. (ISBN 983-812-078-2).
- Zi XM, Sheng CL, Goodale UM, Shao SC, Gao JY (2014) *In situ* seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 24(7), 487-499. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0565-8>.

CAPÍTULO IV

Efecto de los hongos asociados a la raíz de *Rhyncho스테le cervantesii* en la germinación de sus semillas y desarrollo de plántulas

1. RESUMEN

Las semillas de las orquídeas, son extremadamente pequeñas y pobres en reservas nutricionales, lo que impide su germinación natural sin la asociación obligada con hongos micorrízicos, también fundamentales para el establecimiento de plántulas. El presente estudio evaluó el efecto de los hongos asociados a la raíz de *R. cervantesii* sobre la germinación de semillas y el desarrollo *in vitro* de plántulas de la misma especie. Llevando a cabo la germinación simbiótica con hongos aislados de pelotones de los géneros *Apiospora*, *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Didymella*, *Nemania*, *Penicillium* y *Xylaria*. La germinación se registró cada 30 días mediante la observación microscópica de 100 semillas por tratamiento. Se inocularon plántulas con *Apiospora* sp., *Diaporthe* sp., *Nemania* sp., *Penicillium* sp., *Leptosphaeria biglobosa* y J11S (no identificada), para evaluar su influencia en el desarrollo temprano. También se registró el crecimiento de estructuras aéreas y raíces, así como la formación de nuevos brotes. Para confirmar la formación de pelotones, se examinó una raíz de dos plantas por tratamiento. *Nemania diffusa* y *Diaporthe* sp. promovieron la germinación a los 90 días, con 44% y 12%, respectivamente. Las cepas J11S y *Penicillium* sp. favorecieron el desarrollo foliar y el incremento del tamaño del pseudobulbo, mientras que *Diaporthe* sp. estimuló la formación y el crecimiento de los brotes. Se detectaron pelotones en todos los tratamientos, excepto en el control. Estos resultados sugieren que J11S y *Penicillium* sp. contribuyen significativamente al desarrollo de plántulas de *R. cervantesii*, y destacan a *Diaporthe* sp. como un hongo potencialmente clave por su efecto combinado en la germinación y la formación de brotes.

Palabras clave: *Diaporthe*, germinación simbiótica, hongos endófitos, pelotones.

1. ABSTRACT

Orchid seeds are extremely small and contain minimal nutritional reserves, preventing their natural germination without an obligate association with mycorrhizal fungi, which are also essential for seedling establishment. This study evaluated the effect of root-associated fungi of *R. cervantesii* on seed germination and *in vitro* seedling development of the same species. Symbiotic germination was carried out using fungal isolates from pelotons belonging to the genera *Apiospora*, *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Didymella*, *Nemania*, *Penicillium*, and *Xylaria*. Germination was recorded every 30 days by microscopic observation of 100 seeds per treatment. Seedlings were also inoculated with *Apiospora* sp., *Diaporthe* sp., *Nemania* sp., *Penicillium* sp., *Leptosphaeria biglobosa*, and the unidentified strain J11S to assess their influence on early development. Growth of aerial structures and roots, as well as the formation of new shoots, was documented. To confirm peloton formation, one root from each of two plants per treatment was examined. *Nemania diffusa* and *Diaporthe* sp. promoted germination at 90 days, reaching 44% and 12%, respectively. Strains J11S and *Penicillium* sp. enhanced leaf development and pseudobulb enlargement, whereas *Diaporthe* sp. stimulated shoot initiation and growth. Pelotons were detected in all treatments except the control. These results suggest that J11S and *Penicillium* sp. contribute significantly to the early development of *R. cervantesii* seedlings and identify *Diaporthe* sp. as a potentially key fungus due to its combined effects on germination and shoot formation.

Keywords: *Diaporthe*, symbiotic germination, endophytic fungi, pelotons.

2. INTRODUCCIÓN

Se reconoce ampliamente que las orquídeas dependen de una asociación simbiótica con hongos para la germinación de sus semillas, ya que estas carecen de reservas nutricionales. Esta asociación, conocida como micorriza, presenta un patrón característico de colonización en las orquídeas: las hifas fúngicas penetran en las células corticales de la raíz y forman espirales intracelulares denominadas pelotones, que funcionan como sitios de intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta (Selosse *et al.*, 2011; Hágsater *et al.*, 2015; Zettler & Corey, 2018; Yeh *et al.*, 2019). Este intercambio involucra principalmente carbono y minerales, especialmente en las etapas tempranas del desarrollo (Dearnaley *et al.*, 2016). La observación de estas características morfológicas, en particular la formación de pelotones en plántulas, se ha utilizado como indicador del establecimiento de la simbiosis, como se ha documentado en *Dendrobium officinale* (Tan *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2022).

Dada la importancia de las asociaciones micorrízicas en la germinación de semillas de orquídeas, se han desarrollado medios de cultivo inoculados con hongos simbióticos para promover la germinación *in vitro*, una técnica conocida como germinación simbiótica (Kauth *et al.*, 2008; Pujasatria *et al.*, 2020). Knudson (1921) fue pionero en el desarrollo de medios asépticos para este propósito, aunque Bernard (1899) ya había propuesto métodos de germinación mediante simbiontes naturales. Posteriormente, Warcup (1981) logró aislar hongos micorrízicos de diversas orquídeas silvestres para inducir la germinación *in vitro*.

Desde entonces, numerosos estudios han explorado la germinación simbiótica *in vitro* en orquídeas terrestres como *Cynorkis purpurea*, *Chloraea chrysantha*, *C. gaviu*, *C. blettioides*, *C. crispa*, *C. longipetala*, *C. grandiflora*, *Bipinnula fimbriata*, *Gymnadenia conopsea* y especies de los géneros *Anacamptis*, *Dactylorhiza* y *Eulophia*, utilizando medios a base de avena en diferentes concentraciones (Ochora *et al.*, 2001; Rafter *et al.*, 2016; Herrera *et al.*, 2016; Çiğ *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2020). Otro medio comúnmente empleado es el agar-agua sin nutrientes, aplicado en especies como *Goodyera repens*, *Dactylorhiza fuchsii* y *Orchis mascula* (Alghamdi, 2017).

En orquídeas epífitas, la germinación simbiótica también se ha documentado en especies como *Epidendrum nocturnum*, *Paphiopedilum villosum*, *Dendrobium officinale*, *D. lindleyi*, *D. fimbriatum*, *D. findlayanum*, *D. chrysotoxum*, *D. aphyllum* y *D. moniliforme*, usando medios básicos de avena inoculados con diversos hongos micorrízicos (Zettler *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2014; Zi *et al.*, 2014; Khamchatra *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017; Mala *et al.*, 2017; Meng *et al.*, 2019; Shao *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020). En *Tolumnia variegata*, Otero *et al.* (2005) emplearon un medio de agar de celulosa modificado (Clements, 1982), mientras que en *Paphiopedilum barbigerrum* se utilizó medio PDA (Potato Dextrose Agar) inoculado con *Epulorhiza* sp. y *Tulasnella calospora* (Tian *et al.*, 2022).

En general, la mayoría de los estudios han utilizado cepas fúngicas micorrízicas del filo Basidiomycota, principalmente de las familias Tulasnellaceae y Ceratobasidiaceae, tanto en especies terrestres (Stewart & Kane, 2006; Johnson *et al.*, 2007; Çiğ *et al.*, 2018) como en epífitas (Khamchatra *et al.*, 2016; Mala *et al.*, 2017; Shao *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2022). No obstante, hongos del filo Ascomycota también han sido empleados en experimentos de germinación simbiótica con orquídeas terrestres y epífitas, por ejemplo, cepas de *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. y *Alternaria* sp, (Khamchatra *et al.*, 2016; Çiğ *et al.*, 2018).

La germinación simbiótica *in situ* también se ha implementado en orquídeas terrestres como *Anacamptis pyramidalis*, *Gymnadenia conopsea*, *Orchis mascula* y *Platanthera bifolia*, colocando trampas de semillas con distintos aislamientos fúngicos (en agar o paja esterilizada) directamente sobre el sustrato (Těšitelová *et al.*, 2022). De manera similar, se han realizado estudios *in situ* en especies epífitas, como *Dendrobium devonianum*, mediante la aplicación de una suspensión de semillas con inoculantes micorrízicos sobre troncos de *Camellia assamica* (Shao *et al.*, 2017).

La obtención de hongos compatibles que promuevan tanto la germinación simbiótica como el desarrollo de plántulas es un aspecto clave de los programas de conservación basados en semillas (Meng *et al.*, 2019). En condiciones naturales, los hongos micorrízicos son esenciales para el establecimiento exitoso de plántulas

de orquídeas (Ávila-Díaz *et al.*, 2013; McCormick & Jacquemyn, 2014; Rasmussen *et al.*, 2015).

En especies del género *Dendrobium*, como *D. aphyllum*, *D. candidum*, *D. exile* y *D. officinale*, se ha reportado que la inoculación fúngica mejora significativamente el desarrollo de plántulas propagadas *in vitro* (Gao & Guo, 1994; Tan *et al.*, 2014; Zi *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022). De igual manera, en orquídeas terrestres como *Anoectochilus roxburghii* y *Arundina graminifolia*, tanto hongos micorrízicos como endófitos han demostrado efectos positivos sobre el crecimiento de plántulas (Gao & Guo, 1994; Meng *et al.*, 2019).

Algunas cepas fúngicas aisladas de raíces de orquídeas se han identificado como productoras de reguladores del crecimiento vegetal. Por ejemplo, *Diaporthe eucalyptorum* se ha reportado como un productor eficiente de ácido indol-3-acético (IAA), lo que sugiere un posible papel en la promoción del crecimiento de *Acampe praemorsa* (Deepthi and Ray, 2019). En *Stanhopea tigrina*, especies del género *Penicillium* han demostrado producir giberelinas (Salazar-Cerezo *et al.*, 2018), que podrían estar involucradas en procesos de crecimiento y de tolerancia al estrés (Khan *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 2019).

En este contexto, es esencial seguir desarrollando investigaciones centradas en la germinación simbiótica de semillas y en la evaluación de los efectos de hongos micorrízicos sobre el desarrollo de plántulas (Riofrío *et al.*, 2013; Zi *et al.*, 2014; Yokoya *et al.*, 2015; Novotná *et al.*, 2018). Se debe considerar el potencial de hongos posiblemente micorrízicos del filo Ascomycota, ya que podrían desempeñar un papel relevante en la germinación y desarrollo de orquídeas (Ávila-Díaz *et al.*, 2013; May *et al.*, 2020; Xing *et al.*, 2020).

Estos hongos son particularmente importantes para orquídeas epífitas que habitan ambientes variables y a menudo adversos, como *Rhynchostele cervantesii*, una especie endémica y amenazada de México. El presente estudio forma parte de un proyecto más amplio sobre la ecología de *R. cervantesii*, que incluye la caracterización de hongos asociados a lesiones (Cervantes-Uribe, 2018), su sistema de apareamiento y éxito reproductivo (Magaña-Lemus *et al.*, 2021), y la investigación en curso sobre hongos micorrízicos y endófitos (Magaña-Lemus *et al.*,

en revisión). En esta última línea de trabajo se describió el patrón de colonización micorrízica a lo largo de las raíces de plantas juveniles y adultas bajo diferentes condiciones climáticas. Además, se analizó la relación entre la micorrización y diversos factores abióticos, evaluando su influencia en la viabilidad de las semillas, el desarrollo de plántulas y la supervivencia de las plantas *in situ*. También se llevó a cabo la identificación molecular de los hongos asociados a las raíces, lo que permite avanzar en la comprensión de la dinámica de la simbiosis micorrízica en *R. cervantesii*. Los hongos aislados de pelotones, considerados micorrízicos o putativamente micorrízicos, se emplean en este estudio para evaluar sus efectos en las primeras etapas del ciclo de vida de *R. cervantesii*.

Con base en lo anterior, se planteó la siguiente hipótesis: los hongos aislados de pelotones obtenidos de raíces de *R. cervantesii in situ* influyen positiva y significativamente en la germinación de semillas y en el desarrollo temprano de plántulas bajo condiciones *in vitro*.

Con el objetivo de contribuir a una mejor comprensión de la relación entre orquídeas epífitas y hongos endófitos y, putativamente micorrízicos, el presente estudio tuvo como objetivo analizar el efecto de los hongos aislados de pelotones obtenidos *in situ* de raíces de *R. cervantesii* sobre la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas.

La realización de estudios de este tipo es prioritaria para ampliar el conocimiento sobre las interacciones orquídea-hongo, con miras a desarrollar estrategias de manejo sostenibles. Entre estas estrategias, el diseño de técnicas óptimas de propagación simbiótica *in vitro* a gran escala, especialmente durante etapas críticas como la aclimatación, resulta particularmente relevante. Tales enfoques podrían contribuir significativamente a la conservación de especies amenazadas, proporcionando plantas de alta calidad al mercado y, con ello, reduciendo la presión sobre las poblaciones naturales (Ávila-Díaz *et al.*, 2009).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Especie de estudio

Rhynchostele cervantesii es una especie de orquídea endémica de México, distinguida por presentar pseudobulbos de forma ovoide a globosa, de color verde oscuro con moteado negro, y por sus flores blancas con líneas rojizas a marrón en la base de los tépalos, las cuales ocasionalmente pueden extenderse hacia el labelo (Espejo-Serna et al. 2002) (Fig. 1). La especie se distribuye en diversos sistemas montañosos de México, incluyendo la Sierra Madre Oriental, el Eje Neovolcánico Transversal y porciones de la Sierra Madre del Sur (SNIB 2016). En su hábitat natural, se encuentra principalmente en bosques mesófilos de montaña y bosques de encino-pino, donde crece de forma epífita sobre *Quercus rugosa* (Cruz-Higareda 2014), así como sobre *Ternstroemia lineata*, *Quercus rugosa* y *Styrax argenteus* (Domínguez-Gil 2015; Cervantes-Urbe 2018). Además de su importancia ecológica, *R. cervantesii* posee un notable valor ornamental y se comercializa en mercados nacionales e internacionales, especialmente durante festividades tradicionales como la Navidad (Soto-Arenas y Solano-Gómez 2007).



Figura 1. Planta de *Rhynchosstele cervantesii* *in situ*.

3.2 Efecto de hongos endófitos o putativos micorrízicos aislados de *R. cervantesii* *in situ*, en la germinación de semillas

Para evaluar el efecto de los hongos aislados de las raíces de *R. cervantesii* sobre la germinación de sus semillas, se seleccionaron las nueve cepas más comunes de hongos endófitos y micorrízicos putativos previamente identificadas (Magaña-Lemus *et al.*, en revisión). Los aislamientos fúngicos se obtuvieron mediante la técnica de un solo pelotón (Zettler *et al.* 2005). Las cepas seleccionadas pertenecieron a siete géneros: *Apiospora*, *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Didymella* y *Penicillium*, así como a las especies *Nemania difusa*, *Penicillium citrinum* y *Xylaria karsticola*.

La recolección de frutos se llevó a cabo en el predio de Tenderio, perteneciente a la Comunidad Indígena de Santiago Tingambato, Michoacán, México. Se recolectaron

tres frutos maduros de tres individuos distintos de *R. cervantesii* y se transportaron en bolsas de papel al Laboratorio de Biología de la Conservación Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, donde se realizó el ensayo de germinación simbiótica. Se preparó un medio básico de avena (MBA), compuesto por 3.5 g/L de harina de avena, 0.1 g/L de extracto de levadura y 6 g/L de agar bacteriológico, ajustado a un pH de 5.85–6.0. Este medio fue inoculado con las cepas fúngicas seleccionadas; asimismo, se incluyó un tratamiento control consistente en el mismo medio sin inocular.

Aproximadamente 25 mL de MBA se vertieron en frascos de vidrio de 120 mL, que se sellaron con tapas plásticas transparentes. La inoculación consistió en colocar un cubo de agar (~0.5 cm³) con micelio fúngico en el centro de cada frasco, según el protocolo de Ortega-Larrocea (2008). Se establecieron diez réplicas para cada tratamiento fúngico y diez para el control.

La siembra de las semillas se realizó tres días después de la inoculación, a fin de facilitar el crecimiento inicial del hongo (Otero *et al.* 2005). Los frutos se desinfectaron superficialmente en una campana de flujo laminar siguiendo el protocolo de Ávila-Díaz *et al.* (2009). Posteriormente, se colocaron en cajas de Petri estériles, se cortaron longitudinal y transversalmente y se mezclaron las semillas de los tres frutos. Aproximadamente 5 mg de esta mezcla de semillas se distribuyeron de manera uniforme en cada frasco de tratamiento.

Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de luz natural con un fotoperiodo de 16 h. Las etapas tempranas de desarrollo de *R. cervantesii* se monitorearon mediante observaciones microscópicas cada 30 días, en las que se evaluaron 100 semillas por frasco. Para caracterizar el desarrollo se utilizaron las siguientes categorías: semilla, sin desarrollo aparente (Fig. 2a); protocormo 1, embrión globoso contenido dentro de la testa (Fig. 2b); y protocormo 2, embrión globoso emergiendo de la testa, considerado el inicio de la germinación (Ávila-Díaz *et al.* 2009) (Fig. 2c).

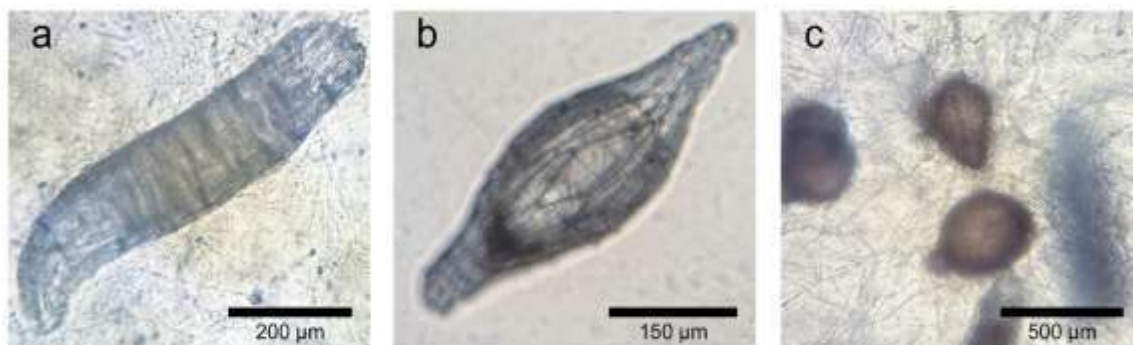


Figura 2. Etapas de desarrollo de *R. cervantesii*. a) Semilla; b) Protocormo 1 (embrión globoso contenido dentro de la testa); c) Protocormo 2, completamente cubierto por hifas de los hongos inoculados (embrión globoso emergiendo de la testa).

3.3 Efecto de los aislados en el desarrollo de plántulas de *R. cervantesii*

El efecto de los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de pelotones en las raíces de plantas de *R. cervantesii* se evaluó usando plántulas de la especie con una longitud de 5–7 cm, previamente cultivadas *in vitro* durante cinco años en medio Phytamax. Para asegurar un estado óptimo de las plantas, las plántulas se trasplantaron inicialmente a medio Phytamax al 50 % y se mantuvieron durante tres meses.

Posteriormente, se realizó un segundo trasplante utilizando un sustrato compuesto por perlita estéril. Dicho sustrato se preparó colocando 20 g de perlita previamente esterilizada y 20 mL de medio Phytamax al 10 % en frascos de vidrio de 250 mL. Los frascos con el sustrato se esterilizaron a una presión de 115 lb/in² durante 15 minutos, según el protocolo descrito por Almanza-Álvarez *et al.* (2017). Las plántulas se trasplantaron en condiciones de asepsia y se mantuvieron bajo luz natural durante un mes previo a la inoculación (Fig. 3a).

Para evaluar el efecto de los hongos aislados de plantas de *R. cervantesii* *in situ* sobre plántulas cultivadas *in vitro* de la misma especie, se prepararon suspensiones de esporas de seis cepas fúngicas previamente identificadas. Los hongos utilizados en este estudio fueron aislados de protocormos (*Apiospora* sp.), plantas juveniles

(*Diaporthe* sp., *Leptosphaeria biglobosa*, *Nemania diffusa* y J-11S) y plantas adultas (*Penicillium* sp.) (véase Magaña-Lemus *et al.* cap. 3, en revisión).

Las suspensiones de esporas se prepararon a una concentración de 1×10^5 esporas/mL por cepa. Estas cepas se seleccionaron debido al número limitado de plántulas disponibles; por ello, se incluyeron únicamente aquellas reportadas en la literatura como asociadas a orquídeas o con producción documentada de compuestos potencialmente benéficos para el crecimiento o el desarrollo vegetal. Adicionalmente, se incluyó una cepa con identidad taxonómica no resuelta para evaluar sus posibles efectos sobre *R. cervantesii*. La inoculación se realizó aplicando 30 μ L de la suspensión fúngica sobre la perlita, a una distancia aproximada de 1 cm de cada plántula. Para el tratamiento de control, se aplicaron 30 μ L de agua destilada estéril. Se establecieron 10 réplicas para cada tratamiento (Fig. 3b).



Figura 3. Trasplante de plántulas de *R. cervantesii*. a) Trasplante a perlita estéril con medio Phytamax al 10 %; b) inoculación con la suspensión de esporas a una concentración de 1×10^5 .

Las observaciones se realizaron cada cinco días durante un período de 120 días. Se registraron las siguientes variables morfológicas: número total de hojas; longitud y ancho de la hoja más joven; número de pseudobulbos; longitud y ancho del pseudobulbo más joven; y número y tamaño de nuevos brotes. Además, el vigor de las plántulas se evaluó a los 60, 90 y 120 días después del inicio del experimento, con base en el porcentaje de tejido sano, y se clasificó en seis categorías: (1) 0–

20%, que incluye plántulas muertas o con 1–20% de tejido sano; (2) 21–40%; (3) 41–60%; (4) 61–80%; (5) 81–99%; y (6) 100% (Almanza-Álvarez *et al.* 2017).

Al final del experimento, se evaluó el establecimiento de asociaciones micorrízicas orquidoides mediante la observación de pelotones en las raíces. Para cada tratamiento, se seleccionaron y analizaron raíces de dos plántulas. Las raíces se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de perlita y se tiñeron con azul de tripano siguiendo el protocolo de Currah *et al.* (1997), modificado por Ávila-Díaz *et al.* (2013). Posteriormente, las raíces se midieron y se seccionaron transversalmente cada 5 mm a lo largo de su longitud, realizando cortes de aproximadamente 0.5 mm de grosor, con el fin de detectar la presencia de pelotones micorrízicos.

3.4 Análisis estadísticos

Para determinar las diferencias entre las categorías de germinación, se empleó un modelo de enlace acumulativo (CLM), considerando la germinación como la variable dependiente ordinal y el tratamiento como la variable explicativa. Además, se utilizó un modelo multinomial para evaluar las diferencias entre tratamientos a lo largo de las distintas etapas de la germinación.

El efecto de los tratamientos sobre las variables morfológicas de las plántulas se evaluó mediante modelos lineales mixtos (LMM), considerando como variables de respuesta las características morfológicas de interés (número de hojas, ancho y longitud de la hoja, número de pseudobulbos, ancho y longitud del pseudobulbo, número de brotes y tamaño de los brotes (mm)). El factor tratamiento, con siete niveles (control, *Apiospora* sp., *Diaporthe* sp., *Leptosphaeria biglobosa*, *Nemania diffusa*, *Penicillium* sp. y J11S), se incluyó como efecto fijo. Cada planta se incorporó como efecto aleatorio para considerar las mediciones repetidas a lo largo del tiempo en los mismos individuos. Los modelos se ajustaron mediante la función lmer del paquete lme4. Las medias marginales estimadas (EMMs) para cada tratamiento se calcularon mediante el paquete emmeans, y las comparaciones múltiples se realizaron utilizando la prueba post hoc de Tukey con ajuste por comparaciones múltiples.

Para evaluar el efecto del tratamiento sobre el vigor de las plántulas, el cual se midió mediante una escala ordinal de seis categorías, se ajustó un modelo mixto de enlace acumulativo (CLMM). En este modelo, el tratamiento se incluyó como efecto fijo y las plántulas individuales como efecto aleatorio. La significancia de los efectos del modelo se evaluó mediante pruebas de razón de verosimilitud, y las comparaciones pareadas entre tratamientos se realizaron utilizando medias marginales estimadas con ajuste por comparaciones múltiples. La supervivencia de las plántulas se analizó mediante un modelo lineal generalizado (GLM) con distribución binomial y función de enlace logit. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el entorno de RStudio (R Core Team, versión 2024.04.2+764).

4. RESULTADOS

4.1 Efecto de los aislados en la germinación de semillas de *R. cervantesii*

A los 90 días después de la siembra, los hongos *Nemania diffusa* y *Diaporthe* sp. promovieron el mayor desarrollo, alcanzando el estadio de Protocormo 2, considerado como germinación (Ávila-Díaz *et al.* 2009), en el 44 % y 12 % de las semillas, respectivamente. En contraste, aislados como *Apiospora* sp., *N. rubi* y *Penicillium* sp. no indujeron la germinación y las semillas permanecieron en estado latente. El tratamiento control se mantuvo en el estadio de Protocormo 1 (Fig. 4). Se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos 10 ($\chi^2 = 1321.7$, gl = 9, $p < 0.001$).

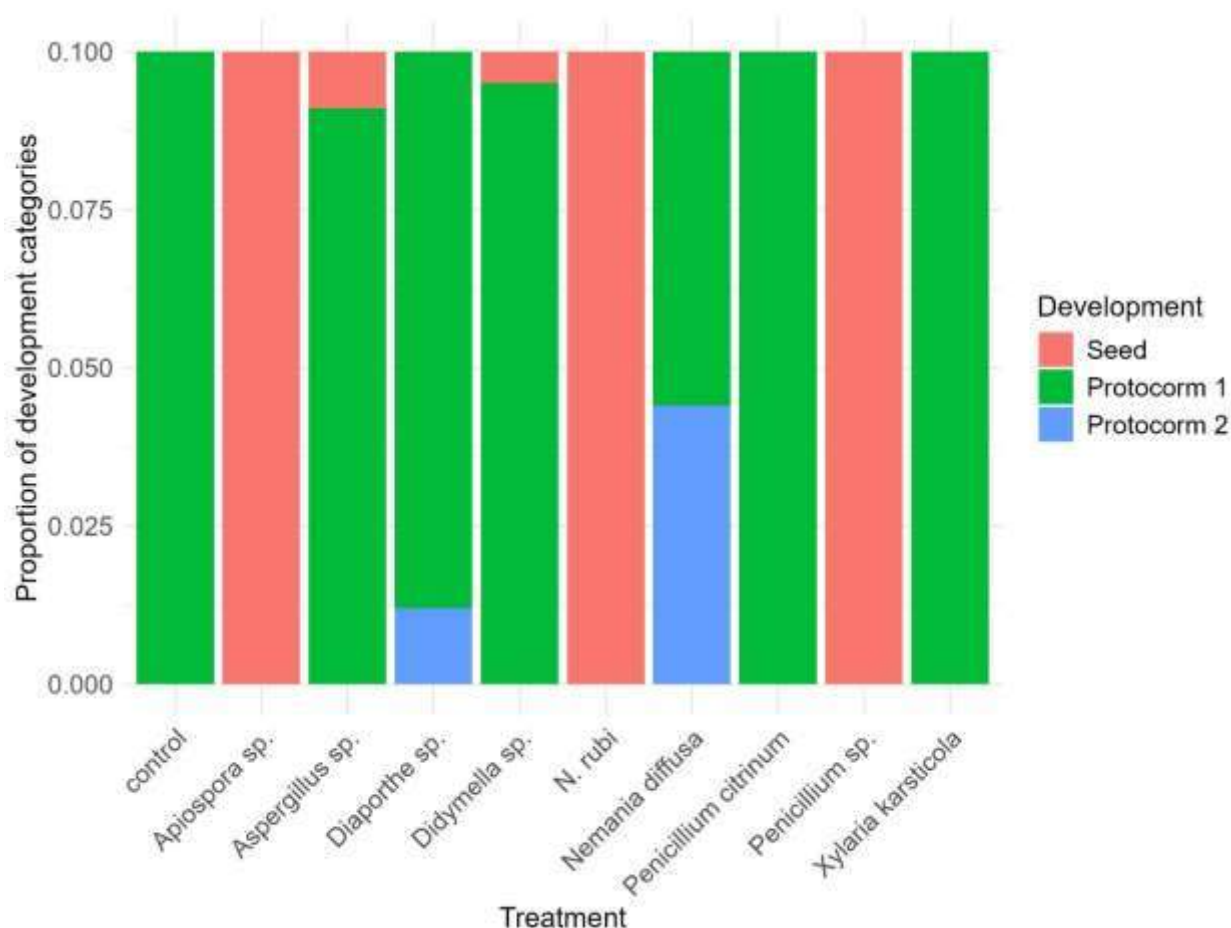


Figura 4. Efecto de los hongos aislados de raíces de *R. cervantesii* en condiciones *in situ* sobre la germinación a los 90 días tras de la siembra. Se presentan las proporciones relativas de las diferentes categorías de desarrollo observadas en cada tratamiento: Semilla (sin desarrollo aparente), Protocormo 1 (embrión hinchado con la testa abierta) y Protocormo 2 (embrión agrandado con más del 50 % del cuerpo emergido fuera de la testa rota; considerado como germinación). Los colores representan cada una de las categorías. El tratamiento de control se muestra al inicio como referencia.

4.2 Efecto de los aislados en el desarrollo de plántulas de *R. cervantesii*

Se evaluó el efecto de distintos tratamientos fúngicos sobre el crecimiento foliar de *R. cervantesii*, observándose un efecto significativo del tratamiento en el largo de la hoja ($F= 986.90$, $g/= 6$, $p < 0.0001$), el ancho de la hoja ($F= 985.74$, $g/= 6$, $p < 0.0001$) y el número total de hojas ($F= 986.81$, $g/= 6$, $p < 0.0001$), en comparación con el tratamiento control.

Respecto al largo de la hoja, los tratamientos más efectivos fueron la cepa J11S, con un promedio de 40.5 mm (IC 95%: 36.9–44.2), y *Penicillium* sp. (38.8 mm), posteriormente, *Apiospora* sp. (30.4 mm) y *Nemania diffusa* (28.3 mm). Los valores más bajos se registraron con *Leptosphaeria biglobosa* (22.4 mm) y el control (21.6 mm) (Fig. 5A).

En cuanto al ancho de la hoja, el mayor promedio se obtuvo con *Penicillium* sp. (3.75 mm; IC 95%: 3.26–4.24), seguido por J11S (3.27 mm). Por el contrario, *Apiospora* sp. (2.48 mm) y *Diaporthe* sp. (2.27 mm) presentaron promedios inferiores al del control (2.64 mm) (Fig. 5B).

Finalmente, el número total de hojas fue significativamente mayor en los tratamientos con *Leptosphaeria biglobosa* (IC 95%: 7.57–9.91), con un promedio de 8.74 hojas por plántula, y en J11S, con 8.44 hojas en promedio, ambos superiores al tratamiento control, que registró un promedio de 5.26 hojas (Fig. 5C).

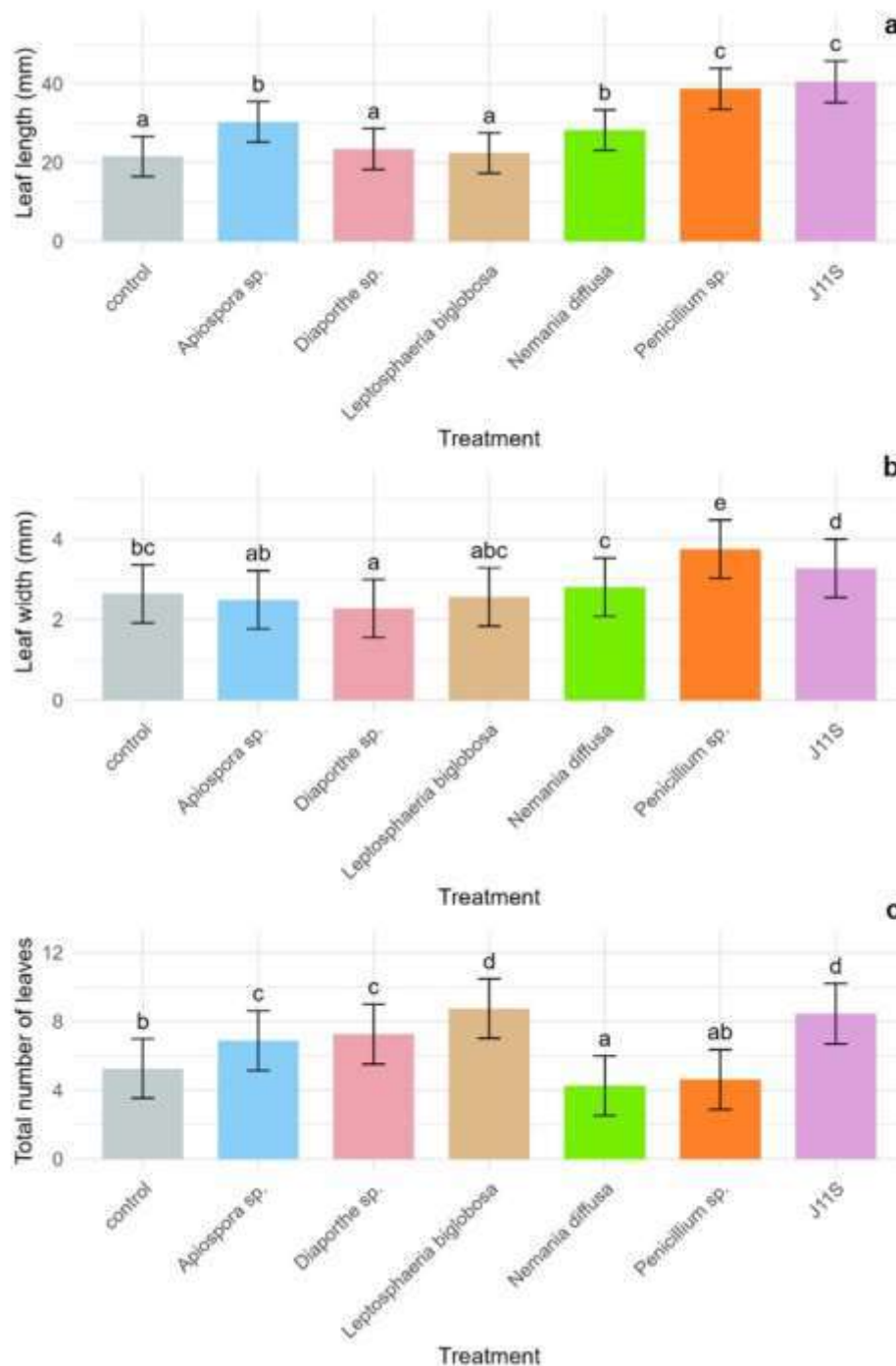


Figura 5. Efecto de los hongos aislados de las raíces de *R. cervantesii* sobre el desarrollo de plántulas *in vitro*. Comparación del efecto de los tratamientos sobre el crecimiento foliar. Se presentan las medias marginales estimadas ($\pm$ IC 95%) obtenidas a partir de un modelo lineal mixto. Se muestran los valores promedio $\pm$ error estándar de tres variables: largo de hoja (a), ancho de hoja (b) y número total de hojas (c). Las barras están agrupadas por tratamiento. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (prueba post hoc de Tukey, $p < 0.05$).

Se evaluó el efecto de los tratamientos fúngicos sobre el crecimiento de los seudobulbos en *R. cervantesii*, observándose un efecto significativo del tratamiento sobre el largo de los seudobulbos ($F= 27.78$, $gl= 6$, $p< 0.0001$), el ancho ($F= 20.32$, $gl= 6$, $p< 0.0001$) y el número total de seudobulbos ($F= 38.18$, $gl= 6$, $p< 0.0001$).

En cuanto al largo de los seudobulbos, el tratamiento con *Penicillium* sp. mostró los valores más altos, con una media de 9.86 mm (IC 95%: 8.28–11.45), seguido por la cepa J11S con 8.92 mm, ambos superiores al control, que presentó un promedio de 7.16 mm (Fig. 6a).

Respecto al ancho de los seudobulbos, las plántulas tratadas con J11S presentaron un promedio de 5.50 mm y las tratadas con *Penicillium* sp. de 5.07 mm (IC 95%: 4.91–6.08 y 4.50–5.64, respectivamente), ambos mayores que el control, que registró un ancho promedio de 4.60 mm (Fig. 6b).

Los tratamientos con *Apiospora* sp. y J11S mostraron un número de seudobulbos por planta similar al del control, con promedios de 3.97 y 3.87 seudobulbos por planta, respectivamente (IC 95%: 3.56–4.38 y 3.44–4.31) (Fig. 6c).

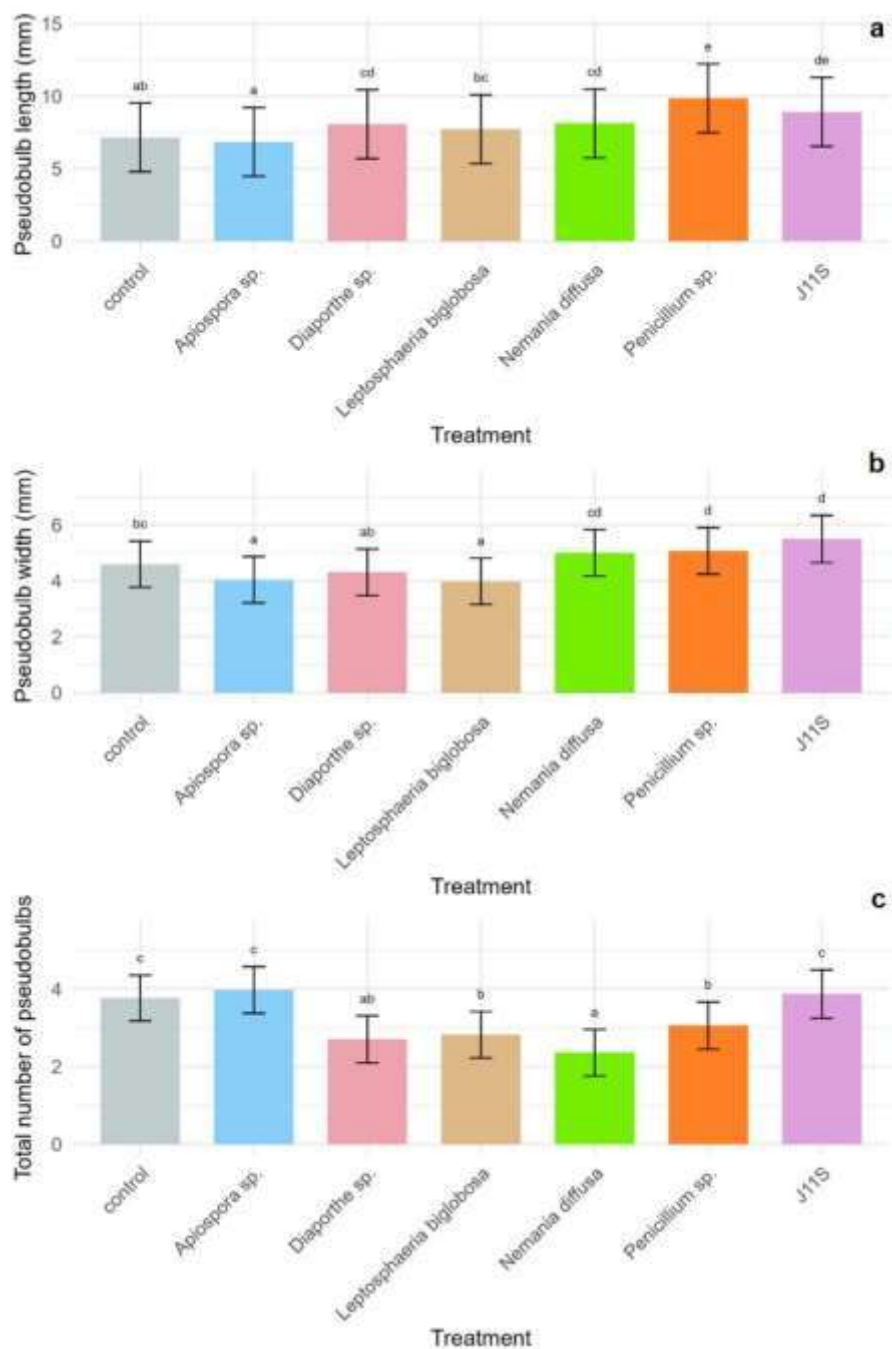


Figura 6. Efecto de los hongos aislados de las raíces de *R. cervantesii* en el desarrollo de plántulas *in vitro*. Comparación del efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de los seudobulbos. Se presentan las medias marginales estimadas ($\pm$ IC 95%) obtenidas a partir de un modelo lineal mixto. Se muestran los valores promedio $\pm$ error estándar para tres variables: largo del seudobulbo (a), ancho del seudobulbo (b) y número total de seudobulbos (c). Las barras están agrupadas por tratamiento. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas (prueba post hoc de Tukey, $p < 0.05$).

Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos fúngicos tanto en el número total de brotes ($F = 20.80$, $df = 6$, $p < 0.0001$) como en la longitud de los brotes ($F = 34.36$, $df = 6$, $p < 0.0001$).

Las plántulas inoculadas con *Diaporthe* sp. produjeron el mayor número de brotes, con un promedio de 1.61 brotes por planta (IC 95%: 1.196–2.03), significativamente superior al de todos los demás tratamientos. Le siguieron J11S (1.11 brotes), *Leptosphaeria biglobosa* (1.02 brotes) y el control (1.01 brotes) (Fig. 7a).

En cuanto al tamaño de los brotes, los valores más altos se observaron en las plántulas inoculadas con *Diaporthe* sp. (27.25 mm) (IC 95%: 20.57–33.9) y con *Penicillium* sp. (22.25 mm). Las cepas *Leptosphaeria biglobosa*, J11S y *Apiospora* sp. presentaron un efecto intermedio, con longitudes medias de 16.91 mm, 16.56 mm y 15.56 mm, respectivamente (Fig. 7b).

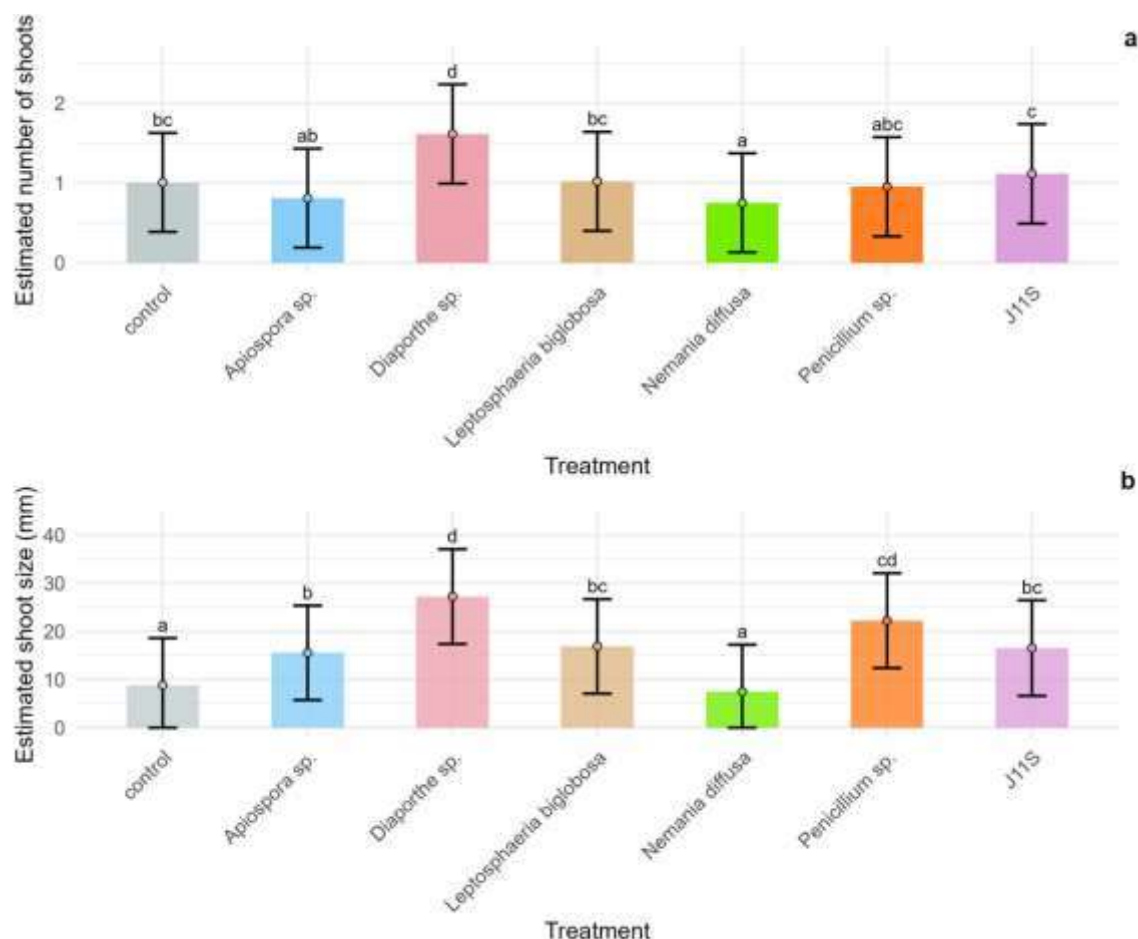


Figura 7. Efecto de los hongos aislados de las raíces de *R. cervantesii* en el desarrollo de brotes en plántulas *in vitro*. Se presentan los efectos estimados de los tratamientos sobre (a) el número total de brotes y (b) el tamaño promedio del brote (mm), obtenidos mediante modelos lineales mixtos ajustados por tratamiento. Las barras representan los valores estimados de la media marginal (emmeans), mientras que las líneas indican los intervalos de confianza del 95%. Las letras sobre cada barra indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$). Los tratamientos que comparten la misma letra no difieren significativamente entre sí.

Después de dos meses (60 días) desde el inicio del experimento, el tratamiento control ($EE\ 1.35 \pm 0.25$) mostró valores de vigor comparables a los de las plántulas inoculadas con *Apiospora* sp. ($EE\ 1.21 \pm 0.27$), *Nemanias diffusa* ($EE\ 0.60 \pm 0.25$), *Diaporthe* sp. ($EE\ 0.65 \pm 0.24$) y *Penicillium* sp. ($EE\ 0.84 \pm 0.26$), según una escala ordinal que va de 1 (vigor más bajo) a 6 (vigor más alto). En contraste, se detectaron

diferencias significativas en el vigor de las plántulas entre los tratamientos ($\chi^2=28.999$, $df=6$, $p<0.0001$), siendo los tratamientos J11S y *Leptosphaeria biglobosa* los que mostraron valores de vigor significativamente menores ($EE\ 0.20 \pm 0.25$ y -0.03 ± 0.26 , respectivamente) (Fig. 8).

Cabe destacar que, a los 90 y 120 días, el vigor de las plántulas disminuyó en todos los tratamientos inoculados. Esta disminución podría atribuirse a limitaciones de nutrientes, lo que posiblemente facilitó la infección fúngica de las plántulas, como se discute a continuación.

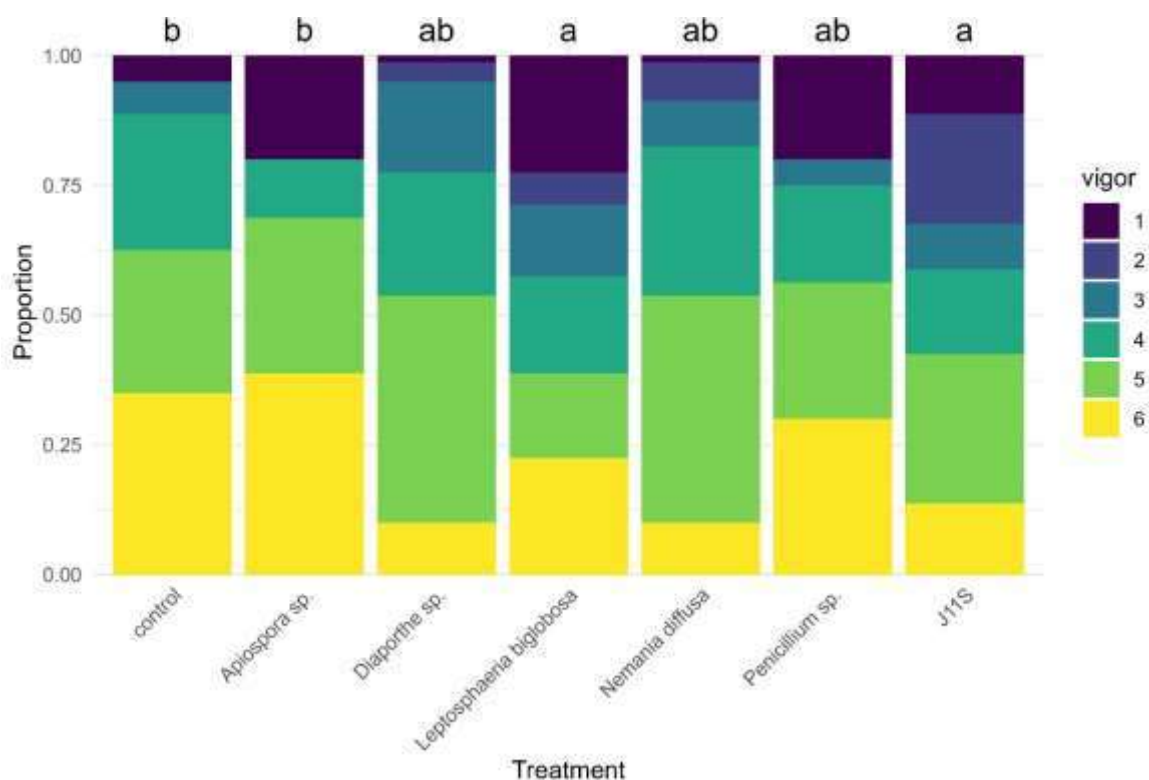


Figura 8. Distribución del vigor de plántulas *in vitro* de *R. cervantesii* a los 60 días tras de la inoculación bajo diferentes tratamientos. Las barras apiladas representan la proporción de plántulas dentro de cada categoría de vigor (1= vigor más bajo; 6= vigor más alto) para cada tratamiento. Las letras sobre las barras indican grupos estadísticamente homogéneos según las medias marginales estimadas derivadas de un modelo mixto de enlace acumulativo (CLMM), considerando el tratamiento como efecto fijo y la planta como efecto aleatorio. Los tratamientos que comparten la misma letra no difieren significativamente entre sí ($p > 0.05$).

Ninguno de los tratamientos tuvo un efecto significativo sobre la supervivencia de las plántulas a los 120 días después del inicio del experimento ($\chi^2= 4.0323$, $gl= 6$, $p= 0.6723$).

Al final del experimento, no se observó formación de pelotones en las raíces de las plántulas del tratamiento de control. En contraste, todos los tratamientos inoculados con hongos endófitos o putativamente micorrízicos mostraron presencia de pelotones, registrándose el mayor porcentaje de cortes micorrizados en las plántulas inoculadas con aislados fúngicos obtenidos de plantas adultas y juveniles, seguidos por los aislados de protocormos colectados *in situ* de *R. cervantesii* (Tabla 1).

Tabla 1. Colonización micorrízica en plántulas de *R. cervantesii* cultivadas *in vitro* e inoculadas con aislamientos fúngicos obtenidos de diferentes categorías de desarrollo.

Treatment	Developmental stage of isolation	% of mycorrhizal cuts
Control	Non-inoculated	0
<i>Apiospora</i> sp.	Protocorm	42.8
<i>Diaporthe</i> sp.	Juvenil	83.3
<i>Leptosphaeria biglobosa</i>	Juvenil	58.3
<i>Nemania diffusa</i>	Juvenil	50
J11S	Juvenil	61.9
<i>Penicillium</i> sp.	Adult	77.5

Los taxones fúngicos responsables de la inducción de estas estructuras fueron *Apiospora* sp. (Fig. 9b), *Diaporthe* sp. (Fig. 9a), *Leptosphaeria biglobosa*, *Nemania diffusa*, *Penicillium* sp. y J11S (Fig. 9c). Cabe destacar que, en todos los casos, los pelotones observados se encontraban en un estado degradado.

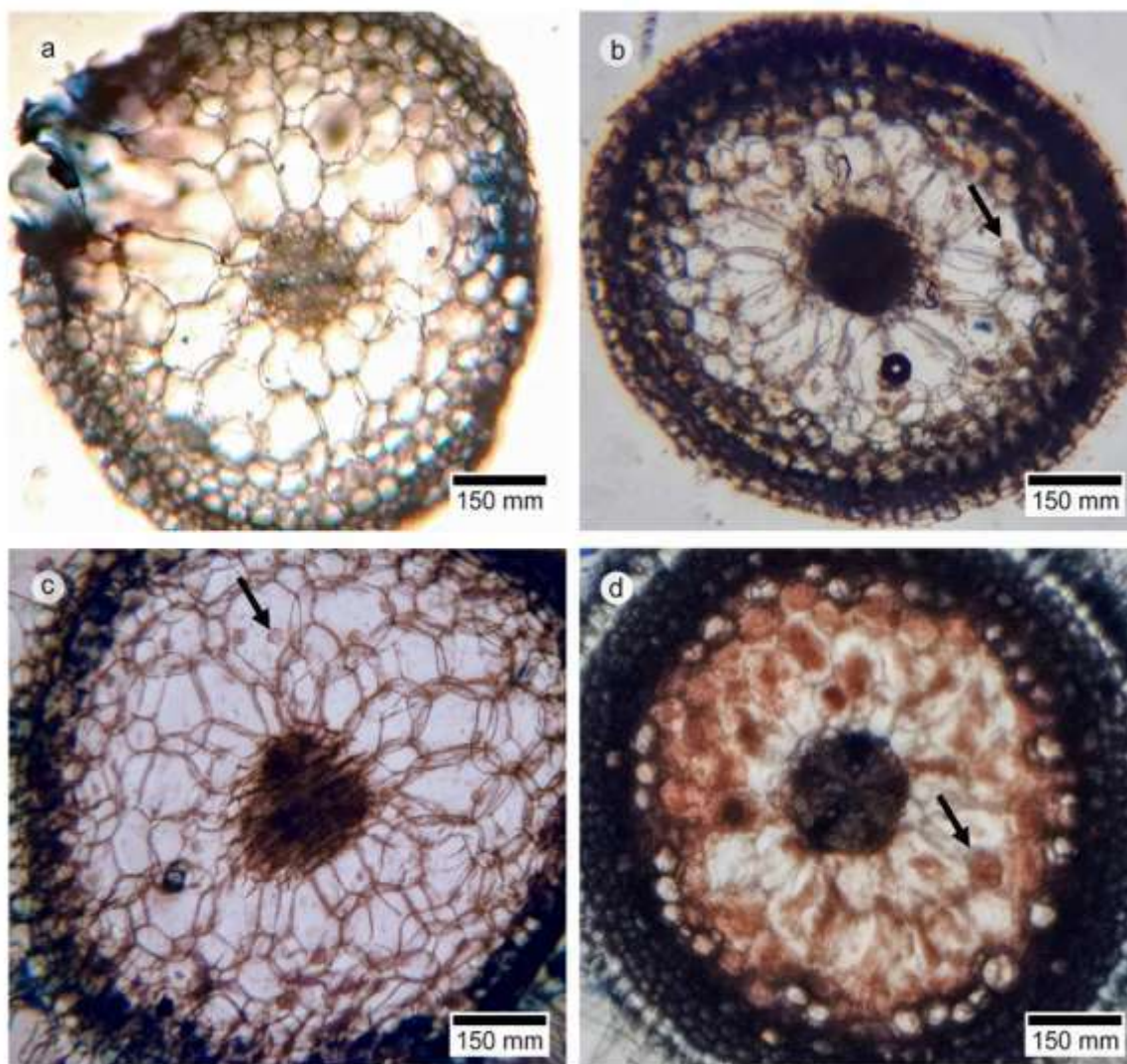


Figura 9. Raíces de plántulas *in vitro* de *Rhynchosstele cervantesii* inoculadas con diferentes cepas fúngicas endofíticas y putativamente micorrízicas. a) Raíz sin agregados radiculares de una plántula control. b) Pelotones degradados en la raíz de una plántula inoculada con *Apiospora* sp. c) Pelotones degradados en la raíz de una plántula inoculada con *Diaporthe* sp. d) Pelotones degradados en la raíz de una plántula inoculada con la cepa J11S. Fotos: J. Tonatiuh Gutiérrez Zavala.

5. DISCUSIÓN

Las tasas de germinación simbiótica de *R. cervantesii* oscilaron entre el 12% y el 44%, dentro del rango reportado para otras especies de orquídeas. Por ejemplo, *Paphiopedilum villosum* mostró un 28.36% de germinación cuando se inoculó con *Tulasnella* sp. (Khamchatra *et al.* 2016), mientras que *Dendrobium exile* presentó tasas de germinación entre 5% y 59% con dos cepas de *Tulasnella* sp., y hasta 80% con una tercera cepa (Meng *et al.* 2019). En *D. officinale*, se alcanzó un 89.5% de germinación a los 52 días post-siembra tras la inoculación con *Tulasnella* sp. (Chen *et al.* 2022). En este estudio, *Nemania diffusa* y *Diaporthe* sp. influyeron positivamente en la germinación de semillas de *R. cervantesii*, destacándose que el efecto de *N. diffusa* no había sido reportado previamente en orquídeas. Se ha documentado que los hongos de este género protegen raíces y modulan la micobiota de la rizósfera en otras plantas, como *Taxus baccata* (Farsi and Farokhi 2018), lo que sugiere un posible rol simbiótico también en orquídeas. De manera similar, *Diaporthe* sp. podría promover la germinación mediante la producción de ácido indol-3-acético (IAA), como se ha reportado para *Diaporthe eucalyptorum* en *Acampe praemorsa* (Deepthi and Ray 2019), lo que apoyaría su función en el desarrollo temprano de *R. cervantesii* y posiblemente de otras especies de orquídeas.

Los hongos utilizados en este estudio fueron aislados de pelotones en protocormos y raíces de plantas juveniles y adultas de *R. cervantesii* en condiciones *in situ*, y todos pertenecían al filo Ascomycota. Este predominio de Ascomycetes sobre Basidiomycetes, típicamente reportados como hongos micorrízicos de orquídeas, coincide con un estudio paralelo sobre la micobiota de *R. cervantesii* (Magaña-

Lemus *et al.*, en proceso). Aunque especies de Basidiomycota como Sebaciniales y cepas de *Tulasnella* se han utilizado ampliamente en germinación simbiótica *in vitro* de orquídeas epífitas, incluyendo *D. officinale*, *D. nobile* y *D. devonianum*, con *D. officinale* alcanzando un 75.8% de germinación a los 90 días (Yang *et al.* 2023), los hongos Ascomycota también han mostrado efectos positivos. Por ejemplo, cepas de *Fusarium* promovieron la germinación de semillas en *D. moschatum* y el desarrollo de plántulas en *D. longicornu* (Shah *et al.* 2025), mientras que *Clonostachys* sp. mejoró la germinación en la orquídea aclorofílica *Pogoniopsis schenckii* (Sisti *et al.* 2019). Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que los hongos Ascomycota pueden actuar como endófitos o posibles socios micorrízicos en orquídeas (Ávila-Díaz *et al.* 2013; Lee *et al.* 2017; Deepthi and Ray 2018; Salazar-Cerezo *et al.* 2018; Deepthi and Ray 2019; Hajong and Kapoor 2020; Favre-Godal *et al.* 2021; Alomía *et al.* 2022; Shah *et al.* 2022), destacando su potencial relevancia ecológica y funcional en asociaciones simbióticas, tanto en *R. cervantesii* como en otras orquídeas.

Más allá de la germinación, la inoculación con hongos influyó en el crecimiento vegetativo de *R. cervantesii*. *Leptosphaeria biglobosa* y la cepa J11S promovieron la formación de hojas, con promedios de 8.74 ± 0.54 y 8.44 ± 0.56 hojas por planta, respectivamente, resultados comparables a los observados en *Chloraea gaviu* con cepas de *Ceratobasidium* (Pereira *et al.* 2021). El crecimiento de los pseudobulbos, tanto en longitud como en ancho, se vio significativamente afectado por los tratamientos fúngicos, siendo *Penicillium* sp. y la cepa J11S los que produjeron los pseudobulbos más grandes. En otras orquídeas epífitas, como *Dendrobium officinale*, los hongos endófitos, como *Tulasnella*, afectan principalmente características foliares sin influir significativamente en el diámetro del tallo (Zhang *et al.* 2022). Además, *Diaporthe* sp. promovió la formación y el crecimiento de nuevos brotes *in vitro*, de manera similar a los efectos de hongos Ascomycota en *Cymbidium aloifolium*, *Vanda cristata* y *Dendrobium catenatum* (Coniochaeta sp. y *Fusarium oxysporum*) (Shah *et al.* 2022; Chand *et al.* 2020; Wang *et al.* 2016).

Las plántulas de *R. cervantesii* cultivadas *in vitro* con agrolita y medio Phytamax al 10% mostraron mayor vigor en el tratamiento control después de cuatro meses. Este patrón podría atribuirse a la limitación de nutrientes, que restringe el crecimiento óptimo y podría haber facilitado la colonización fúngica, lo que habría reducido el vigor de las plántulas. Resultados similares se han reportado en la orquídea terrestre *Caladenia latifolia*, en un estudio que comparó plántulas germinadas *in vitro* bajo distintos tratamientos asimbióticos frente a un tratamiento simbiótico; en dicho estudio, las plántulas más vigorosas se obtuvieron utilizando medio MS suplementado con agua de coco, superando incluso al tratamiento micorrízico (Bustam *et al.*, 2014). Estos hallazgos sugieren que la disponibilidad de nutrientes es un factor crítico para el éxito del cultivo simbiótico *in vitro*, y que la presencia de hongos no necesariamente confiere beneficios inmediatos, lo que destaca la necesidad de estudios adicionales bajo diferentes condiciones experimentales para aclarar el rol funcional de estos hongos.

Ninguno de los tratamientos afectó significativamente la supervivencia de las plántulas, lo que contrasta con lo observado en otras orquídeas epífitas. Por ejemplo, en *Cymbidium aloifolium*, la inoculación con tres cepas de Ascomycota (*Coniochaeta dendrobiicola*, *Coniochaeta* sp. y *Cladosporium* sp.) promovió una supervivencia *ex vitro* del 100% (Shah *et al.* 2022). De manera similar, en *Vanda coerulea*, la inoculación con *Rhizoctonia zeae* (Basidiomycota) incrementó significativamente la supervivencia de plántulas tanto *ex vitro* como *in situ* (Aggarwal *et al.* 2012).

De manera notable, el análisis microscópico reveló la formación de pelotones en las raíces de plántulas de *R. cervantesii* cultivadas *in vitro* e inoculadas con hongos endófitos y micorrízicos putativos aislados de protocormos y raíces de plantas juveniles y adultas, incluyendo *Apiospora* sp., *Diaporthe* sp., *Nemania diffusa* y *Penicillium* sp., todos pertenecientes al filo Ascomycota. Estos hongos promovieron de manera consistente la formación de pelotones, además de influir en la germinación de semillas y en el desarrollo de las plántulas. Este patrón concuerda con observaciones en otras orquídeas epífitas, como *Cymbidium aloifolium*, donde

aislados de *Cladosporium* sp. y *Coniochaeta* sp. inducen estructuras de pelotones similares (Shah *et al.*, 2022). Cabe destacar que, en todos los casos, se observaron pelotones degradados, lo que sugiere que las plántulas utilizaron activamente la asociación con hongos endófitos y/o micorrízicos putativos para obtener los nutrientes necesarios para su desarrollo. Estos resultados son consistentes con lo reportado en otras orquídeas epífitas cultivadas *in vitro*, como *Rhynchostylis retusa* inoculada con *Leptosphaerulina chartarum*, en la que se promovió el crecimiento vegetativo (Shah *et al.* 2019).

En general, los resultados indican que las cepas fúngicas aisladas de plantas juveniles de *R. cervantesii* desempeñan un papel clave tanto en la germinación como en el desarrollo temprano de las plántulas. *Nemania diffusa* y *Diaporthe* sp. promovieron significativamente la germinación, mientras que *Penicillium* sp. y la cepa J11S favorecieron el crecimiento de las plántulas, lo que sugiere una posible especialización funcional entre los hongos asociados a diferentes etapas ontogenéticas. Estos hallazgos respaldan a Zhao *et al.* (2021), quienes proponen que los hongos micorrízicos de orquídeas “originados” en raíces y semillas podrían ser más eficaces para promover la germinación debido a su mayor especificidad ecológica. Además, los resultados concuerdan con Ventre-Lespiauq *et al.* (2021) respecto al reemplazo temporal en las asociaciones micorrízicas de orquídeas, lo que podría explicar la variación en los hongos que promueven diferentes etapas del ciclo de vida de *R. cervantesii*. Por lo tanto, la dinámica y la especificidad de la asociación fúngica a lo largo del desarrollo podría constituir un mecanismo adaptativo que les permita a las orquídeas responder de manera flexible a la variabilidad ambiental y ecológica.

Este estudio muestra que las cepas fúngicas aisladas de orquídeas juveniles y adultas influyen de manera diferencial en el desempeño de las plántulas, lo que evidencia variación funcional entre los simbiontes a lo largo de las etapas ontogénicas. Aunque estos hongos se obtuvieron de plantas establecidas, sus efectos durante el desarrollo temprano podrían no reflejar su papel a lo largo de todo el ciclo de vida. Estudios recientes indican que las asociaciones orquídea–hongo

pueden cambiar ontogénicamente, con variaciones en la composición y especificidad de los hongos entre plantas juveniles y adultas (McCormick *et al.* 2018; Xing *et al.* 2020). Experimentos de inoculación recíproca y evaluaciones a largo plazo permitirían determinar si los hongos provenientes de adultos confieren ventajas durante el establecimiento temprano o si están adaptados a etapas posteriores del desarrollo.

La variación en la eficacia simbiótica entre las cepas podría influir en la dinámica de reclutamiento y la persistencia poblacional, especialmente en sistemas donde el establecimiento de plántulas depende de hongos micorrízicos compatibles (McCormick y Jacquemyn 2014). A escala evolutiva, estas diferencias podrían generar presiones selectivas que favorezcan genotipos vegetales con mayor compatibilidad fúngica, promoviendo procesos de adaptación local y coevolución dentro de Orchidaceae (Selosse *et al.* 2022; Li *et al.* 2021).

6. CONCLUSIONES

Nemania diffusa y *Diaporthe* sp. promovieron la germinación de semillas de *R. cervantesii* a los 90 días, lo que sugiere un papel importante de estos hongos para este proceso.

Las cepas J11S y *Penicillium* sp. favorecieron el crecimiento de las plántulas en términos de número y tamaño de hojas, así como el tamaño del pseudobulbo, sugiriendo una función importante de estos hongos en el desarrollo de plántulas de *R. cervantesii*.

Diaporthe sp. promovió tanto la formación como el desarrollo de nuevos brotes en las plántulas, lo que sugiere que desempeña un papel importante en el ciclo de vida de *R. cervantesii*.

Se requiere investigación adicional para esclarecer los roles funcionales de los hongos endófitos y putativamente micorrízicos, así como sus efectos en plantas en diferentes etapas de desarrollo y su comportamiento bajo condiciones experimentales prolongadas.

7. LITERATURA CITADA

Aggarwal S, Nirmala C, Beri S, Rastogi S, Adholeya A (2012) *In vitro* symbiotic seed germination and molecular characterization of associated endophytic fungi in a commercially important and endangered Indian orchid *Vanda coerulea* Griff. Ex Lindl. *European Journal of Environmental Sciences* 2(1). <https://doi.org/10.14712/23361964.2015.36>.

Alghamdi SA (2017) Influence of mycorrhizal fungi on seed germination and growth in terrestrial and epiphytic orchids. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26(3): 495-502. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.021>.

Alomía YA, Otero JT, Jersáková J, Stevenson PR (2022) Cultivable fungal community associated with the tropical orchid *Dichaea andina*. *Fungal Ecology* 57: 101158. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2022.101158>.

Almanza-Álvarez J, Garibay-Orijel R, Salgado-Garciglia R, Fernández-Pavía SP, Lappe-Oliveras P, Arellano-Torres E, Ávila-Díaz I (2017) Identification and control of pathogenic fungi in neotropical valued orchids (*Laelia* spp.). *Tropical plant pathology* 42(5): 339-351. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0171-3>.

Ávila-Díaz I, Garibay-Orijel R, Magaña-Lemus RE, Oyama K (2013) Molecular evidence reveals fungi associated within the epiphytic orchid *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. *Botanical Sciences* 91(4): 523-529.

Ávila-Díaz I, Oyama K, Gómez-Alonso C, Salgado-Garciglia R (2009) *In vitro* propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 99(3): 335-343. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9609-8>.

Bustam BM, Dixon KW, Bunn E (2014). *In vitro* propagation of temperate Australian terrestrial orchids: revisiting asymbiotic compared with symbiotic germination. *Botanical Journal of the Linnean Society* 176(4): 556-566. <https://doi.org/10.1111/boj.12216>.

- Çiğ A, Durak E, İşler S (2018). *In vitro* symbiotic germination potentials of some *Anacamptis*, *Dactylorhiza*, *Orchis* and *Ophrys* terrestrial orchid species. *Applied Ecology and Environmental Research* 16(4): 5141-5155. http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1604_51415155.
- Chand K, Shah S, Sharma J, Paudel MR, Pant B (2020) Isolation, characterization, and plant growth-promoting activities of endophytic fungi from a wild orchid *Vanda cristata*. *Plant signaling & behavior* 15(5): 1744294. <https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1744294>
- Chen J, Liu SS, Kohler A, Yan B, Luo HM, Chen XM, Guo SX (2017) iTRAQ and RNA-Seq analyses provide new insights into regulation mechanism of symbiotic germination of *Dendrobium officinale* seeds (Orchidaceae). *Journal of proteome research* 16(6), 2174-2187. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00999>.
- Chen W, Yu L, Zhu B, Qin L (2022) *Dendrobium officinale* endophytes may colonize the intestinal tract and regulate gut microbiota in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2022(1): 2607506. <https://doi.org/10.1155/2022/2607506>.
- Currah RS, Zelmer CD, Hambleton S, Richardson KA (1997) Fungi from orchid mycorrhizas. In: Arditti J. and Prid geon A.M. Eds. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, Vol. 7, pp. 117-170, Kluwer Academic Publishers, Boston. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2498-2_4.
- Dearnaley JDW, Perotto S, Selosse MA (2016) Structure and development of orchid mycorrhizas. *Molecular mycorrhizal symbiosis* 63-86. <https://doi.org/10.1002/9781118951446.ch5>.
- Deepthi AS, Ray JG (2018) Endophytic diversity of hanging velamen roots in the epiphytic orchid *Acampe praemorsa*. *Plant Ecology & Diversity* 11(5-6): 649-661. <https://doi.org/10.1080/17550874.2019.1610911>.

Deepthi AS, Ray JG (2019) Applications of endophytic-fungal-isolates from velamen root of wild orchids in floriculture. *Brazilian Journal of Biological Sciences* 6(14): e413-e413. <https://doi.org/10.21472/bjbs.061409>.

Espejo-Serna A, García-Cruz J, López-Ferrari AR, Jiménez-Machorro R, Sánchez-Saldaña L (2002) Orquídeas del estado de Morelos. *Orquídea* 16:1–332.

Farsi M, Farokhi S (2018) Biosynthesis of antibacterial silver nanoparticles by endophytic fungus *Nemanía* sp. isolated from *Taxus baccata* L. (Iranian yew). *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 20(6). <https://doi.org/10.5812/zjrms.57916>.

Favre-Godal Q, Gourguillon L, Lordel-Madeleine S, Gindro K, Choisy P (2021) Orchids and their mycorrhizal fungi: an insufficiently explored relationship. *Mycorrhiza* 30(1): 5-22. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00934-2>.

Gao W, Guo S (1994) Effect of three endophytic fungi on growth of *Dendrobium candidum* and *Anoectochilus roxburghii*. *Chin. Trad. Herb. Drugs* 33: 543-545.

Gao Y, Zhao Z, Li J, Liu N, Jacquemyn H, Guo S, Xing X (2020) Do fungal associates of co-occurring orchids promote seed germination of the widespread orchid species *Gymnadenia conopsea*? *Mycorrhiza* 30(2): 221-228. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00943-1>.

Hágsater E, Soto MA, Salazar GA, Jiménez R, López MA, Dressler RL (2015) Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, A.C., México, D.F.

Hajong S, Kapoor R (2020) An amalgam of pathogenic and beneficial endophytic fungi colonizing four *Dendrobium* species from Meghalaya, India. *Journal of basic microbiology* 60(5), 415-423. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900631>.

Herrera H, Soto J, de Bashan LE, Sampedro I, Arriagada C (2019) Root-associated fungal communities in two populations of the fully mycoheterotrophic plant *Arachnitis uniflora* Phil. (Corsiaceae) in Southern Chile. *Microorganisms* 7(12): 586. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120586>.

Herrera H, Valadares R, Contreras D, Bashan Y, Arriagada C (2016) 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>.

Johnson TR, Stewart SL, Dutra D, Kane ME, 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>.

Kauth PJ, Dutra D, Johnson TR, Stewart SL, Kane ME, Vendrame W (2008) Techniques and applications of *in vitro* orchid seed germination. In: da Silva JAT (ed.) *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: Advances and Topical Issues* 5:375-391.

Khamchatra NM, Dixon K, Chayamarit K, Apisitwanich S, Tantiwiwat S (2016) Using *in situ* seed baiting technique to isolate and identify endophytic and mycorrhizal fungi from seeds of a threatened epiphytic orchid, *Dendrobium friedricksianum* Rchb. f. (Orchidaceae). *Agriculture and Natural Resources* 50(1): 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.01.002>.

Khan SA, Hamayun M, Yoon H *et al* (2008) Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC Microbiology* 8: 231. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-231>.

Li T, Yang W, Wu S, Selosse MA, Gao J (2021) Progress and prospects of mycorrhizal fungal diversity in orchids. *Frontiers in Plant Science*, 12: 646325. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.646325>.

May M, Jąkowski M, Novotná A, Dietel J, Ayasse M, Lallemand F, Figura T, Minasiewicz J, Selosse MA (2020) Three-year pot culture of *Epipactis helleborine* reveals autotrophic survival, without mycorrhizal networks, in a mixotrophic species. *Mycorrhiza* 30(1): 51-61. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00932-4>.

Magaña-Lemus RE, Ávila-Díaz I, Herrerías Diego Y (2021) Mating system and female reproductive success of the endemic and endangered epiphyte

Rhynchostele cervantesii (Orchidaceae) in a cloud forest in Michoacan, Mexico. *Plant Ecology and Evolution* 154 (1): 56–62. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2021.1551>.

McCormick MK, Jacquemyn H (2014) What constrains the distribution of orchid populations?. 202: 392-400. <https://doi.org/10.1111/nph.12639>.

McCormick MK, Whigham DF y Canchani-Viruet A (2018) Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist*, 219(4): 1207-1215. <https://doi.org/10.1111/nph.15223>.

Mala B, Kuegkong K, Sa-Ngiaemsri N, Nontachaiyapoom S (2017) Effect of germination media on *in vitro* symbiotic seed germination of three *Dendrobium* orchids. *South African Journal of Botany* 112: 521-526. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.008>.

Meng YY, Fan XL, Zhou LR, Shao SC, Liu Q, Selosse MA, Gao JY (2019) Symbiotic fungi undergo a taxonomic and functional bottleneck during orchid seeds germination: a case study on *Dendrobium moniliforme*. *Symbiosis* 79(3): 205-212. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00647-x>.

Novotná A, Benitez A, Herrera P, Cruz D, Filipczykova E, Suárez JP (2018) High diversity of root-associated fungi isolated from three epiphytic orchids in southern Ecuador. *Mycoscience* 59(1): 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.07.007>.

Ochora J, Stock WD, Linder HP, Newton LE (2001) Symbiotic seed germination in twelve Kenyan orchid species. *Systematics and Geography of Plants* 585-596. <https://doi.org/10.2307/3668703>.

Ortega-Larrocea MP (2008) Propagación simbiótica de orquídeas terrestres con fines de restauración edafoecológica. pp. 85-96. En: Álvarez-Sánchez, J. y Monroy-Ata, A. (Comp.). Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración. Facultad de Ciencias, UNAM. México D. F.

Otero JT, Bayman P, Ackerman JD (2005) Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata in vitro*: the potential for natural selection. *Evolutionary Ecology* 19: 29-43. <https://doi.org/10.1007/s10682-004-5441-0>.

Pereira G, Herrera H, Arriagada C, Cid H, García JL, Atala C (2021) Controlled mycorrhization of the endemic Chilean orchid *Chloraea gaviu* (Orchidaceae). *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 155(4): 848-855. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1801875>.

Pujasatria G. C., Miura C. & Kaminaka H. 2020. *In vitro* symbiotic germination: a revitalized heuristic approach for orchid species conservation. *Plants* 9(12): 1742. <https://doi.org/10.3390/plants9121742>.

Rafter M, Yokoya K, Schofield EJ, Zettler LW, Sarasan V (2016) Non-specific symbiotic germination of *Cynorkis purpurea* (Thouars) Kraezl., a habitat-specific terrestrial orchid from the Central Highlands of Madagascar. *Mycorrhiza* 26(6): 541-552. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0691-6>.

Rasmussen HN, Dixon KW, Jersáková J, Těšitelová 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>.

Riofrío ML, Cruz D, Torres E, de la Cruz M, Iriondo JM, Suárez JP (2013) Mycorrhizal preferences and fine spatial structure of the epiphytic orchid *Epidendrum rhopalostele*. *American Journal of Botany* 100(12): 2339-2348. <https://doi.org/10.3732/ajb.1300069>.

Salazar-Cerezo S, Martinez-Montiel N, Cruz-Lopez MDC, Martinez-Contreras RD (2018). Fungal diversity and community composition of culturable fungi in *Stanhopea trigrina* cast gibberellin producers. *Frontiers in microbiology* 9: 612. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00612>.

Selosse MA, Boullard B, Richardson D (2011) Noël Bernard (1874–1911): orchids to symbiosis in a dozen years, one century ago. *Symbiosis* 54(2): 61-68. <https://doi.org/10.1007/s13199-011-0131-5>.

Selosse MA, Petrolli R, Mujica MI, Laurent L, Perez-Lamarque B, Figura T, ... y Martos F (2022) The Waiting Room Hypothesis revisited by orchids: were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes?. *Annals of Botany*, 129(3): 259-270. <https://doi.org/10.1093/aob/mcab134>.

Shah S, Paudel MR, Thapa BB, Sharma H, Kashyap AK, Rekadwad BN, Sharma R, Sharma J, Pant B (2025). Extract from endophytic *Fusarium* isolates stimulates seed germination of the host and protocorm development of non-host orchids. *Communicative & Integrative Biology* 18(1): 2439798. <https://doi.org/10.1080/19420889.2024.2439798>.

Shah S, Shah B, Sharma R, Rekadwad B, Shouche YS, Sharma J, Pant B (2022) Colonization with non-mycorrhizal culturable endophytic fungi enhances orchid growth and indole acetic acid production. *BMC microbiology* 22(1): 101. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02507-z>.

Shao SC, Burgess KS, Cruse-Sanders JM, Liu Q, Fan XL, Huang H, Gao JY (2017) Using *in situ* symbiotic seed germination to restore over-collected medicinal orchids in Southwest China. *Frontiers in Plant Science* 8: 888. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00888>.

Shao SC, Wang QX, Beng KC, Zhao DK, Jacquemyn H (2020) Fungi isolated from host protocorms accelerate symbiotic seed germination in an endangered orchid species (*Dendrobium chrysotoxum*) from southern China. *Mycorrhiza* 30(4): 529-539. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00964-w>.

Sisti LS, Flores-Borges DNA, Andrade SALD, Koehler S, Bonatelli ML, Mayer JLS (2019) The role of non-mycorrhizal fungi in germination of the mycoheterotrophic orchid *pogoniopsis schenckii* cogn. *Frontiers in Plant Science* 10: 1589. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01589>.

SNIB (2016) Colaboración de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Naturalista. Orquídea Lirio (*Rhynchostele cervantesii*).

Soto-Arenas MA, Solano-Gómez AR (2007) Ficha técnica de *Rhynchostele cervantesii*. In: Soto-Arenas MA (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY NOM 059 ECOL 2000. Instituto Chinoín & Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A. C. Bases de datos SNIB CONABIO. Proyecto No. W029. México, D.F.

Stewart SL, Kane ME (2006) Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86(2): 147-158. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9098-y>.

Tan XM, Wang CL, Chen XM, Zhou YQ, Wang YQ, Luo AX, Liu ZH, Guo SX (2014) *In vitro* seed germination and seedling growth of an endangered epiphytic orchid, *Dendrobium officinale*, endemic to China using mycorrhizal fungi (*Tulasnella* sp.). *Scientia Horticulturae* 165: 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.031>.

Těšitelová T, Klimešová L, Vogt-Schilb H, Kotlínek M, Jersáková J (2022) Addition of fungal inoculum increases germination of orchid seeds in restored grasslands. *Basic and Applied Ecology* 63: 71-82. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2022.04.001>.

Tian F, Liao XF, Wang LH, Bai XX, Yang YB, Luo ZQ, Yan FX (2022) Isolation and identification of beneficial orchid mycorrhizal fungi in *Paphiopedilum barbigerrum* (Orchidaceae). *Plant Signaling & Behavior* 17(1): 2005882. <https://doi.org/10.1080/15592324.2021.2005882>.

Ventre-Lespiauq A, Jacquemyn H, Rasmussen HN, Méndez M (2021) Temporal turnover in mycorrhizal interactions: a proof of concept with orchids. *New Phytologist* 230(5): 1690-1699. <https://doi.org/10.1111/nph.17291>.

Wang X, Yam TW, Meng Q, Zhu J, Zhang P, Wu H, Wang J, Zhao Y, Song X (2016) The dual inoculation of endophytic fungi and bacteria promotes seedlings growth in *Dendrobium catenatum* (Orchidaceae) under *in vitro* culture conditions. *Plant Cell*,

Tissue and Organ Culture (PCTOC) 126(3): 523-531.
<https://doi.org/10.1007/s11240-016-1021-6>.

Warcup JH (1981) The mycorrhizal relationships of Australian orchids. *New phytologist*, 87(2), 371-381. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1981.tb03208.x>.

Xing X, Gao Y, Zhao Z, Waud M, Duffy KJ, Selosse MA, Jakalski M, Liu N, Jacquemyn H, Guo S (2020) Similarity in mycorrhizal communities associating with two widespread terrestrial orchids decays with distance. *Journal of Biogeography* 47(2), 421-433. <https://doi.org/10.1111/jbi.13728>.

Xing X, Liu Q, Gao Y, Shao S, Guo L, Jacquemyn H, ... y Guo S (2020) The architecture of the network of orchid–fungus interactions in nine co-occurring *Dendrobium* species. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8: 130. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00130>.

Yang H, Li NQ, Gao JY (2023) A novel method to produce massive seedlings via symbiotic seed germination in orchids. *Frontiers in Plant Science* 14: 1114105. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1114105>.

Yeh CM, Chung K, Liang CK, Tsai WC (2019) New insights into the symbiotic relationship between orchids and fungi. *Applied Sciences* 9(3): 585. <https://doi.org/10.3390/app9030585>.

Yokoya K, Zettler LW, Kendon JP, Bidartondo MI, Stice AL, Skarha S, Corey LL, Knight AC, Sarasan V (2015) Preliminary findings on identification of mycorrhizal fungi from diverse orchids in the Central Highlands of Madagascar. *Mycorrhiza* 25(8): 611-625. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0635-6>.

Zettler LW, Corey LL (2018) Orchid mycorrhizal fungi: isolation and identification techniques. In *Orchid propagation: from laboratories to greenhouses—methods and protocols* (pp. 27-59). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_2.

- Zettler LW, Piskin K. A., Stewart SL, Hartsock JJ, Bowles ML, Bell TJ (2005) Protocorm mycobionts of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nutt.) Lindley, and a technique to prompt leaf elongation in seedlings. *Studies in Mycology* 53(1): 163-171. <https://doi.org/10.3114/sim.53.1.163>.
- Zettler LW, Poulter SB, McDonald KI, Stewart SL (2007) Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus. *HortSci* 42: 135-139. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.1.135>.
- Zhang Y, Huo W, Hou J, Liu L, Yu X, Xu L (2022) Effects and benefits of orchid mycorrhizal symbionts on *Dendrobium officinale*. *Horticulturae* 8(10): 861. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100861>.
- Zhang Y, Li YY, Chen XM, Guo SX, Lee YI (2020) Effect of different mycobionts on symbiotic germination and seedling growth of *Dendrobium officinale*, an important medicinal orchid. *Botanical studies* 61(1): 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40529-019-0278-6>.
- Zhao DK, Selosse MA, Wu L, Luo Y, Shao SC, Ruan YL (2021) Orchid reintroduction based on seed germination-promoting mycorrhizal fungi derived from protocorms or seedlings. *Frontiers in plant science* 12: 701152. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.701152>.
- Zi XM, Sheng CL, Goodale UM, Shao SC, Gao JY (2014) *In situ* seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* 24(7): 487-499. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0565-8>.

VI. DISCUSIÓN GENERAL

El presente estudio sobre *R. cervantesii* aporta evidencia relevante sobre los patrones de micorrización y la influencia de factores abióticos en orquídeas epífitas, así como sobre su relación con el desarrollo, el desempeño fisiológico y la supervivencia de la planta a lo largo de su ciclo de vida. En primer lugar, el porcentaje de micorrización observado en *R. cervantesii* no superó el 41 % en plantas juveniles ni adultas, valor congruente con lo reportado para orquídeas terrestres como *Bletia roezlii*, *B. punctata* y *B. purpurata* (Beltrán-Nambo *et al.* 2010), pero considerablemente menor que el registrado en orquídeas epífitas como *Laelia autumnalis* y otras especies, donde se han documentado porcentajes de hasta el 79 % (Jiménez-Peña *et al.* 2018, Sathiyadash *et al.* 2012). Estas diferencias podrían estar asociadas a variaciones en el hábitat y en la disponibilidad de hongos simbios.

La colonización micorrízica en *R. cervantesii* mostró fluctuaciones estacionales, similares a las observadas en otras orquídeas epífitas, posiblemente influenciadas por variaciones en la humedad relativa, la temperatura y el tipo de sustrato, factores que modifican la distribución y abundancia de hongos micorrízicos en los microhábitats (Osorio-Gil *et al.* 2008, Pereira *et al.* 2005, Bertolini *et al.* 2014). Además, no se encontraron diferencias significativas en la micorrización entre plantas adultas y juveniles, un patrón también documentado en *Masdevallia coccinea* (Ordóñez *et al.* 2015). Esto sugiere que la asociación micorrízica se mantiene activa durante todo el ciclo de vida de estas orquídeas, incluidas las etapas adultas, probablemente como una estrategia adaptativa frente a condiciones ambientales variables y limitantes (Favre-Godal *et al.* 2020, Ávila-Díaz *et al.* 2013).

El número de pelotones por corte en *R. cervantesii* osciló entre 7 y 9, un valor similar al observado en *Vanilla planifolia* (Sathiyadash *et al.* 2012). Durante la época húmeda 1, se registró un mayor número de pelotones en plantas adultas que en las juveniles. Este patrón contrasta con el de *Masdevallia coccinea*, donde los pelotones fueron más abundantes en plantas juveniles (Ordóñez *et al.* 2015). Tanto el número de pelotones como el porcentaje de micorrización fueron mayores durante la época

húmeda 1, lo cual puede atribuirse a una mayor precipitación en dicha época. En cambio, las épocas secas se caracterizaron por una humedad mínima, lo que sugiere que las condiciones climáticas, en particular la disponibilidad hídrica, modulan la dinámica de la simbiosis micorrízica. Esta sensibilidad a factores ambientales refuerza la hipótesis de que el cambio climático podría afectar negativamente la micorrización y, por ende, la supervivencia de *R. cervantesii* y otras orquídeas.

La presencia de pelotones intactos y digeridos en todas las etapas de desarrollo indica una participación continua de los hongos micorrízicos en el ciclo de vida de esta especie. En particular, durante la época seca, se registró una mayor proporción de pelotones digeridos, lo que sugiere un uso activo de los recursos fúngicos bajo condiciones adversas, un patrón previamente documentado en especies como *Gavilea araucana*, *Epidendrum stamfordianum*, *Erycina crista-galli* y *Stelis quadrifida* (Durán *et al.* 2007, Bertolini *et al.* 2014). Este tipo de interacción también ha sido observado en estudios con múltiples especies terrestres, epífitas e incluso litófitas (Sathiyadash *et al.* 2012).

Se encontró un mayor porcentaje de colonización en raíces en contacto con el sustrato, en comparación con las raíces aéreas, un patrón también registrado en otras especies epífitas como *Laelia autumnalis* y *Epidendrum stamfordianum* (Bertolini *et al.* 2014, Jiménez-Peña *et al.* 2018). Asimismo, en especies de los Ghats Occidentales como *Aerides ringens* y *Luisia birchea*, la micorrización se limitó a las raíces en contacto con el sustrato (Murugan *et al.* 2010, Sathiyadash *et al.* 2012). No obstante, algunas especies como *Erycina crista-galli* y *Stelis quadrifida* presentan colonización en ambos tipos de raíces, lo que pone de manifiesto la variabilidad inter-específica (Bertolini *et al.* 2014). Este patrón puede explicarse por la frecuencia de contacto de los pelos radiculares con el sustrato, donde se produce la infección micorrízica inicial (Sathiyadash *et al.* 2012).

En cuanto a la distribución espacial de la micorrización, se detectó una mayor micorrización en la zona basal de las raíces, similar a lo reportado para *Laelia autumnalis* y *Rodriguezia granadensis* (Jiménez-Peña *et al.* 2018, Romero-Salazar

et al. 2022). No obstante, en otras especies como *Cephalanthera falcata*, *C. erecta* y *Bletia punctata*, la colonización ha sido mayor en las regiones apical y media (Matsuda *et al.* 2009, Beltrán-Nambo *et al.* 2010), lo que sugiere que la localización de la simbiosis puede depender del tipo de crecimiento radicular (Bertolini *et al.* 2014).

La disponibilidad de agua demostró tener un efecto determinante sobre la micorrización en *R. cervantesii*, lo que plantea una preocupación ante escenarios de cambio climático. Pese a la importancia potencial de esta simbiosis, hasta el momento no existen estudios *in situ* que evalúen su relación con el crecimiento de las orquídeas a lo largo del ciclo de vida. Los trabajos disponibles se han centrado en etapas tempranas, *in vitro*, como en *Dendrobium officinale*, donde se han documentado efectos positivos del micobionte sobre el desarrollo de plántulas (Zhang *et al.* 2022, Meng *et al.* 2017).

Los resultados de este estudio evidencian que la micorrización desempeña un papel fundamental en el desarrollo y el desempeño fisiológico de *R. cervantesii*, aunque su influencia varía según la etapa ontogenética y las condiciones ambientales. En términos generales, la asociación micorrízica mostró efectos diferenciales sobre la viabilidad de las semillas y el crecimiento vegetativo, lo que sugiere una compleja interacción entre factores bióticos y abióticos a lo largo del ciclo de vida de la especie.

En la formación de estructuras reproductivas, no se detectó una relación significativa entre el grado de micorrización y la producción floral y de frutos, pero sí con la viabilidad de las semillas. Este resultado sugiere que los beneficios de la simbiosis durante la fase reproductiva podrían manifestarse principalmente en la calidad de las semillas y no necesariamente en la cantidad de flores producidas. Así, los recursos derivados de la micorrización podrían redistribuirse hacia procesos asociados a la maduración y la viabilidad de los embriones, lo que coincide con la hipótesis de la “limitación de recursos” propuesta para orquídeas (Meléndez-Ackerman *et al.* 2000). La mayor viabilidad de semillas en individuos con altos niveles de micorrización también podría deberse a una mayor diversidad de hongos

simbiontes durante la fase reproductiva, como se ha documentado en *Neottia ovata* y otras especies terrestres (Oja *et al.* 2015, Herrera-Rus *et al.* 2020). Estos hongos podrían contribuir a un suministro más eficiente de nutrientes clave durante la floración y la fructificación.

En las etapas vegetativas, la abundancia de pelotones micorrízicos se relacionó positivamente con la producción foliar tanto en individuos juveniles como en adultos, lo que indica que la colonización fúngica contribuye directamente al crecimiento y al desempeño fotosintético de la planta. Este hallazgo coincide con observaciones previas en orquídeas epífitas y terrestres cultivadas *in vitro*, en las que la inoculación con hongos del género *Tulasnella* o *Ceratobasidium* favoreció el desarrollo radicular y foliar (Hossain *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2022). En *R. cervantesii* se observó que la producción de brotes nuevos se asoció negativamente con el número de pelotones intactos y positivamente con el número de pelotones degradados, lo que sugiere que las plantas podrían emplear activamente los hongos micorrízicos como fuente de nutrientes para promover la brotación. Este patrón refuerza la idea de una simbiosis dinámica, en la que el intercambio de recursos entre el hongo y la planta puede variar según las necesidades fisiológicas y el estado de desarrollo del hospedero.

La dependencia de la micorrización fue más evidente en individuos juveniles, mientras que en las plantas adultas los efectos fueron más atenuados. Este comportamiento podría atribuirse a una mayor capacidad fotosintética y de almacenamiento en las etapas maduras, lo que reduce la necesidad de aportes externos de carbono o nutrientes. Patrones similares se han registrado en otras orquídeas, como *Masdevallia coccinea* (Ordóñez *et al.* 2015), lo que sugiere que la intensidad de la simbiosis micorrízica podría estar modulada ontogénicamente.

Respecto a los factores abióticos, la temperatura fue la única que mostró un efecto negativo significativo sobre el crecimiento en el primer período de evaluación, mientras que la luz y la humedad relativa no ejercieron influencia detectable. Estos resultados concuerdan con estudios que indican la existencia de rangos térmicos óptimos para el desarrollo de orquídeas (Arditti y Pridgeon 1997), y con

observaciones en otras especies epífitas donde la intensidad lumínica tiene un efecto limitado sobre el crecimiento vegetativo (Stancato *et al.* 2002). El patrón registrado sugiere que *R. cervantesii* posee cierta plasticidad fisiológica ante la variación lumínica, pero podría ser sensible a incrementos de temperatura, lo cual adquiere relevancia en el contexto del cambio climático.

La supervivencia de *R. cervantesii* se asoció positivamente con el grado de micorrización, lo que refuerza la importancia de esta interacción para la adecuación de la especie. Este efecto puede explicarse por la activación de rutas metabólicas vinculadas a la síntesis de compuestos secundarios con funciones protectoras frente al estrés biótico y abiótico, un mecanismo reconocido en orquídeas micorrizadas durante la aclimatación *ex vitro* (Hossain *et al.* 2013). En este sentido, la micorrización no solo contribuye al establecimiento y al crecimiento inicial, sino también a la tolerancia fisiológica y al mantenimiento de la vitalidad de las plantas adultas en condiciones naturales.

En este estudio, se identificó que todas las cepas fúngicas aisladas de los pelotones del córtex radicular de *R. cervantesii* pertenecen al filo Ascomycota, en contraste con la literatura previa que resalta a los Basidiomycetes como los micobiontes más comunes en orquídeas (Graham y Dearnaley 2012, Martos *et al.* 2012). Esta predominancia de Ascomycetes sugiere que, al menos en esta especie endémica, la diversidad fúngica asociada a raíces podría diferir de los patrones generales reportados, lo que resalta la importancia de analizar especies específicas y sus particularidades ecológicas. Los géneros detectados, como *Apiospora*, *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Penicillium*, *Didymella*, *Nemania* y *Xylaria*, se han reportado previamente como endófitos de orquídeas (Sudheep y Sridhar 2012, Tan *et al.* 2012, Deepthi y Ray 2018, Ma *et al.* 2022, Shah *et al.* 2022), pero el hallazgo de *Xylaria karsticola* asociado a *R. cervantesii* constituye un registro novedoso, ampliando el conocimiento sobre la diversidad fúngica de orquídeas endémicas.

La función ecológica de estos hongos endófitos parece relevante para la planta hospedadora, ya que muchos de ellos producen metabolitos que promueven el crecimiento vegetal y protegen frente a patógenos o herbívoros (Khan *et al.* 2011,

Overgaard *et al.* 2023). En particular, la cepa de *Diaporthe* aislada demostró capacidad para producir de IAA, lo que sugiere un potencial significativo para su uso en propagación *in vitro* de *R. cervantesii* y en estrategias de conservación *ex situ*. Esto subraya el valor funcional de los endófitos más allá de su mera presencia, destacando su papel en la promoción del crecimiento y la supervivencia de la especie.

Desde una perspectiva evolutiva, estos resultados adquieren especial relevancia en el marco de la “Hipótesis de la Sala de Espera” (*Waiting Room Hypothesis*), que plantea que el endofitismo constituye una etapa transicional en la evolución de las asociaciones micorrízicas. Según este modelo, los hongos habrían colonizado inicialmente las raíces como simbiontes neutros antes de establecer interacciones mutualistas plenas, lo que implicaría una transición gradual desde un estilo de vida saprótrofo hacia la simbiosis mutualista (Selosse *et al.* 2007, Thoen *et al.* 2020, Selosse *et al.* 2022). La predominancia de ascomicetes endófitos en *R. cervantesii* podría, por tanto, reflejar un estado intermedio en este continuo evolutivo. Un ejemplo análogo se observa en el género *Mycena*, que incluye especies capaces de comportarse como saprótrofas, endófitas o micorrízicas de orquídeas (Boberg *et al.* 2008, Ogura-Tsujita *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2012, Lorberau *et al.* 2017, Osono 2020).

El análisis de las asociaciones fúngicas a lo largo de la ontogenia de la planta reveló un reemplazo parcial de micobiontes, en el que algunas especies permanecen presentes en todas las etapas de desarrollo, mientras que otras se incorporan o se reemplazan conforme la planta madura. Este patrón concuerda con observaciones previas en orquídeas epífitas y terrestres, donde la ontogenia influye en la dinámica de las asociaciones micorrízicas, lo que refleja cambios en las demandas fisiológicas de la planta a lo largo de su ciclo de vida (Fernández *et al.* 2023, McCormick *et al.* 2021). Es relevante destacar que *Apiospora* fue el único género detectado en todas las categorías ontogenéticas, lo que sugiere que podría desempeñar un papel ecológico central y estable en las raíces de *R. cervantesii*.

Asimismo, se observó un efecto estacional en la riqueza de micobiontes, con un mayor número de aislamientos durante la temporada húmeda y menor durante la seca, lo que indica que las condiciones climáticas modulan la dinámica de los hongos asociados. Este patrón sugiere que la disponibilidad de recursos hídricos y las variaciones ambientales podrían influir en la composición fúngica y, potencialmente, en el rendimiento ecológico de la planta, como se ha reportado en otras especies terrestres (Han *et al.* 2016).

Los resultados de este estudio demuestran que las cepas fúngicas aisladas de *R. cervantesii*, pertenecientes al filo Ascomycota, desempeñan un papel importante tanto en la germinación como en el desarrollo temprano de esta orquídea. Los porcentajes de germinación simbiótica obtenidos (12 % y 44 %) se encuentran dentro del rango reportado para otras especies, lo que confirma la viabilidad de los hongos asociados a *R. cervantesii* como simbiontes funcionales. Aunque tradicionalmente se ha atribuido a los basidiomicetos, especialmente del género *Tulasnella*, el papel principal en la germinación simbiótica de orquídeas, nuestros resultados refuerzan la evidencia emergente de que hongos ascomicetos también pueden establecer interacciones simbióticas efectivas, como se ha documentado para *Fusarium*, *Clonostachys* y otros géneros (Sisti *et al.* 2019, Shah *et al.* 2025).

Entre las cepas evaluadas, *Nemania diffusa* y *Diaporthe sp.* promovieron significativamente la germinación de las semillas. El efecto positivo de *Nemania* constituye un hallazgo novedoso, dado que su papel simbiótico no había sido reportado en orquídeas, aunque sí se ha relacionado con funciones benéficas en las raíces de otras plantas, como la protección y la regulación de la microbiota rizosférica (Farsi y Farokhi 2018). En el caso de *Diaporthe sp.*, su efecto promotor puede explicarse por la capacidad de sintetizar ácido indolacético (AIA), un mecanismo ya descrito en otras orquídeas (Deepthi y Ray 2019), lo que sugiere una contribución directa al desarrollo inicial de *R. cervantesii*. Asimismo, *Penicillium sp.* y la cepa J11S favorecieron el crecimiento de plántulas, lo que indica una posible especialización funcional entre hongos asociados a diferentes etapas ontogénicas,

en concordancia con la hipótesis de Zhao *et al.* (2021), que propone la existencia de micobiontes específicos para semillas y raíces.

A nivel morfológico, se observó la formación de pelotones en las raíces de plántulas cultivadas *in vitro* en presencia de diversas cepas de *Ascomycota*, lo que confirma la capacidad de estos hongos para establecer interacciones simbióticas similares a las micorrízicas descritas en otras orquídeas epífitas (Shah *et al.* 2022). No obstante, los tratamientos fúngicos no mostraron un efecto significativo en la supervivencia de las plántulas, posiblemente debido a limitaciones nutricionales del medio de cultivo, lo que sugiere la necesidad de optimizar las condiciones experimentales para evaluar adecuadamente el potencial simbiótico de estas cepas.

El predominio de *Ascomycetes* en *R. cervantesii* coincide con observaciones recientes sobre su microbiota natural (Magaña-Lemus *et al.* en proceso) y plantea la necesidad de reconsiderar la relevancia ecológica y funcional de este grupo fúngico en orquídeas epífitas.

La dinámica ontogenética y estacional observada en las asociaciones fúngicas sugiere un mecanismo adaptativo frente a condiciones ambientales cambiantes, mientras que géneros como *Apiospora* y *Diaporthe* destacan por su potencial para promover el crecimiento y la resistencia vegetal, aportando información valiosa para el desarrollo de estrategias de conservación y propagación *in vitro*. Estos hallazgos aportan bases sólidas para futuras investigaciones orientadas a comprender los mecanismos simbióticos y a desarrollar estrategias de conservación y propagación de orquídeas epífitas endémicas bajo escenarios de cambio ambiental.

VII. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES

🌸 Durante el desarrollo de la presente investigación se registró un número limitado de individuos de *R. cervantesii* en los primeros estadios de desarrollo, con únicamente cuatro plántulas y tres protocormos. Ante esta baja representatividad, se sugiere instalar trampas de semilla en el sitio de estudio para analizar la asociación de *R. cervantesii* con sus hongos micorrízicos durante las etapas tempranas de desarrollo. Esta estrategia permitiría obtener información más completa sobre el proceso de micorrización a lo largo del ciclo de vida de la especie.

🌸 La investigación se llevó a cabo durante dos años, abarcando cuatro épocas representativas de distintas condiciones climáticas. Se observó que la micorrización está influenciada por la humedad relativa, por lo que se recomienda realizar estudios a mayor plazo que consideren las mismas condiciones estacionales. Esto permitiría comprender mejor las dinámicas de la asociación orquídea-hongo ante las posibles fluctuaciones climáticas interanuales.

🌸 Para determinar la relación entre la micorrización, los factores ambientales y el desarrollo de *R. cervantesii*, se monitorearon las mismas estructuras aéreas (hojas y pseudobulbos), que alcanzaron su máximo desarrollo durante el primer período de muestreo (EH1–ES1). Esta tendencia podría estar relacionada con el patrón de crecimiento simpodial de la especie, lo que explicaría la ausencia de correlación significativa en el segundo período (EH2–ES2). Por tanto, se sugiere considerar este tipo de crecimiento en futuros estudios enfocados en especies con características morfológicas similares.

🌸 En el presente trabajo se logró identificar molecularmente la mayoría de los hongos aislados a partir de raíces de *R. cervantesii*, observándose que todos pertenecen a la división Ascomycota. Este hallazgo resulta relevante, dado que estudios previos reportan que los hongos micorrízicos estrictos asociados a orquídeas pertenecen comúnmente a la división Basidiomycota. Por ello, se considera fundamental llevar a cabo un análisis exhaustivo de la micobiota radicular de esta especie, incorporando las diferentes etapas del desarrollo ontogénico, así

como realizar de más muestreos y análisis multilocus que permitan una identificación taxonómica más precisa de los hongos simbioses.

🌸 Dado que a los 90 días se obtuvieron tasas de germinación relativamente bajas en *R. cervantesii*, se recomienda realizar ensayos de germinación simbiótica y asimbiótica de mayor duración. Estas pruebas permitirían evaluar con mayor precisión el efecto de los hongos endófitos y micorrízicos putativos en las etapas tempranas de desarrollo (protocormos y plántulas) de la especie.

🌸 Considerando que *R. cervantesii* está catalogada como especie amenazada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2019), resulta prioritario promover acciones que contribuyan a mitigar las presiones que enfrenta, entre las que destacan la extracción no regulada de individuos silvestres y el cambio de uso de suelo. En este sentido, se propone considerar la reintroducción de plántulas propagadas asimbióticamente en el Laboratorio de Biología de la Conservación Vegetal (LBCV) en el sitio de estudio.

🌸 Cabe destacar que desde 2013, el LBCV ha establecido vínculos de colaboración con la Comunidad Indígena de Santiago Tingambato, orientados a la conservación de las especies de orquídeas presentes en el predio de Tenderio. En este marco, se sugiere promover la donación de plántulas propagadas *in vitro* a miembros de dicha comunidad, con el propósito de fomentar su cultivo y su eventual comercialización. Esta estrategia podría contribuir a reducir la extracción de ejemplares silvestres y ofrecer una alternativa sustentable de manejo y aprovechamiento de los recursos naturales locales.

VIII. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

AOS 2011. Orchid Market Passed \$ 1 Billion Mark. Available at: Orchid News. <http://www.orchidsociety.com>. Accesada en Noviembre de 2021. APS Press.

Ávila-Díaz I., R. Garibay-Orijel, R. E. Magaña-Lemus y K. Oyama. 2013. **Molecular evidence reveals fungi associated within the epiphytic orchid *Laelia speciosa* (HBK) Schltr.** *Botanical Sciences* 91 (4): 523–529. <https://doi.org/10.17129/botsci.429>

Banda-Sánchez L. C., A. I. Gil-Clavijo, J. P. Moreno-López, L. E. Vanegas-Martínez y C. A. Ariza-Castillo. 2020. **Metodologías de muestreo y procedimientos en laboratorio para investigaciones en orquídeas presentes en la región del Sumapaz, Colombia.** Editorial de la Universidad de Cundinamarca, Fusagasugá, Colombia. 67 pp. <https://doi.org/10.36436/9789585251595>

Batty A. L., M. C. Brundrett, K. W. Dixon y K. Sivasithamparam. 2006. **In situ symbiotic seed germination and propagation of terrestrial orchid seedlings for establishment at field sites.** *Australian Journal of Botany* 54 (4): 375–381. <https://doi.org/10.1071/BT04024>

Beltrán-Nambo M. A., Y. Carreón-Abud y M. P. Ortega-Larrocea. 2010. **Mycorrhizal colonization patterns of three *Bletia* species in a natural forest reserve in Michoacán, México.** *International Orchid Symposium* 878: 43–52. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.878.4>

Benítez-Vieyra S., A. M. Medina, E. Glinos y A. A. Cocucci. 2006. **Pollinator-mediated selection on floral traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated orchid.** *Functional Ecology* 20: 948–957. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01179.x>

Bertolini V., J. Cruz-Blasi, A. Damon y J. Valle-Mora. 2014. **Seasonality and mycorrhizal colonization in three species of epiphytic orchids in southeast Mexico.** *Acta Botanica Brasilica* 28 (4): 512–518. <https://doi.org/10.1590/0102-33062014abb3436>

- Boberg J., R. D. Finlay, J. Stenlid, T. Näsholm y B. D. Lindahl. 2008. **Glucose and ammonium additions affect needle decomposition and carbon allocation by the litter degrading fungus *Mycena epipterygia***. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 995–999. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.11.005>
- Bonnardeaux Y., M. Brundrett, A. Batty, K. Dixon, J. Koch y K. Sivasithamparam. 2007. **Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions**. *Mycological Research* 111 (1): 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.11.006>
- Castillo-Pérez L. J. y C. C. Álvarez. 2019. **¿Cómo crecen y se relacionan las orquídeas?** *Universitarios Potosinos* 236: 18–23.
- Castillo-Pérez L. J., D. Martínez-Soto, J. J. Maldonado-Miranda, A. J. Alonso-Castro y C. Carranza-Álvarez. 2018. **The endemic orchids of Mexico: a review**. *Biologia* 74: 1–13. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0147-x>
- Ceja-Romero J., A. Mendoza-Ruiz, A. R. López-Ferrari, A. Espejo-Serna, B. Pérez-García y J. García-Cruz. 2010. **Las epífitas vasculares del estado de Hidalgo, México: diversidad y distribución**. *Acta Botanica Mexicana* 93: 1–39. <https://doi.org/10.21829/abm93.2010.274>
- Cevallos S., A. Sánchez-Rodríguez, C. Decock, S. Declerck y J. P. Suárez. 2017. **Are there keystone mycorrhizal fungi associated to tropical epiphytic orchids?** *Mycorrhiza* 27 (3): 225–232. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0746-8>
- Chase M. W., J. V. Freudenstein, K. M. Cameron y R. L. Barrett. 2003. **DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification**. En: Dixon K. W., S. P. Kell, R. L. Barrett y P. J. Cribb (Eds.). *Orchid conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah. pp. 69–89.
- Chase M. W., K. M. Cameron, J. V. Freudenstein, A. M. Pridgeon, G. Salazar, C. van den Berg y A. Schuiteman. 2015. **An updated classification of Orchidaceae**. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177: 151–174. <https://doi.org/10.1111/boj.12234>

- Christenhusz M. J. M. y J. W. Byng. 2016. **The number of known plant species in the world and its annual increase.** *Phytotaxa* 261 (3): 201–217. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.261.3.1>
- Cox-Tamay L. D. y J. S. Cervantes-Urbe. 2016. **Laelias: flores mágicas y ceremoniales.** *Desde el Herbario CICY* 8: 122–127.
- Cozzolino S. y A. Widmer. 2005. **Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception?** *Trends in Ecology and Evolution* 20: 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.06.004>
- Cruz-García G. y R. B. Narváez. 2013. **Uso medicinal de *Prosthechea michuacana* y *P. karwinskii* en la Mixteca Alta Oaxaqueña.** *Desde el Herbario CICY* 5: 29–31.
- Dearnaley J. D. W., F. Martos y M. A. Selosse. 2012. **Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects.** En: Hock B. (Ed.). *Fungal Associations*. The Mycota, vol. IX. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 207–230. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30826-0_12
- Deepthi A. S. y J. G. Ray. 2018. **Endophytic diversity of hanging velamen roots in the epiphytic orchid *Acampe praemorsa*.** *Plant Ecology and Diversity* 11 (5–6): 649–661. <https://doi.org/10.1080/17550874.2019.1610911>
- Deepthi A. S. y J. G. Ray. 2019. **Applications of endophytic fungal isolates from velamen root of wild orchids in floriculture.** *Brazilian Journal of Biological Sciences* 6 (14): 577–589. <https://doi.org/10.21472/bjbs.061409>
- Dearnaley J., S. Perotto y M. A. Selosse. 2016. **Structure and development of orchid mycorrhizas.** En: Martin F. (Ed.). *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. John Wiley & Sons, Hoboken, USA. pp. 63–86. <https://doi.org/10.1002/9781118951446.ch5>
- Dondon R., A. J. Marsaioli, S. Koehler, R. Singer y M. C. Amaral. 2002. **The chemistry of floral rewards of Maxillarieae (Orchidaceae).** *25th Annual Meeting of the Brazilian Chemical Society*. pp. 20–23.

- Duffy K. J., M. Waud, B. Schatz, T. Petanidou y H. Jacquemyn. 2019. **Latitudinal variation in mycorrhizal diversity associated with a European orchid.** *Journal of Biogeography* 46 (5): 968-980. <https://doi.org/10.1111/jbi.13548>
- Durán C., M. Rivero y P. Seemann. 2007. **Identificación de endomicorrizas en la orquídea nativa *Gavilea araucana*.** *Agro Sur* 35 (2): 67–69. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2007.v35n2-32>
- Emeterio-Lara A., V. Palma-Linares, L. M. Vázquez-García y J. Mejía-Carranza. 2016. **Uses and trade of wild orchids in the southern region of the state of Mexico.** *Polibotánica* 42: 197–214. <https://doi.org/10.18387>
- Espejo-Serna A. 2012. **El endemismo en las Liliopsida mexicanas.** *Acta Botanica Mexicana* 100: 195–257. <https://doi.org/10.21829/abm100.2012.36>
- Farsi M. y S. Farokhi. 2018. **Biosynthesis of antibacterial silver nanoparticles by endophytic fungus *Nemania* sp. isolated from *Taxus baccata*.** *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 20 (6). <https://doi.org/10.5812/zjrms.57916>
- Fay M. F., T. Pailler y K. W. Dixon. 2015. **Orchid conservation: making the links.** *Annals of Botany* 116 (3): 377–379. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv142>
- Favre-Godal Q., L. Gourguillon, S. Lordel-Madeleine, K. Gindro y P. Choisy. 2020. **Orchids and their mycorrhizal fungi: an insufficiently explored relationship.** *Mycorrhiza* 30: 5–22. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00934-2>.
- Fernández M., J. Kaur y J. Sharma. 2023. **Co-occurring epiphytic orchids have specialized mycorrhizal fungal niches that are also linked to ontogeny.** *Mycorrhiza* 33: 87–105. <https://doi.org/10.1007/s00572-022-01099-w>
- Freuler M. J. 2007. **Orquídeas.** Albatros, Buenos Aires, Argentina. 112 pp.
- García-Cancel J. G., E. J. Meléndez-Ackerman, P. Olaya-Arenas, A. Merced, N. P. Flores y R. L. Tremblay. 2013. **Associations between *Lepanthes rupestris* orchids and bryophyte presence in the Luquillo Experimental Forest, Puerto Rico.** *Naturalista del Caribe* 6: 1–14.

- Givnish T. J., D. Spalink, M. Ames, S. P. Lyon, S. J. Hunter y A. Zuluaga. 2016. **Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal.** *Journal of Biogeography* 43: 1905–1916. <https://doi.org/10.1111/jbi.12854>
- Graham R. R. y J. D. W. Dearnaley. 2012. **The rare Australian epiphytic orchid *Sarcochilus weinthalii* associates with a single species of *Ceratobasidium*.** *Fungal Diversity* 54 (1): 31–37. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0106-0>
- Gravendeel B., A. Smithson, F. J. W. Slik y A. Schuiteman. 2004. **Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity?** *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 359: 1523–1535. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1529>
- Hágsater E., M. A. Soto, G. A. Salazar, R. Jiménez, M. A. López y R. L. Dressler. 2005. **Las orquídeas de México.** Instituto Chinoín, A.C., México, D.F.
- Han J. Y., H. Xiao y J. Gao. 2016. **Seasonal dynamics of mycorrhizal fungi in *Paphiopedilum spicerianum*, a critically endangered orchid from China.** *Global Ecology and Conservation* 6: 327–338. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2016.03.011>
- Herrera H., J. Soto, L. E. de Bashan, I. Sampedro y C. Arriagada. 2019. **Root-associated fungal communities in two populations of the fully mycoheterotrophic plant *Arachnitis uniflora*.** *Microorganisms* 7 (12): 586. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120586>
- Herrera-Rus I., J. E. Pastor y R. Juan. 2020. **Fungal colonization associated with phenological stages of a photosynthetic terrestrial temperate orchid from the Southern Iberian Peninsula.** *Journal of Plant Research* 133 (6): 807–825. <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01225-9>
- Hetherington-Rauth M. C. y S. R. Ramírez. 2016. **Evolution and diversity of floral scent chemistry in the euglossine bee-pollinated orchid genus *Gongora*.** *Annals of Botany* 118: 135–148. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw072>

Hossain M. M., P. Rahi, A. Gulati y M. Sharma. 2013. **Improved ex vitro survival of asymbiotically raised seedlings of *Cymbidium* using mycorrhizal fungi isolated from distant orchid taxa.** *Scientia Horticulturae* 159: 109–116. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.003>

Jacquemyn H., V. Merckx, R. Brys, D. Tyteca, B. P. A. Cammue, O. Honnay y B. Lievens. 2011. **Analysis of network architecture reveals phylogenetic constraints on mycorrhizal specificity in the genus *Orchis*.** *New Phytologist* 192: 518–528. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03796.x>

Jiménez-Peña N., M. Sandoval-Villa, V. H. Volke-Haller, M. E. Pedraza-Santos, E. Fernández-Herrera. 2018. **Colonización micorrízica de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl.** *Ecosistema y Recursos Agropecuarios* 5 (15): 547-553. <https://doi.org/10.19136/era.a5n15.1756>

Khan M. S. A., I. Ahmad. 2011. **Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 90 (3): 1083-1094. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3152-3>

Khamchatra N., K. Dixon, K. Chayamarit, S. Apisitwanich, S. Tantiwiwata. 2016. **Using *in situ* seed baiting technique to isolate and identify endophytic and mycorrhizal fungi from seeds of a threatened epiphytic orchid, *Dendrobium friedericksianum* Rchb.f. (Orchidaceae).** *Agriculture and Natural Resources* 50 (1): 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.01.002>

Li T., W. Yang, S. Wu, M. C. Selosse, J. Gao. 2021. **Progress and prospects of mycorrhizal fungal diversity in orchids.** *Frontiers in Plant Science* 12: 1-20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.646325>

Lorberau K. E., S. S. Botnen, S. Mundra, A. B. Aas, J. Rozema, P. B. Eidesen, H. Kauserud. 2017. **Does warming by open-top chambers induce change in the root-associated fungal community of the arctic dwarf shrub *Cassiope tetragona* (Ericaceae)?** *Mycorrhiza* 27: 513–524. <https://doi.org/10.1007/s00572-017-0767-y>

- Ma X., P. Chomnunti, M. Doilom, D. A. Daranagama, J. Kang. 2022. **Multigene phylogeny reveals endophytic Xylariales novelties from *Dendrobium* species from Southwestern China and Northern Thailand.** *Journal of Fungi* 8 (3): 248. <https://doi.org/10.3390/jof8030248>
- Ma X., J. Kang, S. Nontachaiyapoom, T. Wen, K. D. Hyde. 2015. **Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids.** *Current Science* 108: 1-16.
- McCormick M., R. Burnett, D. Whigham. 2021. **Protocorm-supporting fungi are retained in roots of mature *Tipularia discolor* orchids as mycorrhizal fungal diversity increases.** *Plants* 10 (6): 1251. <https://doi.org/10.3390/plants10061251>
- Martos F., F. Muñoz, T. Pailler, I. Kottke, C. Gonneau, M. C. Selosse. 2012. **The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids.** *Molecular Ecology* 1-12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05692.x>
- Matsuda Y., A. Amiya, S. Ito. 2009. **Colonization patterns of mycorrhizal fungi associated with two rare orchids, *Cephalanthera falcata* and *C. erecta*.** *Ecological Research* 24: 1023-1031. <https://doi.org/10.1007/s11284-008-0575-0>
- Meléndez-Ackerman E. J., J. D. Ackerman, J. A. Rodriguez-Robles. 2000. **Reproduction in an orchid can be resource-limited over its lifetime.** *Biotropica* 32 (2): 282-290. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2000.tb00471.x>
- Meng P., S. C. Shao, G. H. Peng. 2017. **Effects of different endophytic fungi on *Dendrobium officinale* seedling growth.** *Guizhou Agricultural Sciences* 45 (6): 106-110.
- Murugan T., K. Sathiyadash, V. Muniappan, T. Muthukumar. 2010. **The mycorrhizal status of South Indian epiphytic orchids.** *The Journal of the Orchid Society of India* 24: 29-33.
- Nauray-Huari W. 2013. **Manual de Orquídeas, identificación y origen.** Centro de Documentación Ambiental, 1: 2-38.

- Novotná A., A. Benítez, P. Herrera, D. Cruz, E. Filipczyková, J. P. Suarez. 2018. **High diversity of root-associated fungi isolated from three epiphytic orchids in southern Ecuador.** *Mycoscience* 59: 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.07.007>
- Ogura-Tsujita, Y., G. Gebauer, T. Hashimoto, H. Umata y T. Yukawa. 2009. **Evidence for novel and specialized mycorrhizal parasitism: the orchid *Gastrodia confusa* gains carbon from saprotrophic *Mycena*.** *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 276 (1657): 761-767. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1225>
- Oja, J., P. Kohout, L. Tedersoo, T. Kull y U. Kõljalg. 2015. **Temporal patterns of orchid mycorrhizal fungi in meadows and forests as revealed by 454 pyrosequencing.** *New Phytologist* 205 (4): 1608-1618. <https://doi.org/10.1111/nph.13223>
- Ordóñez, N., J.T. Otero-Ospina y L. Diaz. 2015. **Interacciones micorrízicas de *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl.** *Orquideología* 31 (2): 123-135.
- Osono, T. 2020. **Functional diversity of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition.** *Ecological Research* 35: 30-43. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12063>
- Osorio-Gil, E.M., J. Forero-Montaña y J.T. Otero. 2008. **Variation in mycorrhizal infection of the epiphytic orchid *Ionopsis utriculariodes* (Orchidaceae) on different substrata.** *Caribbean Journal of Science* 44 (1): 130-132. <https://doi.org/10.18475/cjos.v44i1.a15>
- Otero, J.T., P. Bayman y J.D. Ackerman. 2005. **Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* in vitro: the potential for natural selection.** *Evolutionary Ecology* 19: 29-43. <https://doi.org/10.1007/s10682-004-5441-0>
- Otero, J.T., P.H. Thrall, M. Clements, J.J. Burdon y J.T. Miller. 2011. **Codiversification of orchids (Pterostylidinae) and their associated mycorrhizal**

fungi. *Australian Journal of Botany* 59 (5): 480-497.
<https://doi.org/10.1071/BT11053>

Overgaard, M.L., T. Aalborg, E.J. Zeuner, K.R. Westphal, F.A. Lau, V.S. Nielsen, K.V. Carstensen, E.A. Hundebøll, T.A. Westermann, G.G. Rathsach, J.L. Sørensen, J.C. Frisvad, R. Wimmer y T.E. Sondergaard. 2023. **Quick guide to secondary metabolites from *Apiospora* and *Arthrinium*.** *Fungal Biology Reviews* 43: 100288. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2022.10.001>

Parthibhan, S., M.V. Rao y T.S. Kumar. 2017. **Culturable fungal endophytes in shoots of *Dendrobium aqueum* Lindley – An imperiled orchid.** *Ecological Genetics and Genomics* 3-5: 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2017.06.004>

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

Peterson, R.L., Y. Uetake, P. Bonfante y A. Faccio. 1996. **The interface between fungal hyphae and orchid protocorm cells.** *Canadian Journal of Botany* 74 (12): 1861-1870. <https://doi.org/10.1139/b96-223>

Qin, J., Z. Wei, G. Zai-Wei y Z. Shi-Bao. 2019. **Molecular identifications uncover diverse fungal symbionts of *Pleione* (Orchidaceae).** *Fungal Ecology* 37: 19-29.
<https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.10.003>

Rammitu, K., T. Yagame, Y. Yamashita, T. Yukawa, S. Isshiki y Y. Ogura-Tsujita. 2019. **A leafless epiphytic orchid, *Taeniophyllum glandulosum* Blume (Orchidaceae), is specifically associated with the Ceratobasidiaceae family of basidiomycetous fungi.** *Mycorrhiza* 29: 159-166. <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00881-7>

Romero-Salazar, N.C., J.M. Galvis-Gratz y J.P. Moreno-López. 2022. **Hongos formadores de micorrizas aislados a partir de raíces de la orquídea**

Rodriguezia granadensis (LINDL.) RCHB. F. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 25 (1). <http://doi.org/10.31910/rudca.v25.n1.2022.2086>

Ruibal, M.P., Y. Triponéz, L.M. Smith, R. Peakall y C.C. Linde. 2017. **Population structure of an orchid mycorrhizal fungus with genus-wide specificity.** *Scientific Reports* 7 (5613): 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05855-3>

Rzedowski, G.C. de, J. Rzedowski y colaboradores. 2005. **Flora fanerogámica del Valle de México.** Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. 1406 pp.

Sathiyadash, K., T. Muthukumar, E. Uma y R.R. Pandey. 2012. **Mycorrhizal association and morphology in orchids.** *Journal of Plant Interactions* 7 (3): 238-247. <http://doi.org/10.1080/17429145.2012.699105>

Selosse, M.A. 2014. **The latest news from biological interactions in orchids: in love, head to toe.** *New Phytologist* 202: 337–340. <https://doi.org/10.1111/nph.12769>

Selosse, M.A., B. Boullard y D. Richardson. 2011. **Noël Bernard (1874–1911): orchids to symbiosis in a dozen years, one century ago.** *Symbiosis* 54 (2): 61-68. <https://doi.org/10.1007/s13199-011-0131-5>

Selosse, M.A. y F. Martos. 2014. **Do chlorophyllous orchids heterotrophically use mycorrhizal fungal carbon?** *Trends in Plant Science* 19 (11): 683-685. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.09.005>

Selosse, M.A., R. Petrolli, M.I. Mujica, L. Laurent, B. Perez-Lamarque, T. Figura, A. Bourceret, H. Jacquemyn, T. Li, J. Gao, J. Minasiewicz y F. Martos. 2022. **The waiting room hypothesis revisited by orchids: were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes?** *Annals of Botany* 129 (3): 259-270. <https://doi.org/10.1093/aob/mcab134>

Selosse, M.A., S. Setaro, F. Glatard, F. Richard, C. Urcelay y M. Weiß. 2007. **Sebacinales are common mycorrhizal associates of Ericaceae.** *New Phytologist* 174: 864–878. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02064.x>

Selosse, M.A., M. Weiß, J.L. Jany y A. Tillier. 2002. **Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) LCM Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae.** *Molecular Ecology* 11 (9): 1831-1844. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01553.x>

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2010. *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental—Especies nativas de México de flora y fauna silvestres—Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio—Lista de especies en riesgo*. Diario Oficial de la Federación, 30 de diciembre de 2010, México. Disponible en: <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4254/semarnat/semarnat.htm>

Shah, S., M.R. Paudel, B.B. Thapa, H. Sharma, A.K. Kashyap, B.N. Rekadwad, R. Sharma, J. Sharma y B. Pant. 2025. **Extract from endophytic *Fusarium* isolates stimulates seed germination of the host and protocorm development of non-host orchids.** *Communicative & Integrative Biology* 18 (1): 2439798. <https://doi.org/10.1080/19420889.2024.2439798>

Shah, S., B. Shah, R. Sharma, B. Rekadwad, Y.S. Shouche, J. Sharma y B. Pant. 2022. **Colonization with non-mycorrhizal culturable endophytic fungi enhances orchid growth and indole acetic acid production.** *BMC Microbiology* 22 (1): 101. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02507-z>

Shefferson, P.R., D.L. Taylor, M. Weiß, S. Garnica, M.K. McCormick, S. Adams, M.H. Gray, J.W. McFarland, T. Kull, K. Tali, T. Yukawa, T. Kawahara, K. Miyoshi y Y.-I. Lee. 2007. **The evolutionary history of mycorrhizal specificity among lady's slipper orchids.** *Evolution* 61 (6): 1380–1390. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00112.x>

Schweiger, J.M.-I., M.I. Bidartondo y G. Gebauer. 2018. **Stable isotope signatures of underground seedlings reveal the organic matter gained by adult orchids from mycorrhizal fungi.** *Functional Ecology* 32: 870-881. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13042>

- Shefferson, R.P., C.C. Cowden, M.K. McCormick, T. Yukawa, Y. Ogura-Tsujita y T. Hashimoto. 2010. **Evolution of host breadth in broad interactions: mycorrhizal specificity in East Asian and North American rattlesnake plantains (*Goodyera* spp.) and their fungal hosts.** *Molecular Ecology* 19: 3008-3017. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04693.x>
- Shubha, J. y C. Srinivas. 2017. **Diversity and extracellular enzymes of endophytic fungi associated with *Cymbidium aloifolium* L.** *African Journal of Biotechnology* 16 (48): 2248-2258. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16261>
- Silva-Freitas, E.F., M. da Silva, E. da Silva Cruz, E. Mangaravite, M. Faust-Bocayuva, T.G. Reis-Veloso, M.-C. Selosse y M.C. Megumi Kasuya. 2020. **Diversity of mycorrhizal *Tulasnella* associated with epiphytic and rupicolous orchids from the Brazilian Atlantic Forest, including four new species.** *Scientific Reports* 10: 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63885-w>
- Sisti, L.S., D.N.A. Flores-Borges, S.A.L.D. Andrade, S. Koehler, M.L. Bonatelli y J.L.S. Mayer. 2019. **The role of non-mycorrhizal fungi in germination of the mycoheterotrophic orchid *Pogoniopsis schenckii* Cogn.** *Frontiers in Plant Science* 10: 1589. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01589>
- SNIB. 2016. Colaboración de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), *Naturalista. Orquídea Lirio (*Rhynchostele cervantesii*)*
- Soto-Arenas, M.A., R. Solano-Gómez y E. Hágsater. 2007. **Risk of extinction and patterns of diversity loss in Mexican orchids.** *Lankesteriana International Journal on Orchidology* 7 (1-2): 114-121. <https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.18449>
- Stancato, G.C., P. Mazzafera y M.S. Buckeridge. 2002. **Effects of light stress on the growth of the epiphytic orchid *Cattleya forbesii* Lindl. x *Laelia tenebrosa* Rolfe.** *Brazilian Journal of Botany* 25: 229-235. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042002000200011>

- Steiner, K.E., R. Kaiser y S. Dötterl. 2011. **Strong phylogenetic effects on floral scent variation of oil-secreting orchids in South Africa.** *American Journal of Botany* 98 (10): 1663-1679. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100141>
- Sudheep, N.M. y K.R. Sridhar. 2012. **Non-mycorrhizal fungal endophytes in two orchids of Kaiga forest (Western Ghats), India.** *Journal of Forestry Research* 23: 453-460. <https://doi.org/10.1007/s11676-012-0284-y>
- Tan, X.M., X.M. Chen, C.L. Wang, X.H. Jin, J.L. Cui, J. Chen, S.J. Guo y L.F. Zhao. 2012. **Isolation and identification of endophytic fungi in roots of nine *Holcoglossum* plants (Orchidaceae) collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan provinces of China.** *Current Microbiology* 64 (2): 140-147. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-0045-8>
- Thoen, E., C.B. Harder, H. Kauserud, S.S. Botnen, U. Vik, A.F. Taylor y I. Skrede. 2020. ***In vitro* evidence of root colonization suggests ecological versatility in the genus *Mycena*.** *New Phytologist* 227: 601-612. <https://doi.org/10.1111/nph.16545>
- Tremblay, R.L., J.D. Ackerman, J.K. Zimmerman y R.N. Calvo. 2005. **Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification.** *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 1–54. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00400.x>
- Waterman, R.J. y M.I. Bidartondo. 2008. **Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids.** *Journal of Experimental Botany* 59 (5): 1085-1096. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm366>
- Waud, M., R. Brys, W.V. Landuyt, B. Lievens y H. Jacquemyn. 2017. **Mycorrhizal specificity does not limit the distribution of an endangered orchid species.** *Molecular Ecology* 26: 1687-1701. <https://doi.org/10.1111/mec.14014>
- Wida-Utami, E.S. y S. Hariyanto. 2019. ***In vitro* seed germination and seedling development of a rare Indonesian native orchid *Phalaenopsis amboinensis* J.J. Sm.** *Scientifica* 2019: 1-7. <https://doi.org/10.1155/2019/8105138>

- Yeh, C.M., K. Chung, C.K. Liang y W.C. Tsai. 2019. **New insights into the symbiotic relationship between orchids and fungi.** *Applied Sciences* 9 (3): 2076-3417. <https://doi.org/10.3390/app9030585>
- Zamudio, S. y E. Carranza-González. 2019. **Angiospermas.** En: *La biodiversidad en Michoacán. Estudio de Estado 2*, vol. II. CONABIO, México, pp. 229-238
- Zettler, L.W. y L.L. Corey. 2018. **Orchid mycorrhizal fungi: isolation and identification techniques.** Capítulo 2. En: Y.-I. Lee y E.C.-T. Yeung (eds.), *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols*, Springer Protocols Handbooks, pp. 27-58. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7771-0_2
- Zettler, L.W., K.A. Piskin, S.L. Stewart, J.J. Hartsock, M.L. Bowles y T.J. Bell. 2005. **Protocorm mycobionts of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nutt.) Lindley, and a technique to prompt leaf elongation in seedlings.** *Studies in Mycology* 53 (1): 163-171. <https://doi.org/10.3114/sim.53.1.163>
- Zhang, S.B., W.Y. Chen, J.L. Huang, Y.F. Bi y X.F. Yang. 2015. **Orchid species richness along elevational and environmental gradients in Yunnan, China.** *PLoS ONE* 10 (11): e0142621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142621>
- Zhang, L., J. Chen, Y. Lv, C. Gao y S. Guo. 2012. ***Mycena* sp., a mycorrhizal fungus of the orchid *Dendrobium officinale*.** *Mycological Progress* 11 (2): 395-401. <https://doi.org/10.1007/s11557-011-0754-1>
- Zhang, Y., W. Huo, J. Hou, L. Liu, X. Yu y L. Xu. 2022. **Effects and benefits of orchid mycorrhizal symbionts on *Dendrobium officinale*.** *Horticulturae* 8 (861): 1-14. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100861>
- Zhang, S., Y. Yang, J. Li, J. Qin, W. Zhang, W. Huang y H. Hu. 2018. **Physiological diversity of orchids.** *Plant Diversity* 40: 196-208. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2018.06.003>
- Zhao, D.K., M.A. Selosse, L. Wu, Y. Luo, S.C. Shao y Y.L. Ruan. 2021. **Orchid reintroduction based on seed germination-promoting mycorrhizal fungi**

derived from protocorms or seedlings. *Frontiers in Plant Science* 12: 701152.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.701152>

Zi, X.M., C.L. Sheng, U.M. Goodale, S.C. Shao y J.Y. Gao. 2014. ***In situ* seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae).** *Mycorrhiza* 24 (7): 487-499.
<https://doi.org/10.1007/s00572-014-0565-8>

Rosa Elia Magaña Lemus

ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN MICORRÍZICA DE LA ORQUÍDEA AMENAZADA Rhynchoatele cervantesii.pdf

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:556243466

Fecha de entrega

12 feb 2026, 12:19 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

12 feb 2026, 12:25 p.m. GMT-6

Nombre del archivo

ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN MICORRÍZICA DE LA ORQUÍDEA AMENAZADA Rhynchoatele cervant....pdf

Tamaño del archivo

5.4 MB

167 páginas

43.649 palabras

249.647 caracteres

24% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 21%  Fuentes de Internet
- 21%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
89 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas	
Título del trabajo	ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN MICORRÍZICA DE LA ORQUÍDEA AMENAZADA <i>Rhynchostele cervantesii</i>	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Rosa Elia Magaña Lemus	0212484e@umich.mx
Director	Irene Ávila Díaz	Irene.avila@umich.mx
Codirector	Dr. Raymond L. Tremblay Lalande	raymond.tremblay@upr.edu
Coordinador del programa	Dr. Rodolfo Pérez Rodríguez	doc.ciencias.biologicas@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	Sí	Se utilizó IA como apoyo en la mejora de redacción y clarificación de ideas en algunos apartados del texto.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	No	
Traducción a otra lengua	Sí	La IA proporcionó apoyo para mejorar la redacción en algunas partes del Abstract.
Revisión y corrección de estilo	Sí	Se usó IA para mejorar calidad, estilo y fluidez de algunos párrafos en conclusiones y secciones de metodología, sin modificar contenido científico.
Análisis de datos	No	
Búsqueda y organización de información	No	
Formateo de las referencias bibliográficas	No	
Generación de contenido multimedia	No	
Otro	Sí	Se utilizó la IA como apoyo para identificar errores de formato en Word y resolver problemas de saltos de página.

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Rosa Elia Magaña Lemus 
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán 12 de febrero de 2026