

**Facultad de Ingeniería y Ciencias**

**Acta de Correcciones al Proyecto de Grado Biología**

**Fecha:** 27 de Septiembre de 2021.

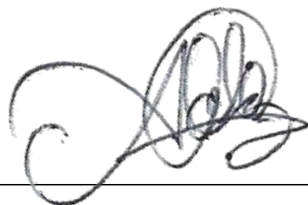
**Autores:** Vanessa Giraldo Escobar.

**Nombre del Proyecto de Grado:** “Explorando el papel de los hongos simbiotes en la interacción entre plantas adultas y plántulas en la familia *Orchidaceae*”

**Director:** Ángel Vale González

**Co-director:** Danny Rojas Martín

Como indica el artículo 2.27 de las Directrices de Trabajo de Grado, he verificado que los estudiantes indicados arriba han implementado todas las correcciones que los Jurados del Proyecto de Grado definieron que se efectuaran, como consta en el Acta de Calificación correspondiente.



---

Firma del Director del Proyecto de Grado

Nota de Aceptación

Aprobado por el Comité de Trabajo de Grado  
en cumplimiento de los requisitos exigidos por la  
Pontificia Universidad Javeriana para optar el título de  
Biólogo.

Dr. HERNAN CAMILO ROCHA NIÑO  
Decano Facultad de Ingeniería

DR. MATEO LOPEZ VICTORIA  
Director Carrera Biología

Dr. Ángel Vale González  
Director Trabajo de Grado

Dr. Danny Rojas Martín  
Co-Director Trabajo de Grado

Dra. Ana Teresa Mosquera Espinosa  
Jurado 1

MSc. Claudia Marcela Franco Arango  
Jurado 2

Santiago de Cali, septiembre 17 de  
2021

Doctor

Mateo López Victoria  
Director del Programa de Biología  
Pontificia Universidad Javeriana Seccional Cali

**Asunto:** Carta de aprobación del Trabajo de Grado de la estudiante Vanessa Giraldo Escobar.

Cordial saludo,

Con la presente hacemos patente nuestra aprobación de la presentación ante la Facultad de Ingeniería y Ciencias, de la tesis de grado titulada:

*“Explorando el papel de los hongos simbiotes en la interacción entre plantas adultas y plántulas en la familia Orchidaceae”* a cargo de la estudiante: **Vanessa Giraldo Escobar**.

Este proyecto se encuentra listo para su evaluación y para la definición de su fecha de sustentación, a fin de cumplir uno de los requisitos exigidos por la universidad para que la estudiante opte por el título de Bióloga.


Atentamente,



---

Ángel Vale González, PhD (director)

Departamento de Ciencias Naturales y  
Matemáticas  
Facultad de Ingeniería y Ciencias  
Pontificia Universidad Javeriana  
Cali  
[angel.vale@javerianacali.edu.co](mailto:angel.vale@javerianacali.edu.co)



---

Danny Rojas Martin, PhD (co-director)

Departamento de Ciencias  
Naturales y  
Matemáticas  
Facultad de Ingeniería y Ciencias  
Pontificia Universidad Javeriana Cali  
[danny.rojas@javerianacali.edu.co](mailto:danny.rojas@javerianacali.edu.co)

Santiago de Cali, septiembre 17 de  
2021

Doctor

Mateo López Victoria  
Director del Programa de Biología  
Pontificia Universidad Javeriana Seccional Cali

**Asunto:** Carta de aprobación del Trabajo de Grado de Vanessa Giraldo Escobar.

Cordial saludo,

Por medio de la presente me permito presentar el trabajo de grado titulado "***Explorando el papel de los hongos simbiotes en la interacción entre plantas adultas y plántulas en la familia Orchidaceae***" a la Facultad de Ingeniería y Ciencias para la asignación de evaluadores y la definición de la fecha de sustentación, con el objetivo de cumplir uno de los requisitos exigidos por la universidad para optar por el título de Biólogo

Atentamente,



---

Vanessa Giraldo Escobar  
Código: 8932217  
Estudiante de biología  
Pontificia Universidad Javeriana  
Cali  
[1144189477@javerianacali.edu.co](mailto:1144189477@javerianacali.edu.co)

**Explorando el papel de los hongos simbios en la interacción entre plantas adultas y  
plántulas en la familia Orchidaceae**

Vanessa Giraldo Escobar

Pontificia Universidad Javeriana, Cali

Facultad de Ingeniería y Ciencias

Departamento de Ciencias Naturales y Matemáticas

Santiago de Cali

2021

**EXPLORANDO EL PAPEL DE LOS HONGOS SIMBIOTES EN LA INTERACCIÓN  
ENTRE PLANTAS ADULTAS Y PLÁNTULAS EN LA FAMILIA ORCHIDACEAE**

Vanessa Giraldo Escobar

Trabajo de grado presentado como requisito a optar por el título de:

Bióloga

Director

Ángel Vale Gonzáles, Ph.D

Codirector

Danny Rojas Martín, Ph.D

Pontificia Universidad Javeriana, Cali

Facultad de Ingeniería y Ciencias

Departamento de Ciencias Naturales y Matemáticas

Santiago de Cali

2021

*A Dios*

*que me endereza de un tirón la puntería.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por siempre mostrarme el camino y aun cuando parecía nublado. A mis padres María del Pilar Escobar y Ricardo Giraldo por su entrega, apoyo y amor sinfín, por enseñarme de valores, tenacidad y nunca darme por vencida. A mi director de tesis Ángel Vale, por su paciencia, enseñanzas, creatividad y cariño. A mi compañera de vida Stephania y a mis amigos más cercanos, en especial a Laura S., Chrystian S., por tantos momentos compartidos, impulsarme a lograr cada día más y creer incondicionalmente en mí. Finalmente, a la Pontificia Universidad Javeriana de Cali por abrirme sus puertas, permitirme culminar mi pregrado y hacerme una profesional íntegra.

A todas las personas con las que me crucé en este proceso, compañeros y maestros.

A todos, gracias.

## Reglamento de la Pontificia Universidad Javeriana

### Artículo 12 de la Resolución número 12 del 6 de julio de 1946

«La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus trabajos de tesis, solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques o polémicas puramente personales, antes bien, se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia.»

Declaro que este documento de tesis es íntegramente de mi autoría. Las fuentes y obras consultadas están debidamente referenciadas, y las citas de esas obras están identificadas de modo claro. Este documento no contiene, por lo tanto, ningún tipo de plagio, ni de textos publicados, cualquiera sea el medio de esa publicación, incluidos los medios electrónicos, ni de trabajos académicos.

## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Introducción general.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1. La familia <i>Orchidaceae</i> y sus principales características .....</b>                                    | <b>1</b>  |
| 1.1.1. Ecología y Distribución.....  | 6         |
| 1.1.2. Importancia de las orquídeas en los ecosistemas .....   | 8         |
| <b>1.2. Efecto nodriza .....</b>   | <b>8</b>  |
| 1.2.1. El efecto nodriza en <i>Orchidaceae</i> .....   | 10        |
| <b>1.3. Interacciones hongo-orquídeas .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>2. Técnicas para el estudio del rol de los hongos en la reproducción de orquídeas .....</b>                       | <b>13</b> |
| 2.1. Cultivo y descripción de hongos endosimbióticos y ensayos de germinación .....                                  | 14        |
| 2.2. Determinación molecular de hongos en protocormos y raíces.....  | 17        |
| 2.3. Estudios fisiológicos sobre nutrición en asociación con hongos endófitos .....                                  | 19        |
| 2.4. Uso de isótopos radioactivos en la cuantificación de aportaciones nutricionales de ambos mutualistas (H-O)..... | 20        |
| 2.5. Estudios en orquídeas mico-heterótrofas.....  | 23        |
| 2.5.1. Orquídeas mico-heterótrofas que explotan a hongos saprófitos.....   | 24        |
| 2.5.2. Orquídeas mico-heterótrofas que explotan a hongos micorrízicos de otras plantas ....                          | 25        |
| <b>3. Sucesión fúngica en la interacción hongo-orquídea.....</b>   | <b>27</b> |
| <b>4. Evidencias del papel de los hongos en el efecto nodriza en <i>Orchidaceae</i>.....</b>                         | <b>33</b> |
| <b>5. Interacción hongo-orquídea y diversificación: MAR de orquídeas .....</b>                                       | <b>40</b> |
| <b>6. Aplicaciones del efecto nodriza en orquídeas para la Ciencia y la Horticultura .....</b>                       | <b>45</b> |
| <b>7. Nuevas líneas de investigación y retos en el estudio del efecto nodriza en orquídeas ....</b>                  | <b>48</b> |
| <b>8. Algunas consideraciones finales.....</b>   | <b>49</b> |
| <b>9. Conclusiones .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>10. Referencias .....</b>   | <b>50</b> |

## 1. Introducción general

### 1.1. La familia *Orchidaceae* y sus principales características

Las orquídeas (familia *Orchidaceae*) conforman uno de los grupos de plantas con flor o angiospermas más exitosos en términos de su extensión geográfica y la ocupación de diferentes hábitats (Dressler 1981, Givnish *et al.* 2015). Esta familia, pertenece a la clase Liliopsida (orden Asparagales), y es considerada una de las más diversas, con cerca de 28.484 especies, distribuidas en cinco subfamilias y 880 géneros (Steven, 2001; Cribb *et al.*, 2003; Govaerts *et al.*, 2017). El número de especies incluidas en este grupo va aumentando progresivamente, dado que, año a año, diferentes investigaciones (principalmente en áreas tropicales) descubren nuevas especies (Vale *et al.* 2014; Juswara *et al.* 2016; Clements & Jones 2020, Tobar-Suárez *et al.* 2021) e incluso nuevos géneros (Karremans, 2014).

Las orquídeas son plantas herbáceas, que varían grandemente en sus características morfológicas vegetativas y reproductivas (Dressler, 1981). Ellas pueden tener un porte erecto, colgante o trepador. Sus especies son mayormente foto-autotróficas, con hábito de vida terrestre, epífita (*i.e.* que viven sobre otras plantas sin extraer ningún nutriente de estas últimas) o litófilo (*i.e.* que viven sobre rocas). Otro grupo minoritario de especies (pertenecientes a varios linajes dispersos sobre la filogenia de *Orchidaceae*) son mico-heterótrofas, ya que no pueden hacer fotosíntesis y dependen permanentemente de hongos para el acopio de suficientes nutrientes y el completamiento de su ciclo de vida (Gomes *et al.* 2019; Jakalski *et al.* 2021). A estas orquídeas se les llamó durante mucho tiempo saprofitas o parásitas, porque no se conocía el papel que juegan los hongos en su ciclo de vida (Darwin, 1877, Bernard, 1899). Algunas pocas tienen un hábito mixto en el que algunos individuos son autótrofos y otros micoheterótrofos (Schweiger 2019, Suetsugu *et al.* 2021a), o que cambian de estrategia trófica a lo largo de su vida (Suetsugu & Matsubayashi, 2021). Esta última, es una condición que, en cierta forma, cumplen todas las orquídeas si reparamos en que en su fase inicial todas las orquídeas hasta ahora estudiadas dependen totalmente de hongos micorrízicos de manera obligada para germinar (Dressler 1981; Miura *et al.* 2018; Perotto 2014; ver acápite 2.5.2). Adicionalmente, algunas especies, propias en ambientes poco luminosos pero ricos en materia orgánica muerta, combinan la fotosíntesis y la interacción con hongos como fuentes de carbono, por lo que se consideran mixotróficas (Suetsugu *et al.* 2021b).

Sin embargo, a pesar de todo ese abanico de estrategias tróficas, del total de especies que han sido identificadas hasta el momento, más del 60% de las orquídeas

(aproximadamente 19.000 especies) son plantas epífitas fotoautotróficas, ya que usan la superficie de los troncos de árboles, arbustos y rara vez las hojas de otras plantas como soporte para su crecimiento (Zotz, 2013; Chomicki, 2015; Schiff, 2018). Si bien este grupo de orquídeas es el que alberga el mayor número de especies, es al mismo tiempo el que experimenta mayores pérdidas en su diversidad, debido a la fuerte presión antrópica (fragmentación del hábitat, cambios en el uso de suelos, empleo para usos medicinales u ornamentales, entre otros) (Adhikari *et al.*, 2012). De hecho, las orquídeas constituyen uno de los grupos de plantas vasculares con mayor número de especies amenazadas, y están todas incluidas en la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) y en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (Mondragón & Dutra Elliott, 2013).

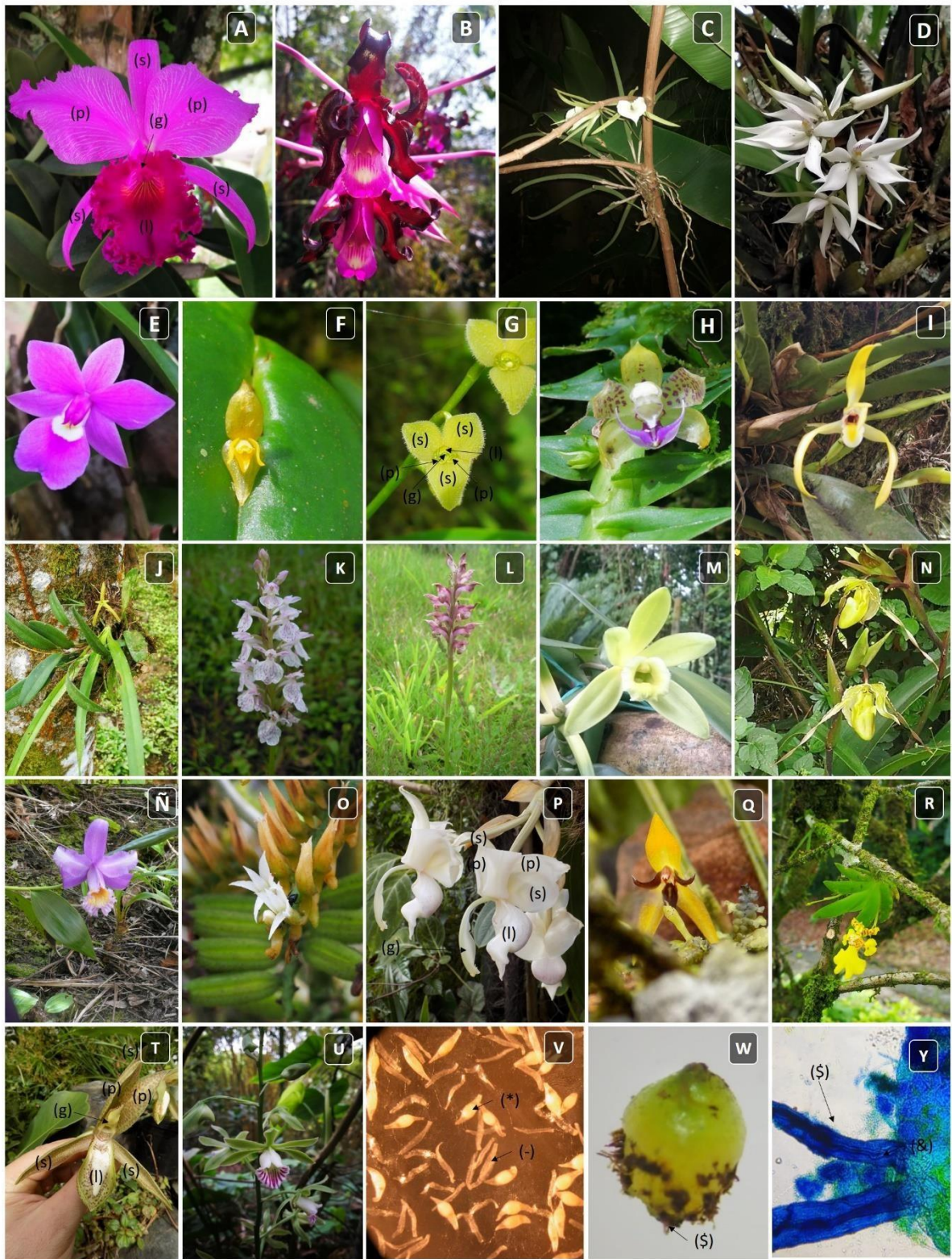
Cuando se caracteriza a las orquídeas con base al tipo de crecimiento que exhiben, es posible encontrar especies con crecimiento simpodial o simpódico, las cuales poseen rizomas capaces de ramificarse varias veces lateralmente. Estos rizomas producen ventralmente sólo raíces y dorsalmente sólo hojas (con o sin pseudobulbos) y flores. Por lo general el rizoma y las raíces de estas especies se mantienen en estrecho contacto con el sustrato de soporte. A este grupo de orquídeas pertenecen los géneros *Cattleya*, *Epidendrum*, *Oncidium*, *Dendrobium*, *Paphiopedilum*, *Catasetum*, entre muchos otros (Fig. 1). Otro grupo de especies poseen un crecimiento monopodial o monopódico, ya que crecen casi exclusivamente a lo largo de un eje perpendicular al sustrato mediante un tallo mayormente único o poco ramificado que produce hojas a ambos lados, pudiendo presentar raíces aéreas en abundancia (Schiff, 2018). Con este tipo de hábito de crecimiento tenemos a géneros tales como *Vanda*, *Phalaenopsis*, *Campylocentrum*, *Aerides*, *Angraecum* y *Vanilla*, entre otros (Fig. 1). En aquellas orquídeas epífitas con crecimiento simpodial, es posible encontrar estructuras conocidas como pseudobulbos, que consisten en pecíolos muy engrosados con inclusión de tejido caulinar, cuya principal función es almacenar el agua y los nutrientes necesarios para la floración de ese vástago y secundariamente funcionar como una reserva útil para el desarrollo de otras partes de la planta en períodos desfavorables tales como estaciones secas y/o frías (Schiff, 2018). Este tipo de estructuras nunca se presenta en las especies monopodiales.

Otra de las estructuras anatómicas de las orquídeas que presenta ciertas particularidades es la raíz, en especial se la compara con la de otras angiospermas a excepción de las aráceas. En especies epífitas y en aquellas que crecen sobre rocas (litófitas), las raíces aéreas de las

orquídeas son órganos perennes que pueden poseer la capacidad de realizar fotosíntesis (Sathiyadash *et al.*, 2020). En estas especies, las raíces tienen dos capas multi-estratificadas de células, una más externa llamada velamen cumple varias funciones, entre ellas: 1) permite el intercambio gaseoso, la entrada de agua (incluyendo su conversión de vapor de agua a agua líquida) 2) la entrada de nutrientes, 3) protege a la raíz de la desecación, de daños mecánicos y de la luz UV, y 4) da albergue a hongos y otros endosimbiontes. La segunda capa, más interna es el córtex, cuyas funciones son: 1) proteger los tejidos vasculares, 2) absorber el agua y los nutrientes que atraviesan el velamen, 3) realizar cierto nivel de fotosíntesis y 4) dar albergue principalmente hongos endofíticos (Barretta-dos-Santos *et al.* 2015; Costa Joca *et al.* 2017, 2020). En el velamen es posible encontrar cianobacterias, cuya principal función es la fijación biológica de nitrógeno (Tsavkelova *et al.*, 2003, 2011). Por su parte, las raíces de las orquídeas terrestres, no suelen ser fotosintéticas por estar mayormente enterradas y a menudo poseen un velamen formado por una o unas pocas capas de células (Figueroa *et al.* 2008). Asimismo, en estas especies, las raíces experimentan cambios en su crecimiento y arquitectura a través del tiempo (Bayman & Otero, 2006) y es difícil saber si mantienen una relación más estrecha con hongos durante más tiempo, o si en realidad esta interacción ha sido mejor muestreada entre las orquídeas de este gremio (Lesica and Antibus 1990; Richardson *et al.* 1993; Liu *et al.* 2010; Riofrio *et al.* 2013; Xing *et al.* 2015; Cevallos *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017).

Por otra parte, si bien todas las estructuras de una planta son importantes y deben ser caracterizadas, las flores, en el caso de las orquídeas, han sido clave en su diversificación mediante una explotación más o menos especializada de diferentes mecanismos de polinización (Dressler 1981; Tremblay *et al.* 2005; Givnish *et al.* 2015). La morfología básica de esta estructura (*i.e.* presencia de tres sépalos, tres pétalos incluido el labelo, y androceo y gineceo fusionados) es uno de los principales rasgos que se utilizan para caracterizar a las especies pertenecientes a la familia Orchidaceae (ver variaciones de este patrón en Fig. 1). Debido al gran número de especies incluidas dentro de este grupo, es posible encontrar orquídeas con una gran variedad de flores que difieren en su forma, tamaño y color, entre otros. Se considera que las flores de las orquídeas son estructuras altamente adaptadas a una interacción eficiente con polinizadores mayormente específicos, lo cual potenciaría mayores niveles de polinización cruzada, aunque también se reportan especies que poseen mecanismos de auto-polinización (Jacquemyn *et al.*, 2005; Tremblay *et al.* 2015) u otras mayormente generalistas (e.g. Claessens & Kleynen 2013). Típicamente, la flor de las orquídeas posee simetría bilateral, con un cáliz

trisépalo y una corola tripétala, en la cual el pétalo del medio (labio o labelo) se encuentra modificado y logra a menudo la mayor atracción e interacción más directa con el polinizador.



**Figura 1.** Diversidad morfo-ecológica de la familia Orchidaceae. En varias fotos se señalaron los sépalos (s), pétalos laterales (p), labelo (l) y ginostemo (g). A *Cattleya trianae*; B. *Laelia colombiana*, C. *Brassavola* sp. D. *Prosthechea* sp., E. *Dimerandra buenaventurae*, F. *Pleurothallis* sp., G. *Stelis* sp., H. *Dichaea* sp., I. *Maxillaria* sp.,

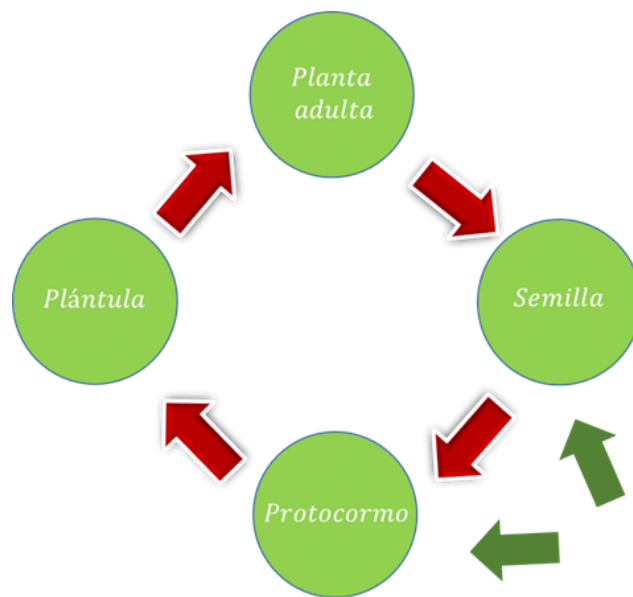
J. *Cryptocentrum*, K. *Dactylorhiza* sp. L. *Orchis* sp. M. *Vanilla pompona*, N. *Phragmipedium caudatum*, Ñ. *Sobralia* sp. O. *Campylocentrum* sp., P. *Stanhopea reichenbachiana*, Q. *Dryadella* sp., R. *Erycina pusilla*, S. *Catasetum tabulare*, T. *Galeandra beyrichii*, V. semillas fértiles (\*) y estériles (-) de *Encyclia moebusii*, W. protocormo de *Catasetum tabulare* con rizoides oscuros (\$), Y. Detalle de este protocormo mostrando al interior de los rizoides las hifas (&) del hongo que permitió la germinación y desarrollo del protocormo (Fotos: Ángel Vale).

Por otra parte, la inmensa mayoría de las orquídeas poseen flores hermafroditas y poseen los órganos sexuales (estigma y anteras) muy próximos entre sí formando una columna o ginostemo (Dressler, 1981; Schiff, 2018). Las flores pueden agruparse en inflorescencias (racimos o espigas) que se disponen en diferentes posiciones del raquis (basal, apical o axilar). Una vez que una flor es polinizada y se produce la fecundación, el ovario de la flor madura da lugar a un fruto (cápsula) que contiene en su interior miles de semillas de tamaño muy pequeño, fácilmente dispersadas por el viento (Arditti, 2000; Yeung *et al.*, 2018). Estas semillas tienen la particularidad de carecer de endospermo, por lo que para poder germinar deben interactuar con un hongo micorrízico (simbiosis obligada inicial), relación que recibe el nombre de micoheterotrofia. Es así que el ciclo de vida de una orquídea (**Figura 2**) comienza con una semilla que es colonizada por un hongo simbiote. En esta interacción, el hongo proveerá una fuente de carbono para el desarrollo del embrión. De este modo, el embrión comienza a alargarse, dando lugar al protocormo, el cual es un rasgo único que caracteriza a la germinación de las orquídeas (Jonasson, 2015). Esta estructura, intermedia entre el embrión y la plántula, carece inicialmente de pigmentos, por lo que es completamente dependiente del hongo para su nutrición (Perotto *et al.*, 2014). Posteriormente, en el protocormo se formará un ápice meristemático, dando lugar al surgimiento de una plántula (con raíz y tallo) (Yeung *et al.*, 2018). En esta fase, como ya vimos más arriba, se suelen dar dos situaciones: 1) la plántula desarrolla la capacidad de realizar fotosíntesis y se independiza al menos parcialmente del hongo, ó 2) la plántula sigue dependiendo estrictamente del hongo para la obtención de una fuente de carbono (Jacquemyn *et al.*, 2017). Sin embargo, existe una tercera opción, que es que la planta se haga mixotrófica. Finalmente, la plántula se desarrollará para dar una planta adulta que continuará con el crecimiento (asociada o no al hongo) y completará el ciclo con la formación de flores, frutos y semillas (fig. 2).

A pesar del gran número de semillas que se producen por fruto, la necesidad de interactuar con un hongo para poder germinar, hace que el número de plántulas efectivamente desarrolladas sea muy inferior al que se esperaría.

### 1.1.1. Ecología y Distribución

Las orquídeas poseen una amplia distribución en regiones tropicales y subtropicales (Cribb *et al.*, 2003), detectándose una disminución en la riqueza de especies al avanzar en el gradiente latitudinal hacia el norte. Su ocurrencia ha sido reportada en todas partes del mundo, salvo en ambientes muy fríos como los que caracterizan a la región del Ártico y Antártida (Tsiftsis *et al.*, 2019). Los factores que definen los patrones de riqueza de especies en esta familia se analizan a diferentes escalas. Cuando se evalúa a escala global, el tamaño del hábitat y el rango altitudinal son los factores determinantes (Jacquemyn *et al.*, 2005); mientras que a menor escala, la disponibilidad de agua, humedad del suelo, altura y área del dosel arbóreo, resultan ser los más importantes (McCormick & Jacquemyn, 2014). Cuando se analiza un ambiente a pequeña escala, se observa que la distribución de orquídeas está caracterizada por la formación de clusters y por un marcado patrón de segregación (Jacquemyn *et al.*, 2014).



**Figura 2:** ciclo de vida de una orquídea. Las flechas verdes señalan las fases en las que es necesaria la intervención de un hongo micorrízico de manera obligada. Adaptado de Sathiyadash *et al.* (2020).

El rango de distribución varía de acuerdo al hábito de crecimiento. Las orquídeas epífitas, que representan el 70 % de las especies de esta familia (Favre-Godal *et al.*, 2020), se distribuyen principalmente en el continente americano (desde EUA hasta Argentina y Brasil, siendo más diversas entre ambos trópicos y en zonas cercanas a los 1000-2000 msnm), alcanzando una diversidad similar en Asia e Islas del Pacífico, pero menor en África y Australia

tropicales debido a la prevalencia en entornos más secos (Gentry & Dodson 1987; Joppa *et al.* 2011; Gaskett & Gallagher 2018). Típicamente, se desarrollan sobre las ramas de árboles y arbustos, obteniendo agua y nutrientes de la atmósfera circundante y de las deposiciones que fluyen sobre la superficie del árbol, y bajo una eficiente protección de la radiación solar extrema. Estas especies poseen requerimientos específicos en cuanto al tipo de árbol sobre el cual se desarrollan (especie, tamaño, edad, pH de su corteza, entre otros) y las condiciones micro-climáticas (Adhikari *et al.*, 2012). De este modo, es posible detectar variaciones en la diversidad de orquídeas epífitas cuando se observa un mismo árbol a diferentes alturas, o cuando se comparan bosques con estructuras y edades diferentes (Zotz & Vollrath, 2003). Adhikari *et al.* (2012) encontraron que en bosques de Nepal, la abundancia y riqueza de orquídeas epífitas es mayor en bosques primarios con poca intervención humana. Asimismo, el número de individuos es mayor en árboles nativos de mayor edad y altura.

Por su parte, las especies terrestres dan cuenta del 25 % de las orquídeas (Favre-Godal *et al.*, 2020) y se encuentran mejor representadas en Norteamérica, Europa, Sudáfrica, Australia, y Nueva Zelanda, desarrollándose en una gran variedad de ambientes (Schiff, 2018). Dentro de este grupo, es posible encontrar especies con un alto grado de especialización respecto al hábitat. En un estudio llevado a cabo en bosques de Serbia, Djordjevic *et al.* (2020) encontraron que los factores que determinan la distribución y abundancia de orquídeas terrestres en estos ambientes son: el régimen lumínico, la temperatura, la humedad, el contenido de nitrógeno del suelo y la altitud. Estos autores detectaron la presencia de orquídeas terrestres especialistas en los extremos del gradiente de luz, temperatura, pH y humedad del suelo, y altitud.

Lamentablemente, en la mayoría de los estudios a nivel más macro sobre los correlatos ecológicos y geográficos que explican la distribución de las orquídeas no se tienen en cuenta la distribución de sus principales mutualistas y la especificidad de los diversos linajes de las orquídeas con estos organismos, en especial sus hongos micorrízicos. Es por ello, que a partir de la revisión realizada para este trabajo consideramos urgente la necesidad de cruzar los datos de distribución de los diferentes grupos de hongos y la de los diversos linajes de orquídeas en los que se ha reportado su presencia. Sin embargo, dada las actuales dificultades para la completa identificación de los diversos hongos a escalas taxonómicas pequeñas creemos que este tipo de investigaciones podrían demorar debido a la escasez de información sobre la interacción orquídea-hongo a lo largo del rango de distribución de una misma especie de orquídea, y a la dificultad de hacer coincidir las identidades que hagan de un mismo ente

fúngico a partir de diversas fuentes de información (p.ej. datos morfológicos basados en hongos que produzcan cuerpo fructífero y datos moleculares).

### **1.1.2. Importancia de las orquídeas en los ecosistemas**

Debido al gran número de especies que alberga la familia Orchidaceae y a su alto grado de diversificación ecológica, las orquídeas son un componente esencial de la biodiversidad (González-Hernández *et al.*, 2007), con roles muy importantes en el funcionamiento de los ecosistemas y en los ciclos biogeoquímicos. En ecosistemas boscosos, se cree que las orquídeas son componentes clave para el mantenimiento de la diversidad (particularmente de artrópodos), y para la resiliencia y el funcionamiento de estos ambientes (Adhikari *et al.*, 2016). Las orquídeas son capaces de establecer interacciones con diversos grupos: insectos (polinizadores y artrópodos o vertebrados que las utilizan como refugio), bacterias (cianobacterias presentes en el velamen), diferentes grupos de hongos (mediante asociaciones de tipo simbiótico o no) y con otras plantas (interacciones positivas o negativas) (Jersáková *et al.* 2006; Claessens & Kleynen 2013; Favre-Godal *et al.*, 2020). En el Neotrópico muchos linajes de orquídeas han convergido hacia la producción de recompensas florales inusuales de las cuales dependen algunos grupos altamente endémicos pero de una importancia clave en los ecosistemas neotropicales. Entre estas orquídeas destacan las productoras de aromas colectables por machos de abejas euglosinas (de los géneros *Euglossa*, *Eulaema*, *Eufriesia*, y *Exaerete*) que dependen de estas y otras flores para atraer a las hembras de sus respectivas especies (Ramírez *et al.* 2011; Hetherington-Rauth & Ramírez, 2020). Otras orquídeas producen aceites y ceras de gran utilidad en el ciclo de vida de otras abejas tales como los centrínidos y los meliponinos respectivamente (Pauw, 2006; Castro & Singer, 2019). Sin embargo, muchas especies de orquídeas se encuentran actualmente amenazadas (lista roja de la UICN). Esto no sólo representa un peligro para la diversidad de esta familia, sino también para todas las especies con las cuales dichas plantas interactúan.

### **1.2. Efecto nodriza**

En las comunidades vegetales, las interacciones entre diferentes especies pueden ser positivas o negativas. En ambientes sometidos a forma intensas de estrés (sequía, presión por herbivoría, suelos oligotróficos, salinidad, entre otros), las interacciones positivas (facilitación) cobran mayor importancia (Molina-Montenegro *et al.*, 2013; Atala *et al.*, 2020). En este contexto, tradicionalmente el concepto de efecto nodriza se ha utilizado para describir el proceso mediante el cual una planta genera un micro-ambiente con condiciones favorables para

la germinación de semillas y/o reclutamiento de plántulas de una especie diferente (planta blanco o beneficiaria), favoreciendo de este modo su establecimiento, desarrollo y crecimiento (Nuñez *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2008). Las plantas facilitadoras suelen ser especies pioneras que no requieren de otra especie que genere previamente condiciones favorables para su establecimiento (Groeneveld & Rochefort, 2002; Filazzola & Lortie 2014). El conocimiento de las especies que participan en este tipo de interacción, permite diseñar proyectos de restauración en distintos ecosistemas (Swinfield, *et al.* 2016; Aceves *et al.*, 2020; Blackhall *et al.* 2021). De este modo, es posible seleccionar a la especie facilitadora teniendo en cuenta sus características y las del área a restaurar. Por ejemplo, en ambientes fuertemente impactados por la herbivoría, es conveniente seleccionar especies poco palatables, que no sean consumidas por los herbívoros y que, en consecuencia, puedan desarrollarse y generar condiciones favorables (disponibilidad lumínica, temperatura, nutrientes, humedad del suelo) para el crecimiento de especies beneficiarias que sí podrían ser palatables (Smith *et al.*, 2006).

Existen diferentes formas mediante las cuales una planta nodriza genera condiciones favorables para el establecimiento, desarrollo y crecimiento de la especie beneficiaria. Por ejemplo, su crecimiento hace posible que en ambientes cálidos, debajo de su biomasa aérea se generen condiciones de menor irradiancia, temperaturas más bajas y mayor humedad, lo que podría favorecer a especies con esos requerimientos. Asimismo, en ambientes más fríos y con incidencia de fuertes vientos, la planta nodriza puede tener un efecto protector, favoreciendo un micro-ambiente más templado, con menor incidencia de las corrientes de aire.

Más recientemente se ha obtenido evidencia de que algunas especies de hongos conforman redes micorrízicas (MNs del inglés “*mycorrhizal networks*”), redes miceliales que conectan dos o más plantas (sean estas con-específicas o no) y que permiten un intercambio permanente de sustancias e información (Simard & Durall, 2004; Selossé *et al.*, 2006; Whitfield, 2007). Las MNs están siendo cada vez más reconocidas como mediadoras de las interacciones entre árboles. Esto ha puesto al descubierto un universo nuevo de implicaciones en la sobrevivencia y la capacidad competitiva de varias especies vegetales. De hecho, algunos árboles pueden ayudar a la nutrición, prevalencia y resistencia a plagas de plantas con-específicas más pequeñas mediante el uso de una o varias de estas redes de hongos micorrízicos (Simard & Durall, 2004; Beiler *et al.* 2010). De este modo, las MNs funcionan como una malla física que suministra C a plantas con escasa disponibilidad de luz, y/o distintas biomoléculas que proveen resistencia y defensa a estas plántulas o miembros menores de la red (Simard & Durall, 2004;

Beiler *et al.* 2010). Sin embargo, a pesar de la convergencia conceptual de este fenómeno con el de efecto nodriza (o “*nurse effect*”) estudiado antes de este descubrimiento, rara vez se reporta en la literatura el uso de este concepto en asociación con el de redes miceliales. Ciertas orquídeas, en especial aquellas que viven en lugares más sombríos, forman parte de algunos de los sistemas de redes miceliales, donde las hifas de algunos hongos derivan parte de los nutrientes que obtienen de sus mutualistas vegetales (mayormente árboles bien expuestos a la luz) y los entregan a estas orquídeas parcial o totalmente mico-heterotróficas (Orellana, 2017). Sin embargo, en estos casos es difícil si el uso del concepto “efecto nodriza” aplicaría a una relación donde árbol y orquídea que no necesariamente parecen beneficiarse mutuamente (Baldelomar, 2018).

### **1.2.1. El efecto nodriza en Orchidaceae**

En el contexto de las interacciones planta-hongo y sus posibles implicaciones para la comunicación y un “cuidado mutuo” entre plantas, las orquídeas podrían tener mucho que aportar a pesar de que, según la revisión realizada como parte de esta tesis, en ningún caso se describe la existencia de un efecto nodriza intra- o inter-específico para la familia.

En este sentido, desde los inicios del siglo XIX se ha documentado, para varias especies de orquídeas, que una cierta parte del reclutamiento poblacional en las poblaciones naturales de orquídeas ocurre en asocio con la proximidad de plantas adultas (Bernard, 1899; Rasmussen, 1995). Igualmente este fenómeno también fue descrito a finales de ese siglo para especies de la familia pero mantenidas en condiciones de cultivo (Neuman, 1844; Bernard, 1904). Derivado de ello el científico francés Noël Bernard propuso por primera vez que la presencia de determinados hongos podría ser clave en este fenómeno. De hecho, estos hallazgos en la naturaleza y en el invernadero fue lo que permitió asegurar que la germinación de orquídeas requiere del concurso obligatorio de hongos (Bernard, 1899; Bernard, 1904; Rasmussen, 1995). De modo que, en los primeros estudios los hongos inoculados en experimentos de germinación simbiótica fueron sobretodo obtenidos de raíces de plantas adultas con-específicas o no con las semillas a sembrar (Bernard, 1904). Aunque estos hallazgos fueron en un inicio rechazados tanto por la comunidad científica (acostumbrada a ver los microorganismos como entes patógenos), como por los cultivadores de orquídeas y vendedores de estas plantas; con el tiempo este rol esencial de los hongos en la germinación de las orquídeas fue progresivamente asimilado (Selossé *et al.* 2011). De hecho, aún hoy por hoy, casi todos los experimentos de germinación simbiótica de orquídeas inician con el aislamiento de hongos a partir de raíces de

plantas adultas, sin dudas la principal fuente de inóculo (Rasmussen, 1995; Selossé *et al.* 2011). Que esto constituya un caso de efecto nodriza tendría gran relevancia dado que las fases iniciales de vida de una orquídea (*i.e.* la semilla sin endospermo, el protocormo y la plántula) suponen una elevada susceptibilidad e incapacidad de nutrición. Súmese a esto, que en muchas ocasiones las condiciones de humedad y disponibilidad de hongos compatibles para la germinación tiene lugar precisamente en partes donde la ausencia o escasez de luz solar es la causa de tales condiciones microclimáticas (Flores *et al.*, 2008). En este contexto sombrío, las orquídeas parecen germinar precisamente en partes donde no podrían nutrirse con la luz. En estas condiciones, que plantas adultas de orquídeas (con-específicas o no) lejanas, con acceso a más luz, pero conectadas con las nuevas plantas mediante una red micelial, pudieran estar aportando indirectamente al desarrollo de estas plántulas podría ser sin dudas una adaptación clave para la sobrevivencia de estas especies.

### **1.3. Interacciones hongo-orquídeas**

La interacción que se establece entre hongos y orquídeas es quizá una de las más importantes para este grupo de plantas. La ausencia de endospermo, y por tanto de sustancias de reserva en las semillas de esta familia, hace imprescindible que ocurra una colonización temprana del embrión por parte de hongos para poder germinar y desarrollarse (Smith & Read, 1997). En estadios posteriores del desarrollo, cuando se ha alcanzado la fase de plántula, si bien gran parte de las orquídeas son fotosintéticamente activas, una menor proporción de ellas carece de esta capacidad (no posee pigmentos fotosintéticos) y generan una interacción con hongos en la cual la planta es completamente dependiente para su nutrición (Dearnaley, 2007). Las hifas del hongo, que inicialmente crecen en el tejido de las semillas y posteriormente en las raíces de plántulas y ejemplares adultos, forman estructuras densas que reciben el nombre de pelotones (Dearnaley, 2007).

La interacción hongo-orquídea no es tan simple como podría pensarse, sino que por el contrario, se requiere de un cierto nivel de compatibilidad fisiológica entre los miembros de este mutualismo planta-hongo (Sathiyadash *et al.*, 2020). Esto hace que no todos los hongos sean apropiados para colonizar el tejido de una orquídea dada. Este hecho, sumado a la necesidad de una simbiosis obligada para la germinación y crecimiento inicial, hace que el establecimiento de una interacción orquídea-hongo apropiada constituya uno de los rasgos ecológicos más importantes que probablemente define la distribución y la abundancia de orquídeas a diversas escalas (Jacquemyn *et al.*, 2012; Xing *et al.*, 2015). Es por esto que se

establece que la presencia del hongo adecuado podría estar correlacionada con la selección del hábitat, afectando la distribución geográfica y el nicho ecológico de algunas especies (Swarts *et al.*, 2010) y posibilitando o impidiendo la co-existencia de diferentes orquídeas (Jacquemyn *et al.*, 2017). Chen *et al.* (2019) evaluaron la composición de la comunidad de hongos micorrízicos asociados a siete especies de orquídeas terrestres que habitan en un área montañosa de China. Los autores encontraron que cada una de las especies presenta ciertas preferencias y diferentes grados de especificidad en lo que respecta al tipo de hongo con el que se asocian, lo que conduce a la partición del nicho y permite la co-existencia en un mismo ambiente.

Cuando se analiza el grado de dependencia de una orquídea respecto a un hongo para completar su ciclo de vida, es posible distinguir tres grandes grupos: orquídeas completamente mico-heterótrofas (sin capacidad de realizar fotosíntesis durante todo su ciclo de vida y por tanto, dependientes de la interacción con hongos para la obtención de carbono), parcialmente mico-heterótrofas o también llamadas mixótrofas (adquieren capacidad de realizar fotosíntesis durante el desarrollo, pero continúan obteniendo carbono adicional del hongo) y completamente foto-autótrofas (obtienen carbono a través de la actividad fotosintética) (Herrera *et al.*, 2019). Si bien se podría pensar que en las especies completamente fotoautótrofas la interacción con el hongo se interrumpe luego de la fase de protocormo, esto no es cierto en la mayoría de los casos. Por el contrario, la asociación se mantiene, obteniendo la orquídea de esta relación una fuente adicional de agua y minerales (Jacquemyn *et al.*, 2011; Pecoraro *et al.*, 2020). Por otra parte, cuando se analiza el segundo miembro de esta interacción, los hongos involucrados en la simbiosis se pueden incluir en diferentes grupos: hongos micorrízicos tipo *Rhizoctonia*, ectomicorrizas (grupo asociado a orquídeas fotosintéticas y a orquídeas completamente mico-heterótrofas), hongos asociados a la descomposición de madera y hojarasca (asociados a orquídeas completamente mico-heterótrofas), y hongos endófitos (sin ningún rol específico asociado hasta el momento) (Herrera *et al.*, 2017). Una parte importante de estos hongos son saprófitos y habitan en la fracción orgánica de los suelos, mientras que otros forman ectomicorrizas con árboles y otras plantas micoheterotróficas.

Cuando el hongo que coloniza la semilla de una orquídea es el adecuado (compatible), este logrará promover la germinación y el desarrollo del protocormo (Liu *et al.*, 2010; Lilleskov *et al.*, 2002; Parrent *et al.*, 2006; Polme *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2013). En el caso de aquellas especies que son mico-heterótrofas durante todo su ciclo de vida, el hongo también favorecerá

el desarrollo de las plántulas y el crecimiento en la etapa adulta. El modo mediante el cual las orquídeas obtienen nutrientes en esta asociación, es por medio de la digestión controlada de las hifas que forma los pelotones (Sathiyadash *et al.*, 2020). Esta interacción reviste distintos grados de importancia de acuerdo a las características de la orquídea. En el caso particular de las orquídeas epífitas, el ambiente en el cual se desarrollan está caracterizado por una baja disponibilidad de agua y nutrientes. Esto hace que la interacción con el hongo apropiado sea un factor crítico, que determinará su supervivencia (Cevallos *et al.*, 2017; Rasmussen, 2002; Kuga *et al.*, 2014). Los hongos usualmente reportados en la bibliografía como formadores de micorrizas con orquídeas epífitas son: Ceratobasidiaceae, Serendipitaceae, Tulasnellaceae y Atractiellomycetes (Herrera *et al.*, 2017). En orquídeas terrestres, el entorno en el que se desarrollan suele ser más propicio para el crecimiento (en términos de disponibilidad de agua y nutrientes) cuando se lo compara con el de las epífitas y las litófilas. Este tipo de orquídeas habitualmente posee un rango más amplio de hongos con los cuales se asocia simbióticamente, siendo en general hongos del grupo polifilético Basidiomycetes y en algunos casos Ascomycetes (Dearnaley *et al.*, 2012; Bayman *et al.* 2016).

Si bien el efecto de las interacciones directas entre hongos y orquídeas resulta más evidente, las interacciones indirectas también tienen consecuencias sobre el establecimiento y supervivencia de estas angiospermas. De esta manera, las interacciones que se establecen entre hongos y otras plantas diferentes a las orquídeas, tienen un impacto sobre la estructura de las comunidades vegetales, afectando la capacidad de establecerse y sobrevivir de las orquídeas (Kosaka *et al.*, 2014). Un caso interesante para analizar este aspecto lo constituyen las especies parcial y totalmente mico-heterótrofas, que son capaces de asociarse a hongos que forman ectomicorrizas en diferentes especies de árboles (Pecoraro *et al.*, 2020). Se dice que la asociación así establecida es de tipo tripartita, ya que involucra a tres organismos diferentes (orquídea, hongo y árbol), y en ella la orquídea obtiene del árbol una fuente de carbono, usando al hongo como un intermediario. En estos casos se suele decir que la orquídea parasita indirectamente al árbol.

## **2. Técnicas para el estudio del rol de los hongos en la reproducción de orquídeas**

Frente a la fuerte presión antrópica que existe sobre las orquídeas (fragmentación, pérdida del hábitat, y extracción de ejemplares con fines medicinales u ornamentales), se han propuesto diferentes técnicas cuyo principal objetivo es contribuir a la conservación de esta familia. Una de las más frecuentemente empleadas y que permite la producción en masa de orquídeas

amenazadas o de interés comercial, es la germinación asimbiótica y cultivo *in vitro* (Stewart & Kane, 2006). Esta técnica cuando se emplea con fines hortícolas y partiendo de meristemas permite obtener plantas de calidad y genéticamente iguales. Sin embargo, las plantas obtenidas *in vitro* suelen tener un crecimiento lento y morir rápidamente cuando son transferidas a la naturaleza. Esto se debe principalmente a la incapacidad de muchas orquídeas de realizar fotosíntesis eficientemente. Una forma de resolver esto, ha sido mediante el uso de hongos endófitos que promueven el crecimiento de las plantas y refuerzan sus defensas (estimulan la producción de hormonas vegetales), favoreciendo la aclimatación y supervivencia en entornos naturales (Pant *et al.*, 2017; Stewart & Kane, 2006; Pedroza *et al.* 2005).

### **2.1. Cultivo y descripción de hongos endosimbióticos y ensayos de germinación**

Tal como fue mencionado en apartados previos, la interacción que se establece entre las orquídeas y los hongos que habitan en ellas y colonizan sus tejidos, es de suma importancia. Es por esto que, el conocimiento y caracterización de los hongos micorrízicos, es un aspecto clave para entender mejor las implicaciones tróficas, ecológicas y evolutivas de esta interacción. Para ello, diferentes grupos de investigación han desarrollado protocolos cuya implementación permite el estudio detallado de estos organismos en plena interacción, pero bajo condiciones controladas. En términos generales, el primer paso consiste en definir el área de la cual se va a obtener el material que se desea estudiar (orquídea) y luego realizar el muestreo, basándose en diferentes criterios. Zettler & Corey (2018) realizaron una revisión de las principales técnicas utilizadas para el aislamiento e identificación de hongos endófitos, que describe las tareas a realizar desde el momento del muestreo hasta el aislamiento e identificación. Con base a este y otros trabajos proponemos un cuadro resumen sobre las condiciones importantes en un muestreo de hongos endofíticos de las orquídeas (**Tabla 1**). Zettler & Corey (2018) mencionan que idealmente es conveniente colectar protocormos o plántulas, lo que involucra la toma del individuo completo. Esto permite no sólo obtener muestras de los pelotones formados en el tejido radical, sino también de los que viven en el interior del tejido poco diferenciado del protocormo o plántula. Esto, teóricamente, nos acerca más a la identificación de la orquídea mediante la implementación de técnicas moleculares (Yokoya *et al.*, 2015). Asimismo, dado que en algunas orquídeas los hongos con los cuales se asocian varían en las diferentes etapas del ciclo de vida (Jacquemyn *et al.*, 2011), la obtención de muestras en estas etapas posibilita identificar hongos que con mayor probabilidad han estado involucrados en el proceso de germinación. No obstante, debido al pequeño tamaño que

caracteriza a las orquídeas durante estas fases de su ciclo de vida, en ocasiones resulta difícil divisarlas, o incluso una vez colectada, conservarla y manipularla sin dañar los hongos endofíticos. Es por esto que en muchos casos se recurre a la toma de muestras de raíces en crecimiento activo de plantas adultas. En este punto, es importante tener en cuenta las características de la orquídea a muestrear, ya que cuando se trabaja con especies terrestres, es más factible que los pelotones se concentren en las raíces laterales; mientras que en las epífitas, es más habitual su presencia

**Tabla 1.** Cuadro resumen sobre las recomendaciones importantes en un muestreo de hongos endofíticos de las orquídeas. Adaptado de Zettler & Corey (2018).

### **Recomendaciones para el muestreo de hongos endofíticos de orquídeas**

Si se requiere obtener hongos para la germinación de semillas, priorizar material de protocormos y plántulas pequeñas.

En plantas longevas, terrestres, los pelotones son más frecuentes en las raíces de las ramas laterales o en las regiones del cuello. En el caso de las epífitas, los pelotones se encuentran a menudo en las raíces que entran en contacto físico con el sustrato.

En orquídeas longevas, es recomendable aislar las raíces más jóvenes.

La estacionalidad importa, la formación activa de pelotones está estrechamente relacionada con con mayor temperatura y la humedad.

Los pelotones que muestren el más mínimo grado de degradación deben descartarse.

Un solo pelotón puede estar compuesto por una mezcla de diferentes hongos.

---

en las raíces que se encuentran en contacto con el sustrato (no en raíces aéreas) (Suárez *et al.*, 2006). Las raíces así colectadas se deben disponer en viales (plásticos o de vidrio), transportarse en condiciones de oscuridad y conservarse a 4°C. El período de conservación no debe prolongarse, ya que se cree que los pelotones pierden viabilidad con el transcurso del tiempo. Es por esto que el fraccionamiento y esterilización superficial (con diversos compuestos), debe

realizarse dentro de las 24 a 48 horas posteriores a la colecta, para así dar inicio a los ensayos de aislamiento (Zettler & Corey, 2018).

Las técnicas utilizadas para el aislamiento comienzan con la observación microscópica del material, en busca de aquellas regiones en las cuales se observa la formación de pelotones en el córtex de la raíz. Para esto, es necesario retirar previamente pelos radicales, epidermis, velamen y todo tejido o material que pudiera estar por encima del córtex (Zettler & Corey, 2018; Gao *et al.*, 2020). Los fragmentos así obtenidos son empleados en el paso siguiente, que consiste en la maceración en una gota de agua destilada depositada sobre una placa de Petri. De este modo, es posible obtener muestras de los pelotones presentes en el interior de las células corticales, que serán colocados sobre una gota de agua y observados bajo microscopio para poder separar pelotones individuales. Posteriormente, los pelotones son colocados en placas de Petri conteniendo un medio de cultivo apropiado y un antibiótico para impedir la proliferación de diferentes microorganismos. El medio de cultivo más utilizado es el agar de papa y dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés), suplementado con cloranfenicol (Yuan *et al.*, 2009) o gentamicina (Pecoraro *et al.*, 2018). No obstante, algunos autores realizan un tratamiento con Penicilina y Streptomina (Gao *et al.*, 2020) o dicloruro de mercurio (Wang *et al.*, 2013), previo a la colocación en el medio. Las placas son conservadas en oscuridad a 25 °C hasta que las hifas emergen (Yuan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2020), En ese momento, se corta el tip de la hifa y se lo transfiere a una placa de Petri con PDA (oscuridad, 25 °C). Este procedimiento se repite varias veces a fin de purificar el cultivo (Yuan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2020), conservándolo luego a 4 °C.

Una vez purificado el cultivo, se lo utiliza para inocular placas de Petri conteniendo Agarharina de avena (OMA), las cuales se incuban durante 3 a 5 días (Gao *et al.*, 2020). Transcurrido este tiempo, las semillas extraídas de los frutos colectados son esterilizadas y colocadas en estas placas e incubadas a 25 °C durante un mes, analizando semana a semana la ocurrencia de germinación y desarrollo de protocormos. Como control, se preparan placas de Petri con el medio de cultivo seleccionado, sobre el cual se depositan semillas esterilizadas (sin inóculo) (Rafter *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2020). El estatus de germinación se analiza con base al criterio de Stewart & Zettler (2002) o Yamazaki & Miyoshi (2006), y el establecimiento de la asociación simbiótica por medio del análisis microscópico de los pelotones formados (o no) en el tejido de la semilla (Rafter *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2020).

## 2.2. Determinación molecular de hongos en protocormos y raíces

La aplicación de técnicas moleculares al estudio de hongos endófitos que habitan en el tejido de las raíces de las orquídeas, representó una mejora muy importante en esta área, dado que permite identificar al hongo sin necesidad de realizar un cultivo previo. Sin embargo, debido a que el objetivo principal en este tipo de investigaciones es identificar aquellos hongos capaces de formar micorrizas, la identificación a partir de cultivos puros o de pelotones individuales extraídos del tejido de las raíces, resulta ser más apropiado (Illyés *et al.*, 2010). En particular, cuando una orquídea se encuentra en el estadio de protocormo, es el momento más apropiado para investigar los aspectos moleculares y celulares de la interacción hongo-orquídea (Perotto *et al.*, 2014), debido a que el tamaño de las orquídeas durante esta fase es muy pequeño, no siempre es posible obtener muestras a campo, y es por esto que se recurre a diferentes técnicas. Cuando se trabaja con orquídeas terrestres, una alternativa a la que se suele recurrir, es la técnica de “*seed baiting*” o trampa de semillas, mientras que en epífitas se utiliza una modificación de dicha técnica (Li *et al.*, 2018).

De acuerdo con Li *et al.* (2018), la técnica de trampa de semillas consiste en una sucesión de tareas que inician con la confección de bolsas de tela de nylon con un tamaño de poro que posibilite el ingreso de hongos, pero que al mismo tiempo no permita el paso de las semillas de las orquídeas, evitando así pérdidas de material. A continuación, se coloca una cantidad definida de semillas (habitualmente entre 500 y 1000) en el interior de las bolsas y se procede al sellado. Las bolsas son transportadas al área seleccionada para llevar a cabo el estudio, donde se disponen en el suelo, a unos 4-6 cm de profundidad (en orquídeas terrestres), bajo una capa de humus o musgo, o bien se las pega sobre la corteza de los árboles (epífitas) o sobre rocas (litófilas), cubriéndolas con una delgada capa de musgos. Las bolsas deben posicionarse cerca de ejemplares adultos de la orquídea que se pretende estudiar, pues se presume que esto asegura en cierta medida la presencia en el área de hongos compatibles con la especie. Se georreferencia la ubicación donde las bolsas son depositadas y, transcurridos 12 a 36 meses, se procede a su colecta. Las bolsas son transportadas en condiciones que aseguren la conservación de la humedad, y temperatura entre 0 y 4 °C. Una vez en el laboratorio, las bolsas serán lavadas cuidadosamente con agua y se procederá a cortar cada una de ellas y a estimar las tasas de germinación y crecimiento bajo microscopio de disección (Stewart *et al.*, 2003). Finalmente, se seleccionarán los protocormos que se consideren adecuados para aislar el hongo.

Si bien la técnica descrita en el párrafo anterior es habitualmente empleada para obtener protocormos, diferentes autores reportan otros procedimientos. Huang *et al.* (2018), centrados en el estudio de una de las orquídeas epífitas más importantes de China desde el punto de vista de sus propiedades medicinales (*p.ej. Dendrobium devonianum*), realizaron un muestreo en el cual detectaron un área donde observaron una mezcla de plántulas y protocormos, muy próximos a lo que los autores consideraron la planta madre. Basados en el análisis de los caracteres morfológicos presentes en las plántulas, y en los datos obtenidos en el monitoreo poblacional realizado en el área, los autores asumieron que los protocormos pertenecían efectivamente a la especie de interés. Por otra parte, se colectaron frutos de una orquídea terrestre de interés (*Serapias vomeracea*), para evaluar la existencia de compatibilidad con un hongo del grupo de los basidiomicetes. Los frutos fueron acondicionados y almacenados hasta la dehiscencia, momento en el cual separaron las semillas y las esterilizaron (hipoclorito de sodio 1 % y Tween-20 por 20 minutos, seguido de agua destilada 5 minutos). Posteriormente, las semillas fueron suspendidas en agua destilada y luego colocadas individualmente en papeles de filtro posicionados sobre placas de Petri conteniendo un medio de cultivo sólido (agar harina de avena). Se inoculó con *Tulasnella calospora* (debido a que es un hongo común en el área donde crece *Serapias vomeracea*), incubando a 20 °C en condiciones de oscuridad. Luego de 20 a 30 días, se colectaron los protocormos formados. Los autores realizaron un control (germinación asimbiótica), colocando semillas esterilizadas sobre placas de Petri conteniendo medio de cultivo BM modificado, incubando por 90 días (Perotto *et al.* 2014).

Para el aislamiento del hongo, los protocormos son esterilizados superficialmente con agua y una dilución de hipoclorito de sodio (1 %), cortados a la mitad y colocados sobre una placa de Petri conteniendo PDA (Huang *et al.*, 2018) con estreptomycin y penicilina (Li *et al.*, 2018). Las placas se incuban en condiciones de oscuridad a  $25 \pm 2$  °C (Huang *et al.*, 2018) o  $25 \pm 0,5$  °C (Li *et al.*, 2018). A medida que las hifas emergen, son transferidas a nuevas placas de Petri con PDA, repitiendo el procedimiento hasta lograr la purificación del cultivo. Las cepas puras así aisladas, son luego cultivadas en medio líquido (Huang *et al.*, 2018) y finalmente empleadas para la identificación molecular. De este modo, se extrae el ADN genómico, empleando para ello métodos como el basado en la utilización de Bromuro de cetiltrimetilamonio (Huang *et al.*, 2018) o kits comerciales como E.Z.N.A Fungal DNA (Li *et al.*, 2018), entre otros. Mediante PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) se amplifica la región ITS del ADN ribosómico utilizando ITS1 e ITS4 como cebadores (Huang *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018), purificando los productos de la reacción. Las secuencias así obtenidas, son comparadas por medio de la

herramienta BLAST, con aquellas depositadas en bases de datos genéticas como GenBank. De este modo, se procede a la identificación, ya sea a nivel de género o especie, de acuerdo con el porcentaje de similitud existente entre las secuencias. Es decir, cuando las secuencias comparten más del 95 %, la identificación se realiza a nivel de género, mientras que cuando se supera el 99 % de similitud, es posible llegar a nivel de especie (Huang *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018).

### **2.3. Estudios fisiológicos sobre nutrición en asociación con hongos endófitos**

Cuando se analiza la bibliografía en busca de información acerca de cuáles son los beneficios que representa la asociación entre orquídeas y hongos endófitos para cada uno de los miembros de la interacción, se observa que el énfasis está puesto en las orquídeas. A pesar de ello, se sabe que los resultados de la asociación van en ambas direcciones, y es así que mientras la planta obtiene una fuente de carbono y nutrientes, el endófito adquiere azúcares (Pant *et al.*, 2017). El primer trabajo publicado donde quedó demostrada la transferencia de carbono desde la orquídea al hongo, fue realizado por Cameron *et al.* (2006), quienes analizaron la interacción entre *Goodyera repens* y *Ceratobasidium cornigerum*. Los autores tomaron muestras de la orquídea de un ambiente natural y las hicieron crecer en laboratorio bajo condiciones controladas (15 °C, 85 % humedad relativa y fotoperíodo de 12 horas luz), tomando muestras de sus raíces para aislar al hongo endófito y confirmar su identidad por medio de estudios moleculares. Los ensayos de nutrición se desarrollaron en microcosmos, y para ello se extrajeron brotes del rizoma principal, los cuales fueron esterilizados superficialmente (hipoclorito de calcio 5 % 1 minuto, seguido de agua destilada) y colocados en placas de Petri (perforadas en uno de sus extremos para la correcta ubicación del material) conteniendo agar. Los brotes fueron dispuestos de modo que las raíces ocuparan la mitad superior de la placa, quedando el tallo y hojas por fuera. Los laterales de las placas fueron sellados con parafilm y cada una de las placas fue llevada a una cámara de crecimiento. Luego de dos semanas, cuando el micelio se había desarrollado, los autores seleccionaron placas de las cuales extrajeron una porción de agar de la zona de crecimiento activo de las hifas, reemplazándola por una porción de agar de idénticas dimensiones pero marcada con [<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N]Glicina. Las placas restantes no se modificaron y actuaron como control. Luego, formaron pares tratamiento-control, envolviendo cada placa con papel aluminio y colocando cada par en una bolsa que sólo cubra las placas, las cuales fueron llevadas a cámaras de crecimiento por 2 semanas. Finalizado el ensayo, las muestras de raíces, tallos y micelio fueron

secadas (80 °C por 48 hs) y pesadas, tomando pequeñas alícuotas de material para determinación de  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ . Este estudio fue repetido utilizando [ $^{14}\text{C}$ ]-Glicina, para poder confirmar que el carbono adquirido en el ensayo anterior provino de la relación hongo-orquídea, y no de la fijación de carbono atmosférico. Finalmente, los autores diseñaron un ensayo para evaluar la transferencia de carbono desde la orquídea hacia al hongo. Para esto utilizaron un diseño similar, pero la adición del sustrato marcado no fue a través del medio de cultivo, sino que se liberó  $^{14}\text{CO}_2$  en la cámara de crecimiento (por evaporación de ácido láctico marcado). Los resultados de este estudio mostraron que 2,6 % del carbono fijado fue transferido al micelio extra-radical de *Ceratobasidium cornigerum*, dando sustento a la transferencia bidireccional de nutrientes.

En los ecosistemas naturales, el nitrógeno suele ser uno de los factores limitantes para el crecimiento de las plantas (Vitousek & Howarth, 1991). En 2017, Fochi *et al.* estudiaron la asociación establecida entre la orquídea *Serapias vomeracea*, en su estadio mico-heterótrofo (protocormo), y el hongo *Tulasnella calospora*, a fin de establecer la dinámica del flujo de nitrógeno y las bases fisiológicas/moleculares subyacentes. Los estudios de expresión genética revelaron que en esta interacción, el nitrógeno es transferido por el hongo a la orquídea bajo su forma orgánica, mientras que el hongo intracelular capta los iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) de la interfaz apoplástica. La importancia de este estudio reside en que revela por primera vez las bases genéticas del flujo de nitrógeno hacia el hongo, proponiendo un modelo para el intercambio de nutrientes entre ambos miembros (Dearnaley & Cameron, 2017).

En conjunto, la información provista por estos estudios permitió plantear modelos de intercambio de nutrientes entre los miembros de la asociación hongo-orquídea. En estadios no fotosintéticos, las orquídeas exportan iones amonio, que son captados por el hongo, al tiempo que obtienen nitrógeno, fósforo y carbono (ya sea por transferencia o mediante lisis de los pelotones) (Cameron *et al.*, 2006; Deamley & Cameron, 2017; Fochi *et al.*, 2017). En el caso de orquídeas fotosintéticas, estas obtienen fósforo (por transferencia), nitrógeno y carbono (por degradación de los pelotones) del hongo, al tiempo que liberan azúcares que son absorbidos por el miembro fúngico (Cameron *et al.*, 2006; Deamley & Cameron, 2017).

#### **2.4. Uso de isótopos radioactivos en la cuantificación de aportaciones nutricionales de ambos mutualistas (H-O)**

Los hongos que forman asociaciones con orquídeas, tienen acceso a un stock de carbono y nutrientes, que puede ser derivado del suelo o de las plantas (Stöckel *et al.*, 2014). Esto permite

caracterizar a los hongos y a las orquídeas que los utilizan como fuente de carbono y nutrientes, con base a la abundancia de isótopos estables (Taylor *et al.*, 2003; Stöckel *et al.*, 2014). Cuando se compara especies totalmente mico-heterótrofas con aquellas autótrofas, se observa una mayor abundancia de los isótopos  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  en el primer grupo, mientras que cuando se estudian orquídeas parcialmente mico-heterótrofas, los niveles son intermedios (Gebauer & Meyer, 2003). Típicamente, las especies mixótrofas se asocian con hongos que forman ectomicorrizas con otras plantas, mientras que las especies autótrofas se asocian con hongos que se comportan como saprófitos en suelos o como endófitos de otras plantas (Jacquemyn *et al.*, 2017).

Tradicionalmente, los estudios enfocados en el estudio de isótopos estables para definir la fuente de la cual la orquídea obtiene carbono y nutrientes, se han desarrollado empleando medios de cultivo conteniendo carbono, nitrógeno y fósforo marcados, como así también atmósferas con dióxido de carbono también marcado radiactivamente (Wang *et al.*, 2013). *Dendrobium officinale*, es una orquídea fotosintética de importancia en China por sus propiedades medicinales, cuya dinámica de adquisición de carbono fue evaluada, para esto, se sembraron semillas esterilizadas (obtenidas de un ambiente natural) en botellas con medio de cultivo Harvais y las incubaron bajo condiciones controladas ( $26 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 12 hs luz). Luego de la germinación, las plántulas fueron transferidas a nuevas botellas con medio de cultivo Harvais e incubadas hasta completar 2 meses. En paralelo, se aislaron hongos endófitos (denominados S1 y S3) de las raíces de ejemplares de *D. officinale* obtenidos en el ambiente. Dieciséis de las plántulas obtenidas luego de dos meses de ensayo, fueron colocadas en botellas de cultivo conteniendo medio MS suplementado con agar y glucosa. La mitad de estas botellas fueron reservadas como control, y a la mitad restante, se les incorporó un inóculo de los endófitos aislados. Para analizar de dónde incorporaba cada plántula el carbono, se diseñaron microcosmos con dos tipos de marcas. El primero de ellos contenía carbonato de bario marcado con  $^{13}\text{C}$ , mientras que el segundo contenía [ $^{13}\text{C}$ ]-Glucosa. Esto les permitió distinguir entre aquellas plántulas que incorporaron carbono atmosférico, y aquellas que obtuvieron carbono del sustrato. Para liberar dióxido de carbono, los autores inyectaron ácido láctico y finalmente sellaron cada microcosmos, manteniéndolo en cámara de crecimiento por dos meses. Por medio de este estudio, los autores identificaron dos hongos endófitos con capacidad para formar micorrizas con *Dendrobium officinale* y con diferentes efectos sobre la captación de carbono por parte de la orquídea. De este modo, si bien la inoculación con ambos endófitos se vio reflejada en una mayor captación de carbono del sustrato (marca en glucosa) en comparación con las plántulas no inoculadas, el inóculo S3 produjo un aumento considerable en la captación

de carbono atmosférico (marca en carbonato de bario). La comparación de las plántulas inoculadas con las plantas control, mostró una mayor biomasa y producción de polisacáridos en las primeras, dando apoyo al efecto beneficioso de la asociación hongo-orquídea (Wang *et al.*, 2013).

También se realizó un estudio cuyo principal objetivo fue comparar los patrones de abundancia de isótopos estables en especies completamente mico-heterótrofas asociadas a un hongo capaz de formar ectomicorrizas con otras plantas, especies parcialmente micoheterótrofas asociadas a diferentes hongos ectomicorrízicos y especies autótrofas asociadas a hongos tipo *Rhizoctonia*. Para esto, se emplearon un stock de semillas de orquídeas colectadas previamente en ambientes naturales, para así aplicar la técnica de trampa de semillas en cuatro áreas diferentes de Italia, España y República Checa. Luego de uno a cuatro años, los autores regresaron a las áreas donde las trampas habían sido colocadas, retirándolas y tomando muestras adicionales de hojas y tallos de ejemplares adultos, y hojas de otros grupos de plantas (no orquídeas). En el laboratorio, las trampas fueron abiertas, evaluando a continuación los porcentajes de germinación mediante el empleo del estereoscopio. Un protocormo por cada trampa fue destinado a extracción de ADN, mientras que el resto del material fue utilizado para determinar las abundancias de carbono y nitrógeno. Para ello, los protocormos fueron secados a 105 °C hasta peso constante, registrando los datos de peso seco (biomasa) por medio de una micro-balanza. Las hojas y tallos de los ejemplares adultos y hojas de otras plantas, fueron sometidos al mismo tratamiento (105 °C, peso constante). El material seco fue molido y conservado en ambiente seco, tomando muestras de 2,5 a 3,5 gramos para determinar las abundancias de C y N, mediante analizador acoplado a un espectrómetro de masas (Wang *et al.*, 2013).

Los estudios sobre aportaciones nutricionales en la asociación hongo-orquídea se han basado principalmente en el análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno. Más recientemente, la cuantificación de isótopos de hidrógeno como una alternativa para identificar la ganancia de carbono a partir de los hongos tipo *Rhizotocnia*, ha sido incorporada en diferentes investigaciones en las cuales la información disponible acerca de la abundancia isotópica del carbono es escasa (Gebauer *et al.*, 2016). De acuerdo a esta metodología, las especies completamente mico-heterótrofas presentan los valores de abundancia de  $^2\text{H}$  más altos, mientras que las autótrofas exhiben los más bajos. En este contexto, Gebauer *et al.* (2020) analizaron la abundancia isotópica de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$  y  $^{18}\text{O}$  en ocho especies de orquídeas

pertenecientes a dos grupos funcionales diferentes (con y sin pigmentos fotosintéticos). La incorporación de la determinación de  $^2\text{H}$  permitió distinguir entre carbono proveniente de hongos y aquel obtenido por fotosíntesis, en casos en los cuales la estimación de  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  no proveyó información suficiente para concluir al respecto.

## 2.5. Estudios en orquídeas mico-heterótrofas

La transición entre especies fotoautótrofas y mico-heterótrofas está acompañada de importantes cambios en la morfología de las orquídeas, entre ellos una considerable reducción en el tamaño de las hojas (Merckx *et al.*, 2013). Las especies mico-heterótrofas, exhiben diferentes grados de dependencia para la obtención de carbono por medio de la asociación con hongos micorrízicos. De este modo, las especies parcial y totalmente mico-heterótrofas se asocian con ascomicetes y basidiomicetes, asegurando el acceso a fuentes de carbono permanentes (Pecoraro *et al.*, 2020). En áreas tropicales, las especies mico-heterótrofas si bien exhiben una preferencia por asociarse con hongos saprófitos, existen casos en los cuales este tipo de orquídeas interactúan con hongos formadores de ectomicorrizas (Pecoraro *et al.*, 2020). Roy *et al.* (2009), estudiaron la diversidad de hongos con los cuales se asocian dos orquídeas mico-heterótrofas que habitan en bosques tropicales de Tailandia. Como resultado del aislamiento e identificación molecular de los endófitos presentes en raíces colectadas a campo, los autores encontraron que un 83 % eran hongos formadores de ectomicorrizas, 10 % hongos saprófitos, 4 % hongos tipo *Rhizotocnia*, y el 3 % restante eran endófitos de otros grupos. Este fue uno de los primeros estudios en demostrar que las orquídeas mico-heterótrofas tropicales se asocian con hongos formadores de ectomicorrizas, obteniendo carbono de otra planta a través del micelio.

Los análisis de isótopos estables son una buena herramienta a la hora de establecer el grado de mico-heterotrofia en orquídeas (Suetsugu *et al.*, 2019). Con la idea de establecer el grado de mico-heterotrofia en una comunidad costera de orquídeas en Bélgica, Jacquemyn *et al.* (2017) obtuvieron muestras de raíces de siete especies diferentes, de las cuales aislaron los endófitos para identificarlos mediante métodos moleculares. Adicionalmente, los autores colectaron hojas de estas especies y de otras familias de plantas, las cuales fueron molidas y colocadas en tubos Eppendorf para cuantificar el contenido de nitrógeno y los cocientes  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ . Este estudio demostró que las especies que habitan en un mismo ambiente, difieren en los hongos con los cuales se asocian, y que no existe una delimitación clara que hace que ciertas especies interactúen sólo con hongos formadores de ectomicorrizas, mientras otras sólo se

asocien a hongos tipo *Rhizotocnia*. Por el contrario, los autores señalan la presencia de un continuo, y que ciertas orquídeas asociadas a hongos *Rhizotocnia*, también se encuentran colonizadas por hongos formadores de ectomicorrizas (si bien desconocen si efectivamente intervienen en la nutrición de la orquídea).

### 2.5.1. Orquídeas mico-heterótrofas que explotan a hongos saprófitos

La familia *Orchidaceae* agrupa a casi la mitad de las especies vegetales completamente mico-heterótrofas actualmente identificadas (Merckx, 2013). *Gastrodia elata* es una orquídea abundante en el continente asiático que completamente mico-heterótrofa (*i.e.* carece de pigmentos fotosintéticos), tal como sucede con otras especies, *G. elata* se asocia a diferentes tipos de hongos a lo largo de su ciclo de vida, particularmente a *Mycena osmundicola* durante la germinación y a *Armillaria mellea* en su etapa adulta (Xu & Guo, 2000). Park & Lee (2013) estudiaron la relación que se establece entre *G. elata* y diferentes especies de hongos del género *Mycena*. Mediante estudios de germinación simbiótica, aislamiento e identificación molecular de endófitos, los autores detectaron una gran especificidad en la especie de hongo con el que la orquídea se asocia para la germinación. Esta especificidad también se observa en estadios posteriores del desarrollo, encontrando que la orquídea obtiene carbono para su crecimiento por medio de la asociación con especies fúngicas saprófitas.

En 2019, se realizó un estudio comparativo entre los hongos que forman micorrizas con las variantes verdes y albinas de *Goodyera velatina*, una orquídea frecuentemente asociada a hongos saprófitos. El estudio de ambas variantes, pertenecientes a una misma especie, ofrecen un gran modelo para evaluar diferencias fisiológicas, dado que el antecedente genético es el mismo (Suetsugu *et al.*, 2019). Se realizaron análisis de isótopos estables para determinar las aportaciones nutricionales y así definir el grado de mico-heterotrofia de cada variante, y ensayos moleculares para la identificación de los hongos micorrízicos. En lo que respecta al tipo de micobionte, se pudo observar que ambas variantes se asocian con especies saprófitas (*Ceratobasidium* spp., *Tulasnella* spp.) y formadoras de ectomicorrizas (*Russula* spp.). Mediante los estudios de isótopos, detectaron que las variantes albinas presentan un elevado contenido de  $^{13}\text{C}$  pero no de  $^{15}\text{N}$ , lo que indica que se trata de especies completamente micoheterótrofas, que explotan hongos saprófitos para la obtención de carbono para su crecimiento. Por su parte, las variantes verdes exhibieron bajos contenidos de  $^{13}\text{C}$  y niveles de  $^{15}\text{N}$  muy similares a los detectados en otras plantas autótrofas. Esto indicaría que estas variantes

serían fotoautótrofas pero que también obtienen una fuente extra de carbono por medio de la asociación con ciertos hongos formadores de ectomicorizas.

### **2.5.2. Orquídeas mico-heterótrofas que explotan a hongos micorrízicos de otras plantas**

Las especies parcialmente mico-heterótrofas suelen asociarse a hongos formadores de ectomicorizas, exhibiendo diferentes grados de dependencia para la obtención de carbono y nitrógeno, que pueden ser determinadas mediante análisis de isótopos estables (Gebauer & Meyer, 2003). Se considera que las orquídeas que se asocian con hongos formadores de ectomicorizas, presentan mayor abundancia relativa de  $^{15}\text{N}$ , cuando se la compara con aquellas de especies cuya fuente de carbono son hongos saprófitos (Ogura-Tsujita *et al.*, 2012). En 2013, se analizó la dinámica que se establecía en la relación tripartita entre *Cephalanthera falcata* (orquídea), hongos del clado Thelephoraceae y el árbol *Quercus serrata* (roble de hoja caduca). Para esto, los autores colectaron muestras de raíces de la orquídea, de donde aislaron e identificaron dos hongos endofíticos. Adicionalmente, obtuvieron semillas de la especie de roble que crecía en el área junto a la orquídea, y las emplearon para realizar ensayos de germinación y crecimiento, de un año de duración. De este modo, obtuvieron 45 plantas cuyas raíces fueron inoculadas o no (control) con los dos hongos identificados procedentes de las orquídeas. Estas plantas fueron trasladadas y mantenidas en cámaras de crecimiento por tres meses, analizando la formación de ectomicorizas mediante microscopía. Finalmente, realizaron ensayos de germinación y crecimiento en microcosmos con semillas de *Cephalanthera falcata*, obteniendo plántulas, cada una de las cuales fue transferida a macetas junto a las plantas de roble del ensayo anterior. Se determinaron las tasas de supervivencia y los pesos frescos de las plántulas de *C. falcata*. En las macetas control, donde se encontraban las plantas con raíces sin inocular, las tasas de supervivencia se volvieron nulas en el mes 30, mientras que en presencia de los inóculos, los valores fueron de 73,3 % y 86,7 %. De manera similar, la biomasa fue de cero al final del ensayo en las macetas control, en tanto que en las macetas con inóculo, se registró un incremento progresivo de la biomasa en el transcurso del ensayo. Mediante este estudio, los autores pudieron demostrar la interacción entre *Quercus serrata* y dos hongos del clado Thelephoraceae, y entre estos últimos y la orquídea. La promoción del crecimiento y las tasas de supervivencia de *C. falcata* observadas en las macetas en las cuales el roble había sido inoculado con el hongo, señalan el establecimiento de la

asociación tripartita y los beneficios que ello implica para la orquídea (Yagame & Yamato, 2013)

La reducción en el tamaño de las hojas que se ha dado evolutivamente en las orquídeas cuando se analiza a las especies en relación a su modo de nutrición (autótrofas, parcialmente mico-heterótrofas, totalmente mico-heterótrofas), parece haber sido un proceso gradual (Sakamoto *et al.*, 2016). Con el objeto de indagar sobre los efectos generados por dicha reducción en el mecanismo mico-heterotrófico, se estudiaron cinco especies (parcial y totalmente mico-heterótrofas) pertenecientes al género *Cephalanthera* que habitan en Japón. Por medio del análisis de isótopos estables, los autores detectaron que en los ejemplares albinos y en *C. subaphylla* (especie con hojas muy reducidas) se daba un enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$ , superior al de las otras especies (*C. falcata*, *C. erecta*, *C. longibracteata*). Un aspecto interesante es que se detectaron diferencias entre sitios y año de muestreo para una misma especie, lo que refleja la importancia del efecto de los factores ambientales en la dinámica de obtención de carbono y nitrógeno. Combinando esta información con estudios previos en los cuales se identificaron los hongos frecuentemente asociados al género *Cephalanthera*, los autores identificaron a *C. subaphylla* como una especie con una fuerte capacidad micoheterotrófica. Los resultados sugieren que en la transición de la mico-heterotrofia parcial a la total, las especies fortalecen su capacidad para obtener carbono en la asociación con hongos antes de perder completamente sus hojas, lo que garantiza la supervivencia de estas especies (Sakamoto *et al.* 2016).

Teniendo en cuenta que las especies parcialmente mico-heterótrofas se encuentran filogenéticamente cerca de aquellas especies completamente mico-heterótrofas, Suetsugu *et al.* (2020), analizaron el grado de dependencia de una orquídea del género *Oreorchis* (cercano al género *Corallorhiza*, completamente mico-heterotrófico) en relación a los hongos micorrízicos con los cuales se asocia para la obtención de carbono. La especie seleccionada para su estudio fue *Oreorchis indica*, orquídea en ocasiones vinculada a un tipo de nutrición totalmente micoheterótrofa, debido a su característico rizoma coralino (típico de este tipo de nutrición) (Imhof *et al.*, 2013). Se colectaron muestras de hojas, raíces y rizomas, que fueron utilizadas para análisis de isótopos, aislamiento e identificación de endófitos, respectivamente. Un aspecto importante sobre la colecta, es que para la toma de muestras de hojas de otras plantas autótrofas, los autores definieron cuadrantes en los que debían estar presentes tanto la orquídea como las otras plantas. El objetivo de esto fue minimizar la influencia de factores ambientales

(Gebauer & Schulze, 1991). Los resultados obtenidos indican que *O. indica* se asocia exclusivamente con hongos formadores de ectomicorrizas (*Tomentella* spp.), y que como resultado de esta interacción, obtiene el 44 % ( $\pm 6,2$  %) del carbono y 82,5 % ( $\pm 12,6$  %) del nitrógeno necesario para su crecimiento. Estos valores, sumados a los datos de enriquecimiento de isótopos, señalan un modo de nutrición parcialmente mico-heterótrofo. Desde un punto de vista evolutivo, estos resultados apoyan la idea de que dentro del clado *Oreorchis-Corallorhiza*, la mico-heterotrofia completa surgió de la mico-heterotrofia parcial y no como un cambio directo a partir de la autotrofia.

### **3. Sucesión fúngica en la interacción hongo-orquídea**

El reclutamiento a partir de semillas es uno de los principales determinantes de la distribución de una planta (Clark *et al.*, 2007). Aquellas especies que producen semillas de pequeño tamaño, son capaces de colonizar sitios vacantes muy distantes de su sitio de producción, pero su establecimiento y crecimiento parece verse más afectado por las condiciones que caracterizan al hábitat dado que parte de una reserva inicial menos o nula de nutrientes. En el caso particular de las orquídeas, la ausencia total de endospermo aunque permite la dispersión a grandes distancias por lo liviano de sus semillas (Arditti, 2009), también determina que uno de los principales limitantes sea la ausencia en el hábitat de los hongos micorrízicos adecuados capaces de suplir los nutrientes que la semilla no posee para iniciar su germinación (Arditti, 2009; McCormick & Jacquemyn, 2014). Como ha quedado expuesto en los apartados previos, debido a esto los hongos micorrízicos son un elemento clave en la germinación y crecimiento de orquídeas. Durante la germinación y en la fase de protocormo, la dependencia de las orquídeas respecto a esta asociación es estricta, mientras que en etapas posteriores el grado de dependencia varía de acuerdo al tipo de nutrición que caracteriza a la especie (autótrofa, mixótrofa o completamente mico-heterótrofa). Es este grado de dependencia junto al nivel de especialización de las orquídeas, lo que hace que la distribución de estas plantas se encuentre estrechamente relacionada con la distribución de los hongos micorrízicos asociados. De este modo, la germinación y desarrollo de protocormos de una especie de orquídea, refleja la distribución y abundancia del hongo con el cual la especie interactúa en un ambiente dado, y muestra que los sitios con alta abundancia de hongos micorrízicos, son cruciales en la dinámica de poblaciones de estas especies (McCormick *et al.*, 2016; Djordjević & Tsiftsis, 2020). Autores como McCormick *et al.* (2016) sugieren que la distribución y abundancia de sitios con alta densidad de hongos micorrízicos (“hot spots”),

estarían relacionadas con variaciones espaciales a pequeña escala en las condiciones edáficas, o con procesos de dispersión estocástica. Por el contrario, otros autores apoyan que la distribución de hongos micorrízicos es independiente de la presencia o ausencia de las orquídeas con las cuales este tipo de hongos suele asociarse (Waterman & Bidartondo, 2008; Djordjević & Tsiftsis, 2020).

En ecología, el concepto de sucesión ecológica hace referencia al proceso mediante el cual un ecosistema experimenta cambios en la composición de especies a lo largo del tiempo, hasta llegar a un estado caracterizado por un equilibrio dinámico (Odum, 1963). En una sucesión natural, estos cambios son consecuencia de una serie de modificaciones graduales que se dan en el ambiente físico por la actividad biológica (p.ej. cambios en la cantidad de materia orgánica, pH y contenido de nutrientes de un suelo) (Vargas Abarzúa & Zúñiga Molinier, 2010; De la Orden, 2020). En el caso de las orquídeas, los cambios en el ambiente físico pueden tener un efecto directo sobre la composición de especies de estas comunidades, como así también sobre la composición de especies de la comunidad fúngica con la cual las orquídeas interactúan. La asociación de una especie de orquídea con diferentes linajes de hongos micorrízicos, le otorgan una ventaja adaptativa frente a las alteraciones que pueden ocurrir en el ambiente (McCormick *et al.*, 2006). Las variaciones que se observan entre las asociaciones que establece una misma especie en las diferentes etapas de su ciclo de vida, podrían ser atribuidas a cambios estacionales o ambientales en la comunidad de hongos micorrízicos dentro de las raíces y en el suelo circundante (Oja *et al.*, 2015). Bajo la hipótesis de que las comunidades de hongos micorrízicos se modifican a lo largo del período vegetativo de acuerdo a la fase del ciclo de vida de la orquídea, y que los patrones temporales varían entre comunidades en diferentes hábitats, se estudiaron tres taxa de la familia *Orchidaceae* que crecían en hábitats distintos (bosques y praderas). Los autores encontraron que los hongos del grupo Serendipitaceae estaban igualmente representados en raíces de orquídeas de ambos tipos de hábitat, mientras que los miembros del grupo Sebacinaceae (formadores de ectomicorrizas), eran más frecuentes en orquídeas creciendo en ambientes boscosos. Asimismo, detectaron asociación con taxa potencialmente no micorrízicos y con taxa formadores de ectomicorrizas poco habituales. Gran parte de los hongos aislados de las raíces también fueron detectados en muestras de suelo, indicando que ese es su sitio de origen y que la asociación con orquídeas les proveería protección. Cuando los autores investigaron el recambio temporal de hongos micorrízicos en raíces y suelo, observaron que las raíces de las orquídeas objeto de estudio, estuvieron colonizadas de manera permanente, y que se producía un pequeño pero significativo recambio

a lo largo del período analizado (más pronunciado en las especies con mayor esfuerzo de muestreo). En el caso de la comunidad fúngica asociada al suelo, se detectó también un ligero pero significativo recambio temporal, siendo la riqueza máxima al comienzo de la temporada de crecimiento. Esto se relacionaría con la elevada disponibilidad de carbono (consecuencia de la degradación de la materia producida en la temporada previa) y/o al reclutamiento de esporas (Oja *et al.* 2014).

El elevado grado de especificidad que ha sido observado en la asociación hongo-orquídea, junto al grado de dependencia de esta última respecto a la asociación, imponen un mayor riesgo de extinción para los miembros de la familia Orchidaceae (Swarts & Dixon, 2009; Djordjević & Tsiftsis, 2020). En este sentido, el género *Paphiopedilum* es uno de los tantos incluidos en los listados de CITES. Dentro de este género, *P. spicerianum* es una especie severamente afectada por la colecta ilegal y la fragmentación de su hábitat, y de la que sólo se ha identificado un relicto de 38 individuos localizado al suroeste de China (Ye, 2006). Con el objetivo de identificar los hongos micorrízicos con los cuales esta especie se asocia, y analizar la dinámica espacio-temporal de dicha comunidad fúngica en respuesta a las perturbaciones en el hábitat, Han *et al.* (2016) estudiaron ejemplares de dicha población relictual. El área en la cual se desarrolla esta orquídea se caracteriza por una marcada estacionalidad, con un período húmedo entre mayo y octubre, seguido de una estación seca de noviembre a abril (Han *et al.*, 2016). Debido al progresivo cambio en los usos del suelo para el cultivo de café, la superficie de bosques prístinos en la región es cada vez menor. En su investigación, los autores trasplantaron 18 ejemplares de la población original a un nuevo sitio con condiciones climáticas similares al ambiente natural. Adicionalmente, tomaron muestras de raíces y suelo para aislar e identificar a las comunidades fúngicas asociadas. Los autores encontraron que *P. spicerianum* es capaz de asociarse con un amplio rango de hongos micorrízicos, y que en su fase adulta, presenta buena tolerancia a la sequía y a los cambios que se dan en el ambiente. Se observó una fluctuación temporal en las especies fúngicas dominantes, que podría ser atribuida a cambios en la demanda de nutrientes y en la fenología de *P. spicerianum*. Entre los factores abióticos que tuvieron un mayor impacto sobre la estructura de la comunidad fúngica, el contenido de nitrógeno hidrolizable, fósforo y agua, resultaron ser los más importantes.

Debido al rol crucial que tienen los hongos micorrízicos en el ciclo de vida de las orquídeas, es de esperar que los cambios en la composición, la riqueza y la abundancia de sus comunidades, tengan un fuerte impacto en el desempeño, distribución y composición de las

comunidades de orquídeas (Jacquemyn *et al.*, 2016; McCormick *et al.*, 2018). Con el objetivo de analizar los factores que determinan la composición de las comunidades fúngicas asociadas a 14 especies del género *Dactylorhiza*, Jacquemyn *et al.* (2016) llevaron a cabo muestreos en diferentes ambientes (praderas y bosques mediterráneos, ambientes costeros y alpinos boreales). Las especies pertenecientes a este género, se caracterizan por ocupar hábitats con condiciones edáficas contrastantes y poseer baja especificidad por los hongos con los cuales se asocian (Jacquemyn *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos por los autores indican que las condiciones ambientales que caracterizan a cada sitio, así como las fluctuaciones en estas condiciones, son determinantes en la estructura de la comunidad fúngica asociada a las diferentes especies de orquídeas evaluadas.

Si bien la distribución de orquídeas se ve influida principalmente por la presencia y abundancia en un sitio de hongos micorrízicos compatibles con la especie, la comunidad fúngica en conjunto es un aspecto determinante, debido a las interacciones que se establecen entre hongos de diferentes géneros o especies, entre hongos y orquídeas y entre estos y distintos grupos de plantas (Pecoraro *et al.*, 2018). Estas interacciones definen la estructura de las comunidades vegetales y en consecuencia, el establecimiento y crecimiento de orquídeas (Kosaka *et al.*, 2014; Pecoraro *et al.*, 2018). Con el objetivo de poner a prueba la hipótesis de que las variaciones en la comunidad fúngica que se desarrolla sobre el suelo es un buen predictor del ensamble de orquídeas, caracterizaron las comunidades fúngicas asociadas a ocho especies de orquídeas creciendo en áreas protegidas de Italia (praderas y bosques). Los autores encontraron que las especies de orquídeas evaluadas, se asociaban con una comunidad fúngica macroscópica compuesta por 268 especies, y que existe una correlación entre la diversidad de hongos macroscópicos y las variaciones en la comunidad de orquídeas. Es así que el análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés), mostró que este grupo de hongos explica 7 % de la variación detectada en la composición de la comunidad de orquídeas. Los autores proponen que la composición de la comunidad fúngica total podría afectar la distribución de orquídeas de la siguiente manera (Pecoraro *et al.* 2018):

1. El conjunto de especies fúngicas en el suelo constituye una fuente que provee los hongos compatibles con los que las diferentes especies de orquídeas formarán asociaciones en las distintas etapas de sus ciclos de vida.
2. Las interacciones que se establecen entre diferentes especies de hongos pueden ser positivas o negativas. El signo de dichas interacciones define la coexistencia o exclusión,

determinando la composición de la comunidad fúngica, y en consecuencia, de las especies de orquídeas que podrán establecerse en un sitio y crecer.

3. Los hongos presentes en el suelo que no se asocian directamente con las orquídeas, podrían estimular de manera indirecta la germinación de sus semillas por medio de la producción de etileno. De manera similar, dado que los hongos modifican las condiciones edáficas, favoreciendo la disponibilidad de nutrientes, podrían tener un efecto beneficioso sobre el crecimiento de este y otros grupos de plantas.

Hasta el momento, los diferentes estudios analizados han demostrado que las orquídeas son capaces de cambiar el hongo micorrízico con el cual se asocian, en respuesta a alteraciones ambientales como la sequía por ejemplo (McCormick *et al.*, 2006). Estos estudios analizan de manera independiente la influencia del factor de estrés sobre la comunidad de hongos micorrízicos o sobre la de orquídeas, sin tener en cuenta que se trata de una relación tripartita (Kaur *et al.*, 2021). Esto hace que no sea posible establecer si el cambio se produce como una respuesta de la orquídea al estrés ambiental, o si es consecuencia de la modificación en la abundancia de los hongos micorrízicos presentes en el suelo debido al factor de estrés. Teniendo esto en cuenta, y con el objetivo de reducir los vacíos en el conocimiento sobre la dinámica de las poblaciones de orquídeas, Kaur *et al.* (2021) estudiaron la comunidad fúngica asociada a poblaciones de diferente tamaño de la orquídea terrestre *Platanthera cooperi* (considerada una especie rara). La hipótesis planteada por estos autores, es que las poblaciones de diferentes tamaños alojan en sus raíces comunidades fúngicas diferentes, y que estas diferencias están condicionadas por la estructura de dicha comunidad en el suelo y por las condiciones microambientales. *P. cooperi* es una orquídea terrestre, perenne, nativa de Estados Unidos y México, que típicamente habita bosques, praderas y chaparrales (Ackerman & Lauri, 2018). Los autores demostraron que el tamaño poblacional de esta especie, está relacionado con la composición de la comunidad fúngica presente en sus raíces y en el suelo, y que al mismo tiempo, la estructura de la comunidad fúngica es determinada por la química del suelo. En particular, se sabe que el tipo de sustrato y las condiciones microambientales que caracterizan a un sitio, ejercen una gran influencia sobre la selección del hongo micorrízico con el cual se asociará una orquídea (McCormick *et al.*, 2006). En este estudio, el contenido de zinc (Zn), fósforo (P), materia orgánica (MO) y la granulometría del suelo (porcentaje de limo) fueron las variables que explicaron las diferencias detectadas entre las comunidades de hongos micorrízicos asociadas a poblaciones de distinto tamaño de *P. cooperi*. De este modo, los

autores demostraron que la demografía de *P. cooperi* está definida por una combinación de las preferencias bióticas y abióticas de su nicho.

Gran parte de los estudios citados en párrafos anteriores de este apartado, han analizado las variaciones espacio-temporales de las comunidades de hongos micorrízicos asociados a diferentes especies de orquídeas. No obstante, ninguno de los trabajos consultados y citados ha establecido claramente las variaciones que tienen lugar a lo largo del ciclo de vida de una orquídea. Herrera-Rus *et al.* (2020) llevaron a cabo un estudio en un área protegida ubicada al sur de la Península Ibérica, caracterizada por una vegetación herbácea, con remanentes de lo que en su momento fue un bosque de robles. En esta zona, una de las orquídeas mejor representadas es *Anacamptis morio* subespecie *champagneuxii*, una especie cuyo ciclo de vida se encuentra fuertemente influenciado por factores climáticos como la temperatura y las precipitaciones (Herrera-Rus *et al.*, 2020). Los autores analizaron la comunidad fúngica asociada a una densa población de *A. morio champagneuxii* en tres fases de su ciclo de vida (S1: crecimiento vegetativo, S2: floración y S3: formación de frutos). Se identificaron 18 unidades taxonómicas (OTU, por sus siglas en inglés) de hongos asociadas a la orquídea durante las fases estudiadas, las que incluyeron tanto especies ectomicorrízicas como hongos endófitos asociados a raíces (RAF, del inglés *root associated endophytes*). En el caso de los hongos micorrízicos, la familia Ceratobasidaceae fue la mejor representada, estando presente en todas las fases del ciclo, mientras que *Tullasnella* sp. sólo fue aislada en S2. En el caso de los hongos RAF, la diversidad observada fue mucho mayor, detectando entre otros géneros a *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. En el caso de *Fusarium*, si bien es reconocido por ser un importante patógeno en cultivos, en orquídeas se ha visto que es capaz de promover el crecimiento de las plántulas e inhibir el desarrollo de *Escherichia coli* (Ovando *et al.*, 2005; Vaz *et al.*, 2009). *Aspergillus* y *Penicillium* por su parte, podrían facilitar el crecimiento de las orquídeas mediante la producción de metabolitos secundarios. Este estudio mostró que la dinámica de la composición de la comunidad fúngica asociada a *A. morio champagneuxii* en las diferentes etapas de su ciclo de vida, depende de los requerimientos nutricionales de la especie y de las condiciones climáticas que afectan principalmente la humedad del suelo.

En conjunto, los artículos analizados sugieren que, en la asociación hongo micorrízico-orquídea se producen modificaciones temporales causadas por alteraciones en el ambiente físico. Esto hace que se modifique la composición de las comunidades fúngicas y los requerimientos de la orquídea para enfrentar la situación de estrés y en consecuencia, se

produzca un reemplazo de las especies fúngicas asociadas a las orquídeas. No obstante, se requiere de un mayor número de estudios que analicen los tres componentes en simultáneo (orquídea-hongo-factor de estrés) para poder establecer de manera inequívoca la causa del reemplazo de especies. La drasticidad con la que podría ocurrir este recambio taxonomico de hongos endofíticos a lo largo del ciclo de una orquídea podría tener implicaciones para la germinación, ya si el hongo más compatible con la germinación de las semillas es completamente suplantado por otros que no sean compatibles con esa primera etapa del ciclo de vida de la planta. En tal caso, la ocurrencia del efecto nodriza en esas poblaciones de orquídeas quedaría en entredicho.

#### **4. Evidencias del papel de los hongos en el efecto nodriza en Orchidaceae**

En el apartado **1.2** se definió al efecto nodriza como un proceso en el que la planta facilitadora genera un micro-ambiente con condiciones favorables para la germinación de semillas y/o reclutamiento de plántulas de una especie, favoreciendo de este modo su establecimiento, desarrollo y crecimiento (Nuñez *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2008). Los estudios sobre efecto nodriza en orquídeas han demostrado que en determinados ambientes, se observa una correlación entre la abundancia de miembros de la familia Orchidaceae y la correspondiente a otros grupos de plantas. Esto estaría relacionado no sólo con las condiciones micro-ambientales generadas por la planta facilitadora (mayor humedad en suelo, menor irradiancia, protección contra viento y herbivoría, entre otros), sino principalmente por el incremento en la abundancia y diversidad de hongos micorrízicos capaces de crecer en dichas condiciones (Atala *et al.*, 2020). Se ha establecido que bajo condiciones naturales, las semillas de las orquídeas requieren de una estricta asociación con hongos micorrízicos, lo que les permite acceder a una fuente de carbono y, en consecuencia, germinar. Esta asociación se mantiene durante la fase de protocormo, dado que la incapacidad para realizar fotosíntesis durante esta etapa, les impide a las orquídeas auto-solventar la demanda de carbono (FavreGodal *et al.*, 2020). Si bien podría pensarse que los hongos micorrízicos facilitan sólo la germinación, crecimiento y desarrollo de las orquídeas, su rol va más allá de la provisión de carbono y nutrientes. Se conoce que los hongos micorrízicos también ayudan a las orquídeas a enfrentar situaciones de estrés biótico y abiótico por medio de la producción de metabolitos secundarios (Pant *et al.*, 2017). El rol crucial que desempeñan los hongos micorrízicos en la germinación y establecimiento de orquídeas ha sido analizado en numerosos estudios.

Perotto *et al.* (2014) analizaron la germinación simbiótica y asimbiótica de la orquídea terrestre mediterránea *Serapias vomeracea*. Los autores encontraron que en la germinación asimbiótica, las semillas requerían un medio nutritivo diferente al empleado en la germinación simbiótica (con *Tulasnella calospora*), mucho más rico en nutrientes. Sin embargo, a pesar de ello, los protocormos así obtenidos mostraban tasas de crecimiento inferiores y un marcado retraso en el desarrollo. Por otra parte, Herrera *et al.* (2017) en orquídeas del sur de Chile, Gao *et al.* (2020) en *Gymnadenia conopsea* y Huang *et al.* (2018) en *Dendrobium devonianum*, entre otros, mostraron que la asociación con el hongo micorrízico apropiado, incrementa considerablemente las tasas de germinación *in vitro* y formación de protocormos de estas orquídeas.

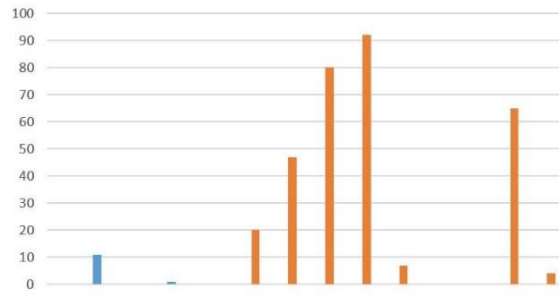
Si bien parece haber consenso acerca de la esencialidad de la asociación micorrízica, al menos para la germinación y durante el estadio de protocormo, ciertos resultados experimentales sugieren que esto no sería así para la totalidad de las especies. Es así que Rafter *et al.* (2018), al evaluar la germinación simbiótica y asimbiótica de la orquídea terrestre *Cynorkis purpurea*, observaron que esta especie parece no depender de la asociación micorrízica para la germinación *in vitro* en medios de cultivo habituales (agar harina de avena con y sin sacarosa). Mientras que las tasas de germinación simbiótica alcanzaron valores máximos de 74,0 % en la semana 12, los controles de agar harina de avena con y sin sacarosa, exhibieron valores de 96,0 % y 76,0 %, respectivamente. Sin embargo, cuando se analizó el porcentaje de plántulas que finalmente alcanzaron la fase 5 (desarrollo completo) en la semana 12, en la germinación simbiótica se detectaron valores de 69,0 %, mientras que en el caso de la germinación sin inóculo, los valores fueron de 0,0 % (medio sin sacarosa) y 39,0 % (con sacarosa). Estos resultados reflejan la importancia de la asociación con hongos micorrízicos durante el estadio de protocormo y en estadios posteriores del desarrollo. Considerando que estos resultados fueron obtenidos bajo condiciones controladas, en las cuales por ejemplo, los medios de cultivo asimbióticos suministran de una fuente de carbono, disponible para su utilización por las orquídeas, parece evidente que en condiciones naturales, la asociación con hongos micorrízicos se vuelve un factor determinante. Mediante esta interacción, las orquídeas tienen acceso a una fuente de carbono y nutrientes, que pueden ser fácilmente asimilados y empleados para la germinación y crecimiento. En concordancia con esto, los esfuerzos para reintroducir especies en peligro de extinción basados en la germinación asimbiótica *in vitro*, han tenido resultados poco alentadores cuando se los compara con aquellos que emplean germinación simbiótica. Es así que, los estudios llevados a cabo por Aggarwal *et al.* (2012) para reintroducir a *Vanda*

*coerulea* en su ambiente natural, mostraron que mediante germinación simbiótica las tasas de germinación alcanzaban valores de 96,4 % ( $\pm 3,76$  %), mientras que en condiciones control (germinación asimbiótica), estos valores se mantenían en 15,7 % ( $\pm 0,53$  %). Asimismo, las semillas sin inóculo necesitaban más tiempo para germinar y no eran capaces de continuar con el desarrollo de protocormos. Estos autores reintrodujeron en su ambiente natural 29 orquídeas obtenidas mediante germinación simbiótica y crecidas en invernadero, de las cuales 23 lograron adaptarse bien al ambiente natural, desarrollando nuevas hojas y raíces. Esto demuestra el éxito de la asociación en ambientes naturales, donde las condiciones no siempre son favorables y fluctúan a lo largo del tiempo.

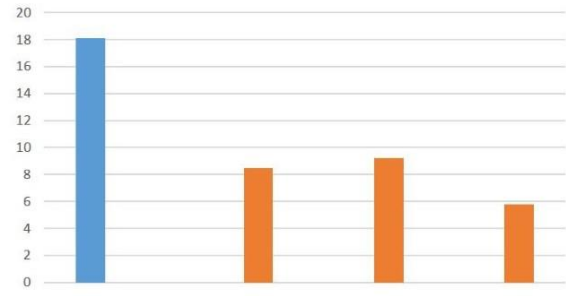
En una revisión acerca de las interacciones entre hongos micorrízicos y orquídeas del Pacífico de Chile, Herrera *et al.* (2019) analizaron las ventajas y desventajas de la germinación simbiótica y asimbiótica en proyectos de conservación. De las 72 especies que han sido identificadas hasta el momento en la región, 30 son nativas y 42 endémicas, un 14 % de ellas se encuentran en peligro de extinción, mientras que el 86 % restante se desconoce su estatus. Los autores señalan que los medios de cultivo empleados en la germinación asimbiótica (agar agua, Knudson C, Mahngren modificado, entre otros) proveen todos los nutrientes requeridos por la orquídea para germinar. Debido a las barreras físicas presentes en las semillas de este grupo de plantas, y a la elevada producción de ácido abscísico (ABA) y metabolitos secundarios, diferentes autores aconsejan obtener material de cápsulas inmaduras, donde estas barreras no se han desarrollado completamente y donde los niveles ABA no son elevados (Yeung, 2017). Si bien estos aspectos facilitan la germinación asimbiótica, cuando las plántulas así obtenidas son transplantadas a su ambiente natural, donde las condiciones ambientales son diferentes y existen numerosos factores de estrés, sólo una pequeña proporción logra establecerse y sobrevivir. Es por esto que, Herrera *et al.* (2019) sugieren que cuando la germinación asimbiótica *in vitro* sea la técnica elegida, se debe incluir un paso posterior de inoculación con hongos micorrízicos aislados de orquídeas creciendo en ambientes naturales. Esto incrementará las probabilidades de establecimiento y supervivencia de las plantas en el hábitat en el que serán introducidas. Esto incluye, de acuerdo a la literatura, no a aquellos hongos aislados de plantas co-específicas con la semillas, sino que en ocasiones hongos aislados de otras especies afines o co-ocurrentes de orquídeas pueden ser efectivos (Fig.3). Incluso, en ocasiones algunos hongos aislados de otras especies de orquídeas resultan igualmente o más “eficientes” que los “propios” (Fig. 3). Si bien esto no soporta que el efecto nodriza entre plantas adultas y semillas-protocormos-plántulas ocurra en el contexto

conespecífico, igualmente no estaría en contradicción con el propio concepto general del efecto nodriza, ya que este incluso ha sido acuñado en situaciones en las que determinadas especies

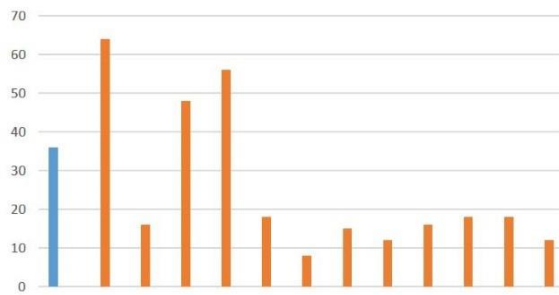
*Cynorkis purpurea* (Madagascar)



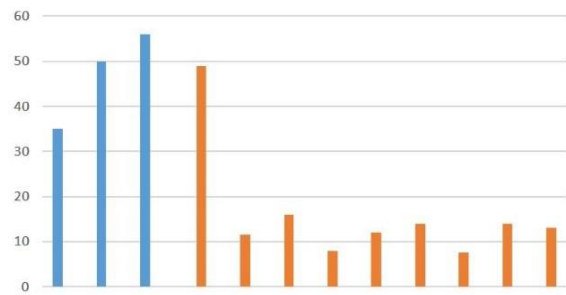
*Habenaria quinqueseta* (Florida)



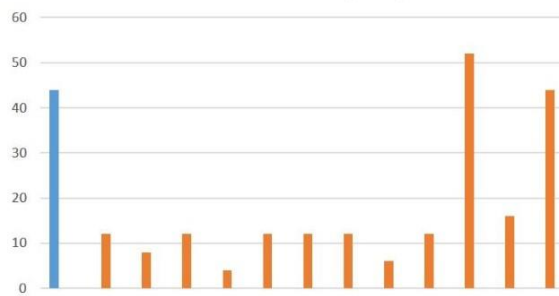
*Chloraea chrysantha* (Chile)



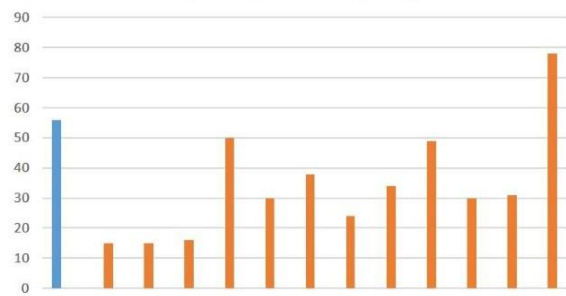
*Chloraea gavilu* (Chile)



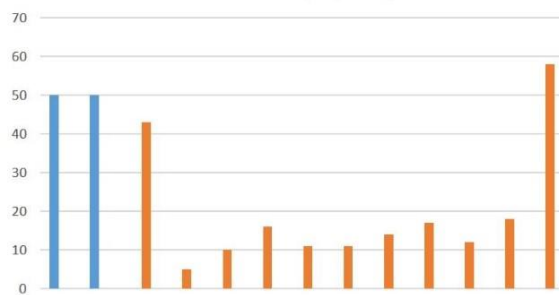
*Chlorea bletioides* (Chile)



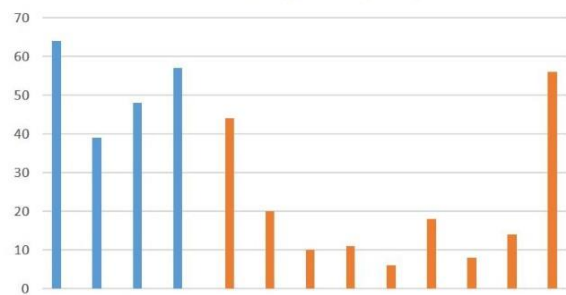
*Bipinnula frimbriata* (Chile)



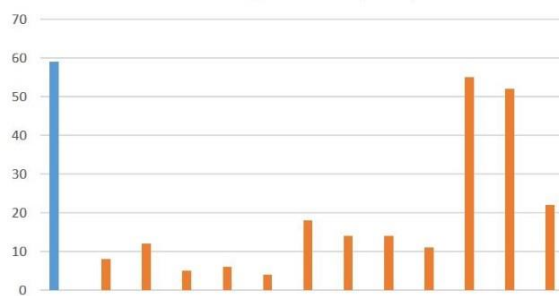
*Chloraea crispa* (Chile)



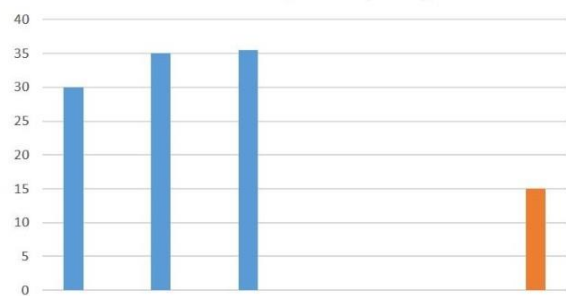
*Chloraea longipetala* (Chile)



*Chloraea grandiflora* (Chile)



*Dendrobium officinale* (China)



**Figura. 3** Porcentaje de germinación de semillas de diversas especies de orquídeas propias de varias zonas del mundo. En azul se muestra valores de porcentajes de germinación para semillas en contacto con hongos endófitos extraídos de raíces con-específicas y en naranja los valores para semillas puestas a germinar con hongos provenientes de raíces de otras especies de orquídeas de su mismo hábitat.

favorecen el establecimiento de muchas otras, un supuesto que nunca antes ha sido evaluado siquiera entre las orquídeas de acuerdo a la revisión realizada en este trabajo.

En este contexto, la existencia de un efecto nodriza, bajo un enfoque de cierta simplificación podría demostrarse de acuerdo a los siguientes dos supuestos (los cuales no serían necesariamente excluyentes):

**Supuesto 1:** A menudo, alguno(s) de los hongos presentes en el velamen radicular de orquídeas adultas es detectable también en sus protocormos (ya que esta continuidad permitiría que la planta adulta condicione la germinación de semillas en su proximidad y permita su nutrición indirecta a través del hongo que comparten).

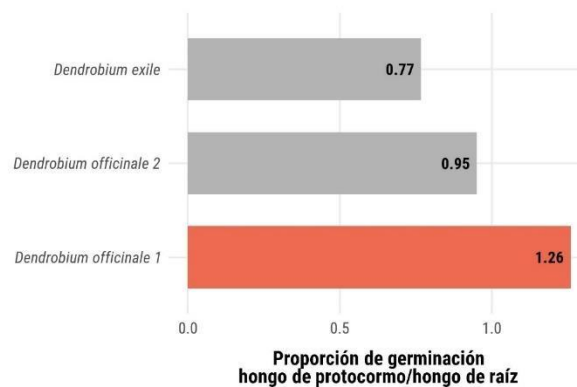
**Supuesto 2.** Si comparamos la eficiencia de la germinación de hongos micorrízicos aislados de protocormos con los aislados de raíz al menos uno o unos pocos de este último origen deberían de ser igualmente eficientes en la germinación de las semillas.

De acuerdo a nuestra búsqueda, existe una vasta evidencia del primer supuesto, ya que a menudo los experimentos de germinación simbiótica *in situ* no son muy poco exitosos cuando se realizan en zonas alejadas de las plantas adultas (McKendrick *et al.*, 2001; Zettler & Corey, 2018; Yokoya *et al.*, 2015; Jacquemyn *et al.*, 2011).

Para evaluar la veracidad del supuesto 2, en este trabajo se localizaron estudios en los que se comparara el porcentaje de germinación de semillas de una especie dada de orquídea en presencia de uno o varios hongos endófitos provenientes de protocormos *versus* uno (o varios) hongos endófitos provenientes de raíces de esa misma especie. Para esto se hizo una búsqueda con las palabras clave “orchid seed germination” “root” y se registró el valor de los porcentajes de germinación entendido como semillas que llegan a una fase de desarrollo en la que ya el embrión rompe la testa seminal. Luego se calculó la razón entre el porcentaje de germinación con hongos de raíz (numerador) y el porcentaje de germinación cuando se usan hongos aislados de protocormos. Cuando este índice sea igual a 1, significa que en promedio, los hongos provenientes de raíz son igual de eficientes en germinar las semillas de estas plantas. En cambio, valores pequeños por debajo de 1 indicarían una buena eficiencia de los hongos aislados de raíces. Lógicamente, si los hongos provenientes de los protocormos el valor del

índice tomaría valores por encima de uno (1). La representación gráfica que integra estos tres estudios (Fig. 4) nos muestra tres situaciones que, en efecto, dada la poca información encontrada nos muestra que los casos arriba mencionados están presentes en la naturaleza y que pueden variar incluso en una misma especie (en este *Dendrobium officinale*)

Curiosamente, a pesar de que muchos autores defienden al criterio de que los hongos procedentes de protocormos suelen ser más eficientes promoviendo la germinación de las semillas (Yokoya *et al.*, 2015), fueron muy escasos los trabajos disponibles que lo exploran experimentalmente (Meng *et al.* 2019; Zhang *et al.*, 2020, Wang *et al.* 2021). Estos tres ejemplos provienen de apenas dos especies de orquídea del género *Dendrobium* y muestran tres situaciones bien discretas.



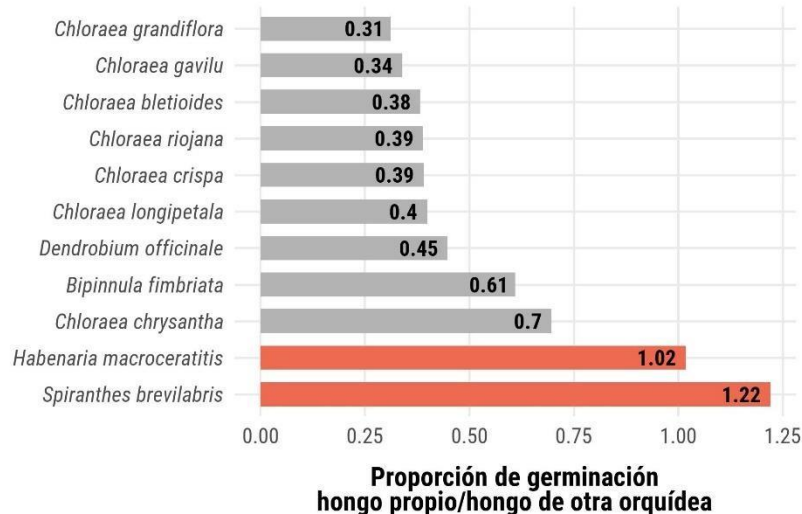
**Figura 4.** Comparación del comportamiento de tres experimentos de germinación en especies de *Dendrobium* que reportan el porcentaje de germinación que se logra en presencia de hongos endofíticos aislados de protocormo versus hongos endofíticos aislados de raíz de plantas adultas.

Adicionalmente, dado que el efecto nodriza mediado por hongos, tal y como se presenta en otros estudios fuera de la familia Orchidaceae (Pérez, 2008; Marañón *et al.* 2004; Lasso *et al.* 2015) involucra tanto conexiones o relaciones benéficas entre plantas conespecíficas como heteroespecíficas, sería interesante explorar más a fondo si los hongos endofíticos provenientes de raíces con-específicas son en promedio más o menos eficientes en la germinación de esa misma especie de orquídea en relación a hongos endógenos provenientes de raíces de otras plantas. Debido a esto, nos propusimos explorar si el efecto nodriza es mayor en presencia de hongos ya asociado a sus raíces en comparación con hongos procedentes de otra especies (todas ellas orquídeas). Para este ejercicio se procedió como se describe arriba para la comparativa en eficiencia para la germinación de hongos procedentes de protocormo versus hojas de raíces con específicas. Los resultados muestran que la mayoría de especies presentaron valores del

índice de eficiencia por debajo de 1. (Fig. 5) Esto sugiere que la mayoría de especies de orquídeas germinan mejor con hongos endófitos presentes en sus propias raíces.

Esto último podría explicar el carácter ubíquo e incluso de algunas especies de orquídeas tales como *Oeceoclades maculata*, *Arundina graminifolia*, *Spathoglottis plicata*, *Phaius tankevilliae*, etc. en las que se detecta una elevada plasticidad en la asociación con hongos lo que en algunos casos incluye aquellos capaces de permitir su germinación, por ejemplo, en bosques neotropicales como los de Puerto Rico los descomponedores son el gremio de hongos dominante y las orquídeas capaces de explotarlos pueden tener dicha ventaja adaptativa (Bayman *et al.* 2016).

Para el caso de *O. maculata*, los autores Bayman *et al.* (2016) sugieren que puede ser muy específica para un sólo hongo micorrízico en la etapa de germinación de la semilla, pero muy promiscua para los hongos micorrízicos como plantas adultas. Este patrón es explicado posteriormente con que las semillas son obligatoriamente micorrizas, mientras que las plantas adultas son facultativas, es decir, que la planta puede sobrevivir sin micorrizas.



**Figura 5.** Comparación para doce especies de varias partes del mundo de la eficiencia relativa de los hongos extraídos de orquídeas alo-específicas en la germinación de las orquídeas de interés (eje y). Aquellas especies que superan el valor de 1 para el índice presentan una gran amplitud ecológica que en promedio le permite germinar con uno o varias especies de hongos provenientes de otras especies de orquídeas.

## 5. Interacción hongo-orquídea y diversificación: MAR de orquídeas

La familia Orchidaceae constituye un grupo de plantas muy bien adaptado a condiciones desfavorables, que ha sido capaz de colonizar de manera exitosa prácticamente todos los

ambientes (Tsai *et al.*, 2017). La aparición de las orquídeas habría ocurrido durante el Cretácico tardío (76 millones de años atrás), logrando atravesar la extinción masiva que tuvo lugar durante el período Jurásico (Cai *et al.*, 2015). Gran parte de las orquídeas que han sido descritas hasta el día de hoy, poseen poblaciones de pequeño tamaño, disjuntas y con un elevado potencial de dispersión, dadas las características de sus semillas (reducido tamaño “*dust like*”, que les permite ser fácilmente dispersadas por el viento) (Arditti & Ghani, 2000). La gran diversidad que caracteriza a esta familia, podría ser el resultado de la combinación entre una fuerte deriva génica y la acción de la selección natural (Tremblay *et al.*, 2005; Vanden Broeck *et al.*, 2014). No obstante, autores como Phillips *et al.* (2012) sugieren que la gran diversidad observada en este grupo de plantas se explica por procesos de dispersión a largas distancias y fenómenos de adaptación local.

La existencia de comunidades estables, que persisten a través del tiempo, puede ser explicada con base a la estructura y a las múltiples interacciones que se constituyen entre las diferentes especies que componen dichas comunidades (Bascompte, 2010; Jacquemyn *et al.*, 2015). Las relaciones que se establecen entre las diferentes especies que componen una comunidad, conforman una red de interacciones que son muy importantes en términos ecológicos, y que determinan la riqueza de especies de dicha comunidad. A grandes rasgos, es posible identificar dos tipos de redes de interacción: mutualistas y antagónicas (Jacquemyn *et al.*, 2015). En las redes de interacción mutualista, las especies especialistas interactúan con generalistas, mientras que las generalistas interactúan tanto con especialistas como con generalistas, lo que da lugar a estructuras de tipo anidadas (Bascompte *et al.*, 2003). Este tipo de estructuras se caracterizan por una asimetría en la relación de dependencia entre especies, es decir, mientras las especialistas dependen fuertemente de las generalistas, las generalistas son independientes (Vázquez & Aizen, 2004). Las especies mutualistas presentan una elevada plasticidad de interacción, lo que les permite modificar sus interacciones cuando la composición de la comunidad cambia, dando lugar a comunidades más diversas (Sobral & Magrach, 2019). Por su parte, en las redes de interacción antagónicas, el número de interacciones efectivamente establecidas es mucho menor que el total de interacciones que potencialmente podrían establecerse (Thébault & Fontaine, 2010). Esto da lugar a comunidades con estructura modular en las que las especies presentan baja plasticidad de interacción (Barbosa *et al.*, 2017; Sobral & Magrach, 2019). Se suele afirmar que esta compartimentalización evita que las perturbaciones se propaguen, salvo en aquellos casos en los cuales se produce la extinción de una especie que conecta dos módulos diferentes (Stouffe

& Bascompte, 2011). En el caso de las asociaciones entre hongos micorrízicos y orquídeas, el miembro fúngico es completamente independiente, mientras que las orquídeas muestran una dependencia estricta en fases críticas del ciclo de vida, como lo son la germinación y el estadio de protocormo. Los resultados obtenidos por diferentes investigaciones, en las que se observa que especies de orquídeas que coexisten tienden a estar separadas espacialmente y a interactuar con diferentes especies fúngicas, permite inferir que en este tipo de comunidades, las redes de interacciones se dividen en compartimentos con bajo nivel de solapamiento (Jacquemyn *et al.*, 2012a, 2012b, 2014, 2015).

Basándose en el hecho de que en las comunidades con estructura modular, el número de interacciones que se establecen es mucho menor que el que potencialmente podría establecerse y en que la compartimentalización reduce el riesgo de extinción, es posible pensar que este tipo de estructuras es la que caracteriza a las comunidades de orquídeas-hongos micorrízicos. Con el objetivo de caracterizar la estructura de la comunidad y la red de interacciones establecidas en un área caracterizada por una elevada diversidad de especies, y en particular de orquídeas, Jacquemyn *et al.* (2015) estudiaron 20 orquídeas terrestres que coexisten en prados naturales de la región Mediterránea, junto a las especies fúngicas asociadas. Las 20 especies analizadas pertenecen a cinco géneros diferentes: *Anacamptis*, *Neotinea*, *Orchis*, *Ophrys* y *Serapias*. Los autores encontraron que los grupos de hongos micorrízicos mejor representados en esta comunidad son Ceratobasidaceae y Tulasnellaceae, con una menor proporción de miembros del grupo Telephoraceae. Al analizar la arquitectura de la red de interacciones establecidas entre hongos y orquídeas, detectaron un carácter predominantemente modular, que no estaría dado por barreras ecológicas como sucede en otras comunidades. Se identificaron muy pocas especies de hongos generalistas, con una elevada proporción de especies periféricas (87,1 %), lo que se traduce en una falta de interacciones de tipo generalista-generalista. Los nueve módulos identificados no se encuentran completamente aislados, sino que existen especies que actúan como conectores y que hacen que estos compartimentos funcionen como una red mejor conectada. Por otra parte, se observó que la abundancia de hongos micorrízicos es máxima en las proximidades de las orquídeas y que decrece a medida que aumenta la distancia. De acuerdo con los autores, la alta especificidad de la asociación y la consecuente restricción en la distribución espacial de los hongos micorrízicos (en las cercanías de plantas adultas de orquídeas), incrementaría la fuerza de la interacción entre hongos micorrízicos y orquídeas, y contribuiría al carácter modular y asimétrico de la red. La especificidad de la interacción podría ser una estrategia que le permite a las orquídeas garantizar la germinación y aumentar las

probabilidades de supervivencia en ambientes desfavorables, al tiempo que podría disminuir la competencia entre orquídeas por los mismos recursos (Jacquemyn *et al.*, 2015).

Se considera que las interacciones de tipo mutualista tienen un fuerte impacto en la evolución y en la coexistencia de especies (Waterman *et al.*, 2011; Suárez *et al.*, 2016). Este tipo de interacciones por un lado determinan el origen de las especies, mediante un efecto directo en la especiación (*i.e.* aislamiento reproductivo o ecológico), y por el otro favorecen el mantenimiento de la diversidad, a través de un efecto sobre el ensamble de especies de las diferentes comunidades (Kottke *et al.*, 2013). En el caso de las orquídeas, las dos interacciones más importantes son aquellas con hongos micorrízicos y con polinizadores (Waterman *et al.*, 2011). Con el objetivo de poner a prueba la hipótesis de que los hongos micorrízicos actúan como factores que conducen a la especiación del género *Teagueia*, Suárez *et al.* (2016) realizaron un estudio en un área localizada en la provincia de Tungurahua, ubicada en la zona centro de Ecuador. El género *Teagueia* constituye un excelente ejemplo de radiación evolutiva local, en el que 26 especies identificadas recientemente comparten caracteres florales y vegetativos, los cuales no están presentes en las seis especies descritas previamente (Jost, 2004). Los autores encontraron que las diferentes morfo-especies del género evaluadas, se asocian con hongos pertenecientes a los grupos Tulasnellaceae y Atractiellales, ambos de distribución global (cosmopolitas). La asociación con hongos micorrízicos sería un factor clave para la coexistencia de especies cercanamente emparentadas. Los resultados de Suárez *et al.* (2016) apoyan la visión de Kottke *et al.* (2013) de que la co-existencia de especies de orquídeas cercanas en la filogenia, es promovida cuando dichas especies se asocian al mismo tipo de hongo micorrízico, lo que al mismo tiempo permite mantener la diversidad de las comunidades a las cuales dichas especies pertenecen.

Estudios desarrollados en diferentes regiones del mundo, han indicado que en especies de orquídeas que coexisten en un mismo hábitat, se detectan diferencias significativas en las comunidades de hongos micorrízicos con las cuales cada especie interactúa, y que esto es lo que permite el mantenimiento de la diversidad (Jacquemyn *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2019). El éxito en la germinación de una semilla de orquídea parece tener una relación inversa con la distancia a la que se encuentra la comunidad de hongos micorrízicos con la cual la orquídea se asocia (Waud *et al.*, 2016). Chen *et al.* (2019) estudiaron las asociaciones con hongos micorrízicos establecidas por siete especies simpátricas de orquídeas que coexisten en un área

montañosa de Beijing (China). Los autores observaron que en general, estas especies se asocian a diferentes grupos de hongos micorrízicos, mostrando diferentes grados de especificidad.

Estos resultados apoyan la idea de que los hongos micorrízicos representan un factor muy importante que conduce a la partición del nicho en orquídeas terrestres y por ende, favorece la coexistencia de especies. Por otra parte, cuando construyeron la red de interacciones y midieron la fuerza de la señal filogenética, observaron una señal débil (no significativa) en ambos grupos.

El hecho de que más de un tipo de hongo sea capaz de interactuar con una misma especie de orquídea, hace difícil la tarea de dilucidar y comprender los mecanismos que subyacen a la selección del simbionte y al establecimiento de la asociación (Xing *et al.*, 2017). Durante la última década, diferentes estudios han señalado que en interacciones mutualistas y antagónicas, es posible detectar una importante señal filogenética (Wiens *et al.*, 2010). En el caso particular de las orquídeas, los diferentes tipos de hongos que interactúan con una misma especie parecen estar emparentados filogenéticamente (Martos *et al.*, 2012). Para comprender la influencia de la selección del hongo micorrízico con el cual una orquídea se asocia en la evolución, Xing *et al.* (2017) estudiaron una comunidad de orquídeas del género *Dendrobium* creciendo en la provincia de Yunnan, ubicada al suroeste de China. El grupo de hongos dominante en esta comunidad, cuya asociación se confirmó para siete de las ocho especies evaluadas, fue Tulasnellaceae. Dentro de este grupo, los miembros mostraron un elevado grado de especificidad por la orquídea con la cual se asocian, lo que apoya la hipótesis de que en comunidades en las cuales coexisten diferentes especies de orquídeas, se requiere de diferentes tipos de hongos para asegurar la supervivencia de todas ellas (McCormick & Jacquemyn, 2014). De manera similar a lo observado por Suárez *et al.* (2016) para el género *Teagueia*, los autores encontraron que aquellas especies de *Dendrobium* más cercanas en la filogenia se asocian con comunidades de hongos micorrízicos más similares. A diferencia de Chen *et al.* (2019), la señal filogenética de la orquídea en la interacción *Dendrobium*-Tulasnellaceae fue significativa, indicando que el grado de parentesco entre las diferentes especies de *Dendrobium* tiene un fuerte efecto en las asociaciones que se conforman. Estos autores señalan la importancia de realizar estudios posteriores en los que se compare la composición de las comunidades micorrízicas empleando la función ecológica como criterio de evaluación. Esto permitiría explicar cómo ha sido la evolución de la selección del endófito en la familia Orchidaceae.

Es un hecho bien establecido que los hongos micorrízicos son un elemento crucial en el ciclo de vida de una orquídea. De no ser por este “filtro natural”, que hace que de los miles de semillas producidas por una planta, sólo algunas de ellas sean capaces de germinar y establecerse, viviríamos inmersos en un mundo dominado por orquídeas (Schiff, 2018). Asimismo, se ha sugerido que la evolución en los modos de nutrición de este grupo de plantas, estaría relacionado con un cambio en el miembro fúngico con el cual las especies autótrofas se asociaban (*Rhizoctonia*), lo que dió lugar a la emergencia de la heterotrofía dentro de este grupo (Hynson *et al.*, 2013). Los diferentes estudios hasta aquí analizados, proveen evidencia a favor de que los hongos micorrízicos tienen un impacto en la diversidad de orquídeas que componen una comunidad. La diversidad de orquídeas parece verse favorecida por la diversidad y abundancia de hongos micorrízicos presentes en un sitio, y por la conformación de diferentes asociaciones, lo que lleva a la partición del nicho y a una ya mencionada disminución de la competencia por los recursos. Sin embargo, si bien se ha propuesto que los hongos micorrízicos serían factores que conducen la evolución de las orquídeas, promoviendo eventos de especiación, la evidencia obtenida hasta el momento es poco concluyente. Esto señala la importancia de realizar nuevos estudios que aborden esta temática y que permitan dar respuesta a las interrogantes planteadas.

## **6. Aplicaciones del efecto nodriza en orquídeas para la Ciencia y la Horticultura.**

El conocimiento obtenido a partir del estudio del efecto nodriza en la familia Orchidaceae ha tenido un gran impacto en el campo de la ciencia, principalmente en el área de la conservación. La relación que se establece entre especies facilitadoras y su contraparte, la especie beneficiaria, ha sido extensamente utilizado en planes de restauración, a fin de revertir la situación de diferentes poblaciones vegetales (Jacquemyn *et al.*, 2015). Es por esto que, el estudio de cada una de las especies involucradas, así como de las características y dinámica de la interacción, resultan clave para el desarrollo de planes exitosos. En el caso de las orquídeas, el conocimiento detallado del hongo en interacción con el cual la germinación de la especie es exitosa, así como de aquellos hongos con los cuales se asocian en estadios posteriores, ha permitido importantes avances en la reintroducción de especies de orquídeas amenazadas en sus ambientes naturales (McCormick *et al.*, 2006). Esto ha hecho factible plantear diferentes proyectos de restauración, que no sólo posibilitan revertir la situación en la que se encuentran diferentes especies de orquídeas (baja preocupación, próxima a estar amenazada, vulnerable,

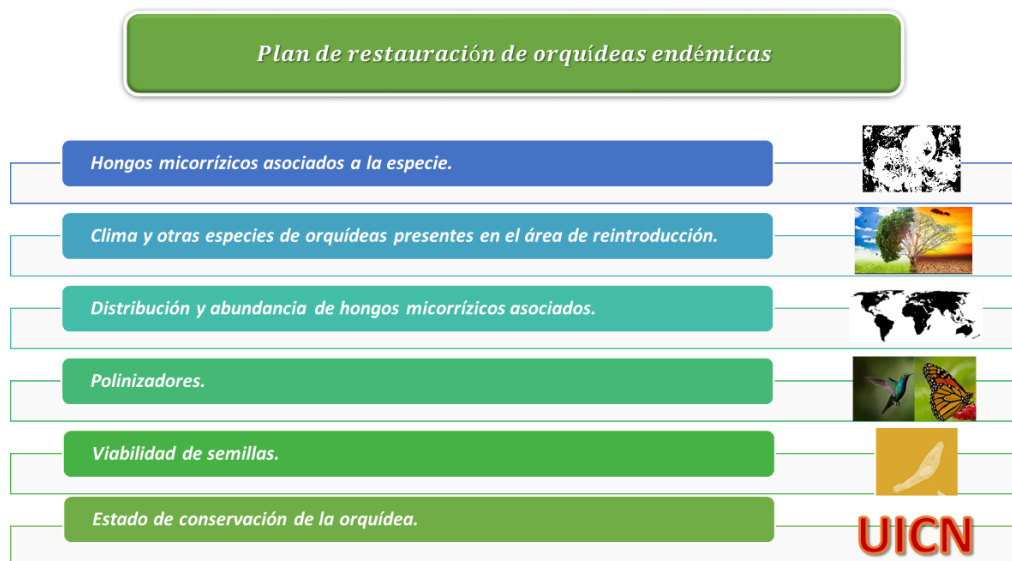
en peligro de extinción, en peligro crítico, extinta en la naturaleza, o extinta), sino también la de las especies con las cuales estas orquídeas interactúan.

A nivel mundial, tal como sucede con otras familias, las diferentes especies de orquídeas se encuentran constantemente amenazadas por factores como el cambio climático, la abundancia de hongos micorrízicos compatibles, la segregación de poblaciones a pequeñas áreas protegidas y el interés económico que por ellas exista (Waud *et al.*, 2016b; Herrera *et al.*, 2019).

Poco se sabe acerca de la comunidad fúngica asociada a este grupo de plantas y en particular, para las especies endémicas (especies de distribución restringida a un territorio determinado), se desconoce cuáles son los modos de nutrición (autótrofas, mixótrofas o mico-heterótrofas) y aún no han sido desarrollados proyectos exitosos de reintroducción en ambientes naturales (Pereira *et al.*, 2014; Herrera *et al.*, 2017; 2019). Es por esto que la diversidad de orquídeas y su tendencia a hibridar han propiciado una industria hortícola que genera interesantes sumas al año, sin embargo, parecen estar limitados por las malas tradiciones hortícolas y/o los altos costos de esta industria, dado que para reemplazar el papel de los hongos micorrízicos, se utiliza un medio rico propenso a las contaminaciones (Bayman, 2012).

Si bien, las condiciones son asépticas y estrictamente controladas, es inevitable la pérdida sustancial de cultivos en su fase *ex vitro* dado que las plántulas sufren enfermedades (debido a una primera exposición abrupta a la microbiota ambiental) y estrés fisiológico (debido a la mayor fluctuación climática fuera del matraz) (Chang, *et al.* 2007). Esta situación suele revertirse abusando de los productos químicos y la energía, lo que hace que esta industria sea insostenible (Bayman, 2012). En este sentido, un método de cultivo simbiótico *ex vitro* séptico es un enfoque más económico y sostenible. Este método utiliza subproductos ricos en celulosa como medio alternativo, lo que permite reciclar desechos contaminantes y evita el uso de fibras naturales que proceden de plantas en peligro de extinción tales como ciertos helechos, musgos, etc (Joosten, *et al.* 2016 & Mosquera-Espinosa, *et al.* 2012).

Adicionalmente, se realiza la revisión del diseño de un programa de restauración de orquídeas endémicas, el cual debe tener en cuenta seis aspectos principales (**Figura 6**):



**Figura 6.** Principales aspectos a considerar en un plan de reintroducción de orquídeas endémicas (adaptado de Herrera *et al.*, 2019).

El primer aspecto hace referencia al conocimiento de cada uno de los hongos con los cuales la orquídea interactúa en las diferentes etapas de su ciclo de vida. Es decir, se debe conocer el miembro fúngico al cuál la orquídea se asocia para lograr germinar, y en estadios posteriores para el crecimiento. Para identificar a cada uno de estos hongos, se recurre a las ya mencionadas técnicas de trampas de semillas y aislamiento a partir de raíces. Este primer aspecto se vincula con el tercero, ya que se ha observado que en la naturaleza, uno de los principales factores que limitan la abundancia y distribución de orquídeas, es la abundancia y distribución de hongos micorrízicos compatibles (Winkler *et al.*, 2009). En relación al segundo aspecto, es importante tener en cuenta cuáles son las condiciones ecológicas que caracterizan al ambiente en el cual la orquídea será reintroducida, cuáles son las especies que co-existen en dicho ambiente, qué factores de estrés están presentes. Otros puntos importantes a considerar son la presencia de polinizadores, los cuales son necesarios para que tenga lugar la fecundación y en consecuencia la formación de frutos, y la viabilidad de las semillas formadas, ya que una baja viabilidad de semillas dará lugar a bajas tasas de germinación. Finalmente, pero quizá más importante a la hora de plantear un plan de reintroducción, es tener en cuenta el estatus de la orquídea, ya que para prevenir la extinción de especies endémicas, es esencial comenzar a diseñar planes de reintroducción que incluyan el trabajo con la especie antes de que se encuentre bajo amenaza de extinción (Herrera *et al.*, 2019).

Un aspecto fuertemente relacionado con los tópicos planteados en el presente apartado, es la creación de bancos de semillas o germoplasma. Esto ha sido mencionado en varias de las publicaciones analizadas. En este sentido, se señala la importancia que tiene en el diseño de proyectos exitosos de reintroducción de especies, el desarrollo de técnicas estandarizadas que incluyan el depósito de hongos micorrízicos en colecciones ubicadas en diferentes centros de investigación y de semillas en bancos de semillas (Herrera *et al.* 2019). Esto permitiría conservar el material correspondiente a diferentes especies de orquídeas, el que eventualmente podría ser utilizado, en caso de ser necesario, cuando se llega al punto de la extinción de una especie. Es así que muchas instituciones están haciendo uso de técnicas como la criopreservación de semillas e incluso protocormos, para conservar de manera segura, eficiente y costo-efectiva el material correspondiente a especies actual o potencialmente amenazadas (González-Arno *et al.*, 2020).

## **7. Nuevas líneas de investigación y retos en el estudio del efecto nodriza en orquídeas.**

Durante los últimos años, se han llevado a cabo diferentes estudios que han indagado acerca de la importancia de los hongos micorrízicos en la germinación y establecimiento de las orquídeas. Se ha establecido que en su rol de facilitador, el hongo micorrízico provee de una fuente de carbono, agua y nutrientes a la orquídea, al tiempo que promueve su capacidad para sobrellevar situaciones adversas: situaciones de estrés abiótico como una sequía o biótico, como la incidencia de algún fitopatógeno (Pant *et al.*, 2017). En este contexto, la incorporación de técnicas moleculares representó un fuerte impulso para esta temática, ya que posibilitó la identificación y caracterización del miembro fúngico involucrado en esta intrigante asociación. Por su parte, la aplicación de estudios de isótopos estables, brindó información muy valiosa acerca del tipo de nutrición característica de cada orquídea, el grado de dependencia respecto al miembro fúngico y las aportaciones nutricionales de cada miembro a la asociación. Este conocimiento, en conjunto con la información obtenida mediante estudios filogenéticos, permitió establecer el orden evolutivo en el que se sucedieron los modos de nutrición, desde una autotrofia basal a una mixotrofia y finalmente, una mico-heterotrofia total. El desarrollo de medios de cultivo apropiados, capaces de cubrir los requerimientos de la orquídea y/o del hongo micorrízico asociado, permitió la multiplicación a mayor escala de diferentes orquídeas, impulsando el planteamiento de diversos proyectos de reintroducción de especies actual o potencialmente amenazadas. No obstante, son muchos los interrogantes que aún continúan sin

respuesta: ¿cuál es el mecanismo que subyace a la elección del hongo micorrízico con el cual una determinada especie de orquídea se asocia?, ¿existe algún tipo de señal entre ambos miembros que aún no ha sido identificada?, ¿por qué no se asocia con otros hongos?, ¿qué determina el recambio del socio fúngico?, ¿se trata simplemente de una modificación en los requerimientos de la orquídea?, ¿cuáles son los beneficios concretos para el hongo?, ¿qué factores determinan realmente la ocurrencia de la sucesión fúngica?. Estos y otros interrogantes, constituirán el punto de partida de futuras investigaciones, cuyos resultados permitirán avanzar en la comprensión de una de las familias más enigmáticas del reino Plantae.

## **8. Algunas consideraciones finales**

A partir de esta revisión, consideramos que debido a la complejidad de la taxonomía y la sistemática de los hongos (sobre todo por lo complicado de establecer una conexión clara entre la identidad de los teleomorfos y anamorfos de una misma entidad fúngica), a la gran diversidad de hongos que viven endofíticamente y a las diversas funciones o efectos que estos organismos pueden tener para las diferentes fases del ciclo de vida de las orquídeas, es altamente recomendable explorar una combinación de métodos diagnósticos (molecular, experimental y morfo-descriptiva) en estudios funcionales sobre la interacción orquídea-hongo.

Muchos estudios sobre hongos asociados a las orquídeas (incluidos ensayos de germinación simbiótica) siguen un protocolo que podría ser circular en su diseño experimental ya que usualmente se descartan y casi nunca (o nunca) llegan a ser utilizados en los ensayos de germinación aquellos hongos que no cumplan con las características de los llamados hongos tipo *Rhizoctonia* y otros ya tradicionalmente asociados a la micorrización con orquídeas. De este modo, podríamos estar impidiendo que el rol de otros grupos de hongos para con determinados grupos de orquídeas pueda ser conocido y empleado en el estudio y conservación de estas interacciones.

Por último, debido a la urgencia de formas de manejo amigable con la diversidad de orquídeas en peligro se requiere un mayor esfuerzo de muestreo y exploración de la enorme diversidad de relaciones entre dos tipos de organismos, lo cual es especialmente crítico en los trópicos donde la diversidad de ambos grupos es mayor, y por tanto se espera que su impacto en la conservación de la biodiversidad sea mucho más decisivo.

## 9. Conclusiones

- 1- Las plantas adultas de una comunidad de orquídeas muy probablemente ejercen un efecto nodriza sobre las semillas y plántulas de orquídeas a través de las redes miceliales que se establecen entre ellas por el interior y superficie de los sustratos y troncos de los diversos ecosistemas.
- 2- El hábito trófico de las orquídeas se encuentra intrínsecamente ligado al hábito de vida y la identidad taxonómica de sus hongos endofíticos lo que les permite habitar en ambientes que varían dramáticamente en aspectos como disponibilidad lumínica, calidad nutricional de los suelos y sustratos, entre otros.
- 3- De acuerdo a lo reportado en la literatura el efecto nodriza vía la red micelial en orquídeas no sólo permitiría el establecimiento y la alimentación indirecta de protocormos y plántulas de la misma especie sino que podría también favorecer un incremento progresivo de la diversidad de orquídeas mediante una promoción del reclutamiento heteroespecífico.
- 4- El efecto nodriza podría ser un factor de cambio para una producción de orquídeas ambientalmente más sana y económicamente más sustentable, con aplicaciones prometedoras en el cultivo, comercio y conservación de este grupo de plantas.

## 10. Referencias

- Ackerman, J. D., & Lauri, R. K. (2018). *Piperia cooperi*. In J. F. (eds.), *Jepson eFlora*.
- Adhikari, Y. P., Fischer, A., & Fischer, H. S. (2016). Epiphytic orchids and their ecological niche under anthropogenic influence in central Himalayas, Nepal. *Journal of Mountain Science*, 13, 1-11. doi:10.1007/s11629-015-3751-z
- Adhikari, Y. P., Fischer, H. S., & Fischer, A. (2012). Host tree utilization by epiphytic orchids in different land-use intensities in Kathmandu Valley, Nepal. *Plant Ecology*, 213, 1393–1412. doi:10.1007/s11258-012-0099-0
- 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, 33–42.
- Arditti, J., & Ghani, A. K. (2000). Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145(2), 367-421.

- Arredondo-Núñez, A., Badano, E. I., & Bustamante, O. (2009). How beneficial are nurse plants? A meta-analysis of the effects of cushion plants on high-Andean plant communities. *Community Ecology*, *10*(1), 1-6. doi:10.1556/ConEc.10.2009.1.1
- Atala, C., Baldelomar, M., Torres-Díaz, C., Pereira, G., Cacciuttolo, F., Vargas, R., & Molina-Montenegro, M. A. (2020). Positive interaction between shrubs and native orchids in a Mediterranean ecosystem. *Brazilian Journal of Botany*, *43*, 1025–1036. doi:10.1007/s40415-020-00664-x
- Baldelomar, M., Molina, M. (2018). Interacciones positivas como determinantes del establecimiento y desempeño de orquídeas en la zona mediterránea de Chile central. Universidad de Talca (Chile). Instituto de Ciencias Biológicas.
- Bao, X.-S., Shun, Q.-S., & Chen, L.-Z. (2001). *The medicinal plants of Dendrobium (SHI-HU) in China*. Shanghai: Fudan University Publisher and Shanghai Medical University Publishing House,.
- Barbosa, M., Fernandes, G. W., Lewis, O. T., & Morris, R. J. (2017). Experimentally reducing species abundance indirectly affects food web structure and robustness. *The Journal of Animal Ecology*(86), 327-336.
- Barretta Dos-Santos, L. Sant'Ana1, A., Petini-Benelli, Pedroso-De-Moraes, C. (2015) Root anatomy of galeandra leptoceras (orchidaceae). *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, vol. 15, núm. 2, agosto, 2015, pp. 159-165
- Bascompte, J. (2010). Structure and dynamics of ecological networks. *Science*, *329*, 765–766.
- Bascompte, J., Jordano, P., Melian, C. J., & Olesen, J. M. (2003). The nested assembly of plant-animal mutualistic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*(100), 9383–9387.
- Bayman, P. 2012. Growing epiphytic orchids from seed: a simple, nonsterile, symbiotic method. *Orchids* 81: 564-567.
- Bayman, P., & Otero, J. T. (2006). Microbial endophytes of orchid roots. In B. Schulz, C. Boyle, & T. N. Sieber, *Microbial root endophytes, soil biology* (pp. 153–177). Berlin: Springer.

- Bayman, P., Mosquera-Espinosa, A.T., Saladini-Aponte, C.M., Hurtado-Guevara, N.C. and Viera-Ruiz, N.L. (2016), Age-dependent mycorrhizal specificity in an invasive orchid, *Oeceoclades maculata*. *American Journal of Botany*, 103: 1880-1889. <https://doi.org/10.3732/ajb.1600127>
- Cai, J., Liu, X., Vanneste, K., Proost, S., Tsai, W.-C., Liu, K.-W., . . . Liu, Z.-J. (2015). The genome sequence of the orchid *Phalaenopsis equestris*. *Nature Genetics*, 47(1), 65–72. doi:10.1038/ng.3149
- Cameron, D. D., Leake, J. R., & Read, D. J. (2006). Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant–fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid. *New Phytologist*, 171, 405–416.
- Castro, J., Singer, R. (2019) A literature review of the pollination strategies and breeding systems in Oncidiinae orchids. *Acta Bot. Bras.* doi: 10.1590/0102-33062019abb011
- 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, 225–232. doi:10.1007/s00572-016-0746-8
- Chang DCN, Chou LC, Lee GC. 2007. New cultivation method for *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Orchid Science and Biotechnology* 1:56-60.
- Chen, Y., Gao, Y., Song, L., Zhao, Z., Guo, S., & Xing, X. (2019). Mycorrhizal fungal community composition in seven orchid species inhabiting Song Mountain, Beijing, China. *Science China Life Sciences*, 62, 838–847.
- Chihiro, M., Katsushi, Y., Ryohei, M., Tatsuki, Y., Masako, F., Takahiro, Y., Haruko, I., Masahide, Y., Shuji, S., Hironori, K. (2018) The Mycoheterotrophic Symbiosis Between Orchids and Mycorrhizal Fungi Possesses Major Components Shared with Mutualistic Plant-Mycorrhizal Symbioses
- Clark, C. J., Poulsen, J. R., Levey, D. J., & Osenberg, C. W. (2007). Are plant populations seed limited? A critique and meta-analysis of seed addition experiments. *American Naturalist*, 170, 128–142.
- Conservation Assessment Management Plan (CAMP). (2001). Endemic orchids of Western Ghats. In C. Sathishkumar, B. V. Shetty, S. S. Bennet, T. Ananda Rao, S. Molur, & N. (. Sally, *Report of conservation assessment and management plan workshop*. (p. 83).

- Coimbatore: Wildlife Information Liaison Development Society. Zoo Outreach Organization.
- Costa-Joca, T. A. (2011) Chemical composition of cell walls in velamentous roots of epiphytic Orchidaceae. DOI: 10.1007/978-3-642-20332-9\_11
- Cribb, P. J., Kell, S. P., Dixon, K. W., & Barrett, R. L. (2003). Orchid conservation: a global perspective. In *Orchid conservation* (pp. 1-24). Kota Kinabalu: Natural History Publications.
- Darwin, C. R. (1877). The various contrivances by which orchids are fertilized by insects.
- De la Orden, E. A. (2020). La Sucesión Ecológica. *Editorial Científica Universitaria*, 1-20.
- Dearnaley, J. D. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17, 475–486. doi:10.1007/s00572-007-0138-1
- Dearnaley, J. D., & Cameron, D. D. (2017). Nitrogen transport in the orchid mycorrhizal symbiosis – further evidence for a mutualistic association. *New Phytologist*, 213, 10–12.
- Dearnaley, J. D., Martos, F., & Selosse, M.-A. (2012). Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. In B. (. Hock, *Fungal Associations* (pp. 207–230). Berlin: Springer.
- Decruse, S. W., Reny, N., Shylajakumari, S., & Krishnan, P. N. (2013). In vitro propagation and field establishment of *Eulophia cullenii* (Wight) Bl., a critically endangered orchid of Western Ghats, India through culture of seeds and axenic seedling-derived rhizomes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49, 520–528. doi:10.1007/s11627013-9521-0
- Djordjević, V., & Tsiftsis, S. (2020). The role of ecological factors in distribution and abundance of terrestrial orchids. In J.-M. Mérillon, & H. (. Kodja, *Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture*, (pp. 1-71). Cham: Springer. doi:10.1007/978-3-030-11257-8\_4-1
- Djordjevic, V., Tsiftsis, S., Lakusic, D., Jovanovic, S., Jacovljevic, K., & Stevanovic, V. (2020). Patterns of distribution, abundance and composition of forest terrestrial orchids. *Biodiversity and Conservation*, 29, 4111–4134. doi:10.1007/s10531-020-02067-6

- Dutra, D., Kane, M., & Richardson, L. (2009). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *96*, 235–243. doi:10.1007/s11240-008-9480-z
- 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. doi:10.1111/nph.13109
- Favre-Godal, Q., Gourguillon, L., Lordel-Madeleine, S., Gindro, K., & Choisy, P. (2020). Orchids and their mycorrhizal fungi: an insufficiently explored relationship. *Mycorrhiza*, *30*, 5–22. doi:10.1007/s00572-020-00934-2
- Figuroa, C. (2005). Root Character Evolution and Systematics in Cranichidinae, Prescottiinae and Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae).
- Filazzola, A., Lortie, C. (2014). A systematic review and conceptual framework for the mechanistic pathways of nurse plants. doi: 10.1111/geb.12202
- Fochi, V., Chitarra, W., Kohler, A., Voyron, S., Singan, V. R., Lindquist, E. A., . . . Perotto, S. (2017). Fungal and plant gene expression in the *Tulasnella calospora*–*Serapias vomeracea* symbiosis provides clues about nitrogen pathways in orchid mycorrhizas. *New Phytologist*, *213*, 365–379. doi:10.1111/nph.14279
- 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*, 221–228. doi:10.1007/s00572-02000943-1
- Gaskett, A. C., Gallagher, R. V. (2018). Orchid diversity: Spatial and climatic patterns from herbarium records. doi: 10.1017/S1464793105006986
- Gebauer, G., & Meyer, M. (2003). <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C natural abundance of autotrophic and mycoheterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytologist*, *160*, 209–223.

- Gebauer, G., & Schulze, E. D. (1991). Carbon and nitrogen isotope ratios in different compartments of a healthy and a declining *Picea abies* forest in the Fichtelgebirge, NE Bavaria. *Oecologia*, *211*, 11–15.
- Gebauer, G., Preiss, K., & Gebauer, A. C. (2016). Partial mycoheterotrophy is more widespread among orchids than previously assumed. *New Phytologist*, *211*, 11-15.
- Gentry, A., Dodson, C. (1987). Diversity and Biogeography of Neotropical Vascular Epiphytes. *Annals of the Missouri Botanical Garden* Vol. 74, No. 2 (1987), pp. 205-233 (29 pages).
- González-Arno, M. T., Hernández-Ramírez, F., Dolce, N. R., Rascón-Díaz, M. P., & CruzCruz, C. A. (2020). Cryobiotechnological Studies in Vanilla: The Orchid of Multiindustrial Uses. In S. Khasim, S. Hegde, M. González-Arno, & K. (. Thammasiri, *Orchid Biology: Recent Trends & Challenges*. (pp. 21-36). Singapore: Springer.
- González-Hernández, E., Raventós, J., Mújica Benítez, E., & Bonet, E. (2007). Estructura y ecología de la población del endemismo cubano *Broughtonia cubensis* (Orchidaceae) , en Cabo San Antonio, Península de Guanahacabibes, Provincia de Pinar del Río, Cuba. *LANKESTERIANA*, *7*(3), 469-478.
- Govaerts, R., Bernet, P., Kratochvil, K., Gerlach, G., Carr, G., Alrich, P., Wood, J. J. (2017). World checklist of Orchidaceae. *The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew*.
- Groeneveld, E. V., & Rochefort, L. (2002). Nursing plants in peatland restoration: on their potential use to alleviate frost heaving problems. *Finnish Peatland Society*, *53*(3-4), 73–85.
- Han, J. Y., 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*, *2016*, 327–338.  
doi:10.1016/j.gecco.2016.03.011
- Hedge, S. N. (2020). Status of orchid industry in India. In S. Khasim, S. Hegde, M. González-Arno, & K. (. Thammasiri, *Orchid Biology: Recent Trends & Challenges* (pp. 11-20). Singapore: Springer.
- Herrera, H., García-Romera, I., Meneses, C., Pereira, G., & Arriagada, C. (2019). Orchid mycorrhizal interactions on the Pacific side of the Andes from Chile. A Review.

- Herrera, H., Valadares, R., Contreras, D., Bashan, Y., & Arriagada, C. (2017). Mycorrhizal compatibility and symbiotic seed germination of orchids from the Coastal Range and Andes in south central Chile. *Mycorrhiza*, 27, 175–188. doi:10.1007/s00572-016-07330
- 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, 807–825.
- Hetherington-Rauth M. C. (2016) Evolution and diversity of floral scent chemistry in the euglossine bee-pollinated orchid genus *Gongora*. *Annals of Botany*, Volume 118, Issue 1, July 2016, Pages 135–148, <https://doi.org/10.1093/aob/mcw072>
- Huang, H., Zi, X.-M., Lin, H., & Gao, J.-Y. (2018). Host-specificity of symbiotic mycorrhizal fungi for enhancing seed germination, protocorm formation and seedling development of over-collected medicinal orchid, *Dendrobium devonianum*. *Journal of Microbiology*, 56(1), 42–48. doi:10.1007/s12275-018-7225-1
- Hynson, N. A., Madsen, T. P., Selosse, M. A., Adam, I. K., Ogura-Tsujita, Y., & Roy, M. (2013). “The physiological ecology of mycoheterotrophy,”. In V. S. Merckx, *Mycoheterotrophy: The Biology of Plants Living on Fungi* (pp. 297-342). Berlin:: Springer-Verlag.
- Illyés, Z., Ouanphanivanh, N., Rudnov, S., Orczan, A. K., & Bratek, Z. (2010). The most recent results on orchid micorrhizal fungi in Hungary. *Acta Biologica Hungarica*, 61, 68–76.
- Imhof, S., Massicotte, H. B., Melville, L. H., & Peterson, R. L. (2013). Subterranean morphology and mycorrhizal structures. In V. (. Merckx, *Mycoheterotrophy: the biology of plants living on fungi* (pp. 157–214). New York: Springer.
- Jacquemyn, H., Brys, R., Cammue, B. P., Honnay, O., & Lievens, B. (2011). Mycorrhizal associations and reproductive isolation in three closely related *Orchis* species. *Annals of Botany*, 107(3), 347–56.
- Jacquemyn, H., Brys, R., Lievens, B., & Wiegand, T. (2012a). Spatial variation in belowground seed germination and divergent mycorrhizal associations correlate with spatial segregation of three co-occurring orchid species. *Journal of Ecology*, 100, 1328–1337.

- Jacquemyn, H., Brys, R., Merckx, V. S., Waud, V., Lievens, B., & Wiegand, T. (2014). Coexisting orchid species have distinct mycorrhizal communities and display strong spatial segregation. *New Phytologist*, 202, 616–627. doi:10.1111/nph.12640
- Jacquemyn, H., Brys, R., Vandepitte, K., Honnay, O., Roldán-Ruiz, I., & Wiegand, T. (2007). A spatially explicit analysis of seedling recruitment in the terrestrial orchid *Orchis purpurea*. *New Phytologist*, 176(2), 448–459.
- Jacquemyn, H., Brys, R., Waud, M., Busschaert, P., & Lievens, B. (2015). Mycorrhizal networks and coexistence in species-rich orchid communities. *New Phytologist*, 206, 1127–1134. doi:10.1111/nph.13281
- Jacquemyn, H., Micheneau, C., Roberts, D. L., & Pailler, T. (2005). Elevational gradients of species diversity, breeding system and floral traits of orchid species on Réunion Island. *Journal of Biogeography*, 32(10), 1751-1761. doi:10.1111/j.1365-2699.2005.01307.x
- Jacquemyn, H., Waud, M., Brys, R., Lallemand, F., Courty, P.-E., Robionek, A., & Selosse, M.-A. (2017). Associations and trophic modes in coexisting orchids: an ecological continuum between auto and Mixotrophy. *Frontiers in Plant Science*, 8(1497). doi:10.3389/fpls.2017.01497
- Jacquemyn, H., Waud, M., Merckx, V. S., Brys, R., Tyteca, D., Hedrén, M., & Lievens, B. (2016). Habitat-driven variation in mycorrhizal communities in the terrestrial orchid genus *Dactylorhiza*. *Scientific Reports*, 6, 1-9. doi:10.1038/srep37182
- Johnson, T. R., Stewart, S. L., Dutra, D., Kane, M. E., & Richardson, I. (2007). Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae)—preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90, 313–323.
- Joosten H, Gaudig G, Tanneberger F, Wichmann S, Wichtmann W. 2016. Paludiculture: sustainable productive use of wet and rewetted peatlands. IN: Bonn A, Allott T, Evans M, Joosten H, Stoneman R. (eds.) Peatland restoration and Ecosystem Services: Science, Policy and Practice. Cambridge University Press/ British Ecological Society.
- Jonasson, S. (2015). Las orquídeas: engañosas joyas de nuestra flora. *Societat d'Història Natural de les Balears*, 49-58.
- Jost, L. (2004). Explosive local radiation of the genus *Teagueia* (Orchidaceae) in the upper Pastaza Watershed of Ecuador. *Lyonia*, 7(1), 41-47.

- Kaur, J., Phillips, C., & Sharma, J. (2021). Host population size is linked to orchid mycorrhizal fungal communities in roots and soil, which are shaped by microenvironment. *Mycorrhiza*, *31*, 17–30. doi:10.1007/s00572-020-00993-5
- Kosaka, N., Kawahara, T., & Takahashi, S. (2014). Vegetation influencing the establishment and growth of the endangered Japanese orchid *Cypripedium macranthos* var. (AQUI FALTA EL NOMBRE DE LA SUBSP.) *Ecological Research*, *29*, 1003-1023.
- Kottke, I., Setaro, S. D., Haug, I., Herrera, P., Cruz, D., Fries, A., . . . Suárez, J. P. (2013). Mycorrhiza Networks Promote Biodiversity and Stabilize the Tropical Mountain Rain Forest Ecosystem: Perspectives for Understanding Complex Communities. In B. J. (eds), *Ecosystem Services, Biodiversity and Environmental Change in a Tropical Mountain Ecosystem of South Ecuador. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)* (pp. 187-203). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Kumar, P., & Rawat, G. S. (2009). *Eulophia flava*. *Orchid Review*, *117*, 154–157.
- Kumar, P., Tewari, R., & Rawat, G. (2011). Assisted pollination and seed formation for conservation of *Eulophia flava* (Orchidaceae): a case study from Himalayan Foothills, India. *Richardiana*, *12*, 25-38.
- Li, Y.-Y., Wang, H., & Guo, S.-X. (2018). Protocols for Establishing Fungi-Protocorm Culture. In Y.-I. Lee, & E. C.-T. Yeung, *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols* (pp. 61-69). New York: Springer. doi:10.1007/978-1-4939-7771-0\_3,
- Liu, H., Luo, Y. B., Heinen, J., Bhat, M., & Liu, Z. J. (2014). Eat your orchid and have it too: a potentially new conservation formula for Chinese epiphytic medicinal orchids. *Biodiversity Conservation*, *23*, 1215–1228.
- Liu, H., Luo, Y., & Liu, H. (2010). Studies of mycorrhizal fungi of Chinese orchids and their role in orchid conservation in China – a review. *Botanical Reviews*, *76*, 241–262.
- Liu, H., Luo, Y.-B., & Liu, Z.-J. (2013). Using guided commercialized cultivation models to promote species conservation and sustainable utilization: an example from the Chinese medicinal orchids. *Biodiversity Science*, *21*(1), 132-135. doi:10.3724/SP.J.1003.2013.04139

- Martos, F., Munoz, F., Pailler, T., Kottke, I., Gonneau, C., & Selosse, M. A. (2012). The role of epiphytism in architecture and evolutionary constraint within mycorrhizal networks of tropical orchids. *Molecular Ecology*, *21*(20), 5098-5109. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05692.x
- McCormick, M. K., & Jacquemyn, H. (2014). What constrains the distribution of orchid populations? *New Phytologist*, *202*(2), 392–400. doi:10.1111/nph.12639
- McCormick, M. K., Taylor, D. L., Whigham, D. F., & Burnett Jr, R. K. (2016). Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology*, *104*, 744–754. doi:10.1111/1365-2745.12556
- McCormick, M. K., Whigham, D. F., & Canchani-Viruet, A. (2018). Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytologist*, *218*, 1207–1215. doi:10.1111/nph.15223
- McCormick, M. K., Whigham, D. F., Sloan, D., O'Malley, K., & Hodkinson, B. (2006). Orchid–fungus fidelity: a marriage meant to last? *Ecology*, *87*, 903–911.
- Menchaca García, R. E. (2011). *Manual para la propagación de orquídeas*. México: Comisión Nacional Forestal.
- Meng, Y.-Y., Shao, S.-C., Liu, S.-J., & Gao, J.-Y. (2019). Do the fungi associated with roots of adult plants support seed germination? A case study on *Dendrobium exile* (Orchidaceae). *Global Ecology and Conservation*, *17*, e00582. doi:10.1016/j.gecco.2019.e00582
- Merckx, V. (2013). *Mycoheterotrophy: The biology of plants living on fungi*. New York: Springer,.
- Merckx, V. S., Mennes, C. B., Peay, K. G., & Geml, J. (2013). Evolution and diversification. In V. S. Merckx, *Mycoheterotrophy: The biology of plants living on fungi* (pp. 215–244). New York: Springer.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y Universidad Nacional de Colombia. (2015). *Plan para el estudio y la conservación de las orquídeas en Colombia*. Bogotá D. C.: Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y Universidad Nacional de Colombia.
- Molina-Montenegro, M. A., Ricote-Martínez, N., Muñoz-Ramírez, C., Torres-Díaz, C., Gómez-González, S., & Gianoli, E. (2013). Positive interactions between the lichen

- Usnea antarctica* (Parmeliaceae) and the native flora in Maritime Antarctica. *Journal of Vegetal Science*, 24, 463–472.
- Mondragón, D., & Dutra Elliott, D. (2013). The Population Dynamics of Epiphytic Orchids: A Review and Methodological Guide. In L. e. (eds.), *Treetops at Risk: Challenges of Global Canopy Ecology and Conservation* (pp. 377-384). New York: Springer.
- Mosquera-Espinosa AT, Bayman P, Prado GA, Gómez-Carabalí A, Otero JT. 2012. Pathogenicity of orchid mycorrhizal fungi (*Ceratobasidium* sp.) on rice and biocontrol of *Rhizoctonia solani* Sheath Blight. *Micología* 105:141-150
- Non-random spatial structuring of orchids in a hybrid zone of three *Orchis* species. (2012b). *New Phytologist*, 193, 454–464.
- Novoa, P., Espejo, J., Cisternas, M., Rubio, M., & Dominguez, E. (2015). *Guía de campo de las orquídeas chilenas*. Santiago de Chile: Corporación Chilena de la Madera (CORMA).
- Núñez, C. I., Aizen, M. A., & Ezcurra, C. (1999). Species associations and nurse plant effects in patches of high-Andean vegetation. *Journal of Vegetation Science*, 10, 357-364,.
- Odum, E. (1968) Energy Flow in Ecosystems: A Historical Review, *American Zoologist*, Volume 8, Issue 1, Pages 11–18, <https://doi.org/10.1093/icb/8.1.11>
- Ogura-Tsujita, Y., Yokoyama, J., Miyoshi, K., & Yukawa, T. (2012). Shifts in mycorrhizal fungi during the evolution of autotrophy to mycoheterotrophy in *Cymbidium* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 99, 1158–1176.
- 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*, 206, 1608–1618.
- Orejuela Gartner, J. E. (2010). La conservación de orquídeas en Colombia y un caso en proceso en la cuenca del río Cali, municipio de Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colombia. *Año Internacional de la biodiversidad*.
- Ovando, I., Damon, A., Bello, R., Ambrosio, D., Albores, V., Adriano, L., & Salvador, M. (2005). Isolation of endophytic fungi and their potential for the tropical epiphytic

orchids *Cattleya skinneri*, *C. aurantiaca* and *Brassavola nodosa*. *Asian Journal of Plant Science*, 3, 309–315.

- Pant, B., Shah, S., Shrestha, R., Pandey, S., & Joshi, P. R. (2017). An Overview on Orchid Endophytes. In A. Varma, R. Prasad, & N. (. Tuteja, *Mycorrhiza - Nutrient Uptake, Biocontrol, Ecorestoration* (pp. 503-524). Cham: Springer. doi:10.1007/978-3-31968867-1\_26
- Park, E.-J., & Lee, W. Y. (2013). In vitro symbiotic germination of myco-heterotrophic *Gastrodia elata* by *Mycena* species. *Plant Biotechnology Reports*, 7, 185–191. doi:10.1007/s11816-012-0248-x
- Pauw, A. (2006) Floral syndromes accurately predict pollination by a specialized oil-collecting bee (*Rediviva peringueyi*, Melittidae) in a guild of South African orchids (Coryciinae). DOI: 10.3732/ajb.93.6.917
- Pecoraro, L., Caruso, T., Cai, L., Gupta, V. K., & Liu, Z.-J. (2018). Fungal networks and orchid distribution: new insights from above- and below-ground analyses of fungal communities. *IMA Fungus*, 9(1), 1–11. doi:10.5598/imafungus.2018.09.01.01
- Pecoraro, L., Wang, X., Venturella, G., Gao, W., Wen, T., Gafforov, Y., & Gupta, V. K. (2020). Molecular evidence supports simultaneous association of the achlorophyllous orchid *Chamaegastrodia inverta* with ectomycorrhizal Ceratobasidiaceae and Russulaceae. *BMC Microbiology*, 20(236), 1-13. doi:10.1186/s12866-020-01906-4
- Pereira, M., da Silva Coelho, I., Valadares, R., Oliveira, S., Bocayuva, M., Pereira, O., . . . Kasuya, M. (2014). Morphological and molecular characterization of *Tulasnella* spp. fungi isolated from the roots of *Epidendrum secundum*, a widespread Brazilian orchid. *Symbiosis*, 62, 111–121.
- Perotto, S., Rodda, M., Benetti, A., Sillo, F., Ercole, E., Rodda, M., . . . Balestrini, R. (2014). Gene expression in mycorrhizal orchid protocorms suggests a friendly plant–fungus relationship. *Planta*, 239, 1337–1349. doi:10.1007/s00425-014-2062-x
- Phillips, R. D., Dixon, K. W., & Peakall, R. (2012). Low population genetic differentiation in the Orchidaceae: implications for the diversification of the family. *Molecular Ecology*, 21(21), 5208-5220. doi:10.1111/mec.12036

- Rafter, M., Yokoya, K., Schofield, E. J., Zettler, L. W., & 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*, 541–552.
- Rasmussen, H. N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil*, *244*, 149–163.
- Reiter, N., Whitfield, J., Pollard, G., Bedggood, W., Argall, M., Dixon, K. W., . . . Swart, N. (2016). Orchid re-introductions: an evaluation of success and ecological considerations using key comparative studies from Australia. *Plant Ecology*, *217*, 81–95.
- Ren, H., Yang, L., & Liu, N. (2008). Nurse plant theory and its application in ecological restoration in lower subtropics of China. *Progress in Natural Science*, *18*, 137–142. doi:10.1016/j.pnsc.2007.07.008
- Romero, C., Cuba-Díaz, M., & Silva, R. (2017). In vitro culture of *Chloraea gavilu* Lindl., an endemic terrestrial orchid from Chile. *Plant Biosystems*, *152*(4), 612–620. doi:10.1080/11263504.2017.1306001
- Roy, M., Watthana, S., Stier, A., Richard, F., Vessabutr, S., & Selosse, M.-A. (2009). Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC Biology*, *7*(51).
- Sakamoto, Y., Ogura-Tsujita, Y., Ito, K., Suetsugu, K., Yokoyama, J., Yamazaki, J., . . . Maki, M. (2016). The tiny-leaved orchid *Cephalanthera subaphylla* obtains most of its carbon via mycoheterotrophy. *Journal of Plant Research*, *129*, 1013–1020.
- Sathiyadash, K., Muthukumar, T., Karthikeyan, V., & Rajendran, K. (2020). Orchid Mycorrhizal Fungi: Structure, Function, and Diversity. In S. Khasim, S. Hegde, M. González-Arno, & K. (. Thammasir, *Orchid Biology: Recent Trends & Challenges* (pp. 239-280). Singapore: Springer. doi:10.1007/978-981-32-9456-1\_13
- Schiff, J. L. (2018). What Are Orchids? In *Rare and Exotic Orchids* (pp. 29-50). Cham: Springer. doi:10.1007/978-3-319-70034-2\_2
- Schweiger, J. M. (2019) Partial mycoheterotrophy in orchids. Dissertation, 2018 , Universität Bayreuth, Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften.
- Smit, C., Ouden, J. D., & Muller Scharer, H. (2006). Unpalatable plants facilitate tree sapling survival in wooded pastures. *Journal of Applied Ecology*, *43*(2), 305-312.

- Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. San Diego: Academic Press.
- Sobral, M., & Magrach, A. (2019). Restaurando la funcionalidad de los ecosistemas: la importancia de las interacciones entre especies. *Ecosistemas*, 28(2), 4-10.  
doi:10.7818/ECOS.1737
- Stewart, S. L., & Kane, M. E. (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, 147–158.
- Stewart, S. L., & Zettler, L. W. (2002). Symbiotic germination of three semiaquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquatic Botany*, 72, 25–35.
- Stewart, S. L., Zettler, L. W., Minso, J., & Brown, P. M. (2003). Symbiotic germination and reintroduction of *Spiranthes brevilabris* Lindley, an endangered orchid native to Florida. *Selbyana*, 24, 64-70.
- Stöckel, M., Tesitelová, T., Jersáková, J., Bidartondo, M. I., & Gebauer, G. (2014). Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings in nature. *New Phytologist*, 202, 606–615. doi:10.1111/nph.12688
- Stouffe, D. B., & Bascompte, J. (2011). Compartmentalization increases foodweb persistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*(108), 3648-3652.
- 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, 161–168. doi:10.1007/s13199-016-0399-6
- Suárez, J. P., Weiß, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in the Andean cloud forest. *Mycological Research*, 110(11), 1257–1270.
- Suetsugu, K., Haraguchi, T. F., Tanabe, A. S., & Tayasu, I. (2020). Specialized mycorrhizal association between a partially mycoheterotrophic orchid *Oreorchis indica* and a *Tomentella* taxon. *Mycorrhiza*, 31, 243–250. doi:10.1007/s00572-020-00999-z
- Suetsugu, K., Yamato, M., Matsubayashi, J., & Tayasu, I. (2019). Comparative study of nutritional mode and mycorrhizal fungi in green and albino variants of *Goodyera*

- velutina*, an orchid mainly utilizing saprotrophic rhizoctonia. *Molecular Ecology*, 28(18), 4290-4299. doi:10.1111/mec.15213
- Swarts, N. D., & Dixon, K. W. (2009). Terrestrial orchid conservation in the age of extincti. *Annals of Botany*, 104, 543–556.
- Swarts, N. D., Sinclair, E. A., Francis, A., & Dixon, K. W. (2010). Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Molecular Ecology*, 19, 3226–3242.
- Swinfield, T., Afriandi, R., Antoni, F., Harrison, R. (2016) Accelerating tropical forest restoration through the selective removal of pioneer species.
- Taylor, A. F., Fransson, P. M., Högberg, P., Högberg, M. N., & Plamboeck, A. H. (2003). Species level patterns in <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N abundance of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal sporocarps. *New Phytologist*, 159, 757–774.
- Thébault, E., & Fontaine, C. (2010). Stability of ecological communities and the architecture of mutualistic and trophic networks. *Science*(329), 853-856.
- Toledo-Aceves, T., López Barrera, F., Bonilla, M., Williams-Linera, G. (2020). Restauración Del Bosque De Niebla.
- Tremblay, R. L., Ackerman, J. D., Zimmerman, J. K., & Calvo, R. N. (2005). Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84(1), 1–54.  
doi:10.1111/j.1095-8312.2004.00400.x
- Tsai, W.-C., Dievart, A., Hsu, C.-C., Hsiao, Y.-Y., Chiou, S.-Y., Huang, H., & Chen, H.-H. (2017). Post genomics era for orchid research. *Botanical Studies*, 58(61), 1-22.  
doi:10.1186/s40529-017-0213-7
- Tsavkelova, E. A., Lobakova, E. S., Kolomeitseva, G. L., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2003). Localization of associative cyanobacteria on the roots of epiphytic orchids. *Microbiology*, 72, s86–91.
- Tsiftsis, S., Štípková, Z., & Kindlmann, P. (2019). Role of way of life, latitude, elevation and climate on the richness and distribution of orchid species. *Biodiversity and Conservation*, 28, 75–96. doi:10.1007/s10531-018-1637-4

- Vanden Broeck, A., Van Landuyt, W., Cox, K., De Bruyn, L., Gyselings, R., Oostermeijer, G., . . . Mergeay, J. (2014). High levels of effective long-distance dispersal may blur ecotypic divergence in a rare terrestrial orchid. *BMC Ecology*, *14*(20), 1-14.  
doi:10.1186/1472-6785-14-20
- Vargas Abarzúa, E., & Zúñiga Molinier, L. (2010). Tiempor y Sucesión ecológica en Ramón Margalef. *ARBOR Ciencia, Pensamiento y Cultura*, *163* - *171*.  
doi:10.3989/arbor.2010.741n1016
- Vaz, A. B., Mota, R. C., Bomfim, M. R., Vieira, M. L., Zani, C. L., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. (2009). Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, *55*, 1381–1391.
- Vázquez, D. P., & Aizen, M. A. (2004). Asymmetric specialization: a pervasive feature of plant–pollinator interactions. *Ecology* (85), 1251-1257.
- Vitousek, P. M., & Howarth, R. W. (1991). Nitrogen limitation on land and in the sea: how can it occur? *Biogeochemistry*, *13*, 87–115.
- Wang, Q.-X., Yan, N., Ji, D.-G., Li, S.-Y., & Hu, H. (2013). In vitro growth and carbon utilization of the green-leaved orchid *Dendrobium officinale* are promoted by mycorrhizal associations. *Botanical Studies*, *54*(23), 1-9. doi:10.1186/1999-3110-5423
- Waterman, R. J., & Bidartondo, M. I. (2008). Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids. *Journal of Experimental Botany*, *59*, 1085–1096.
- Waterman, R., Bidartondo, M. L., Stofberg, J., Combs, J. K., Gebauer, G., Savolainen, V., . . . Pauw, A. (2011). The effects of above-and belowground mutualisms on orchid speciation and coexistence. *The American Naturalist*, *177*(2), E54–E68.
- Waud, M., Busschaert, P., Lievens, B., & Jacquemyn, H. (2016a). Specificity and localised distribution of mycorrhizal fungi in the soil may contribute to co-existence of orchid species. *Fungal Ecology*, *20*, 155-165.
- Waud, M., Wiegand, T., Brys, R., Lievens, B., & Jacquemyn, H. (2016b). Nonrandom seedling establishment corresponds with distance-dependent decline in mycorrhizal abundance in two terrestrial orchids. *New Phytologist*, *211*(1), 255–264. doi:10.1111/nph.13894

- Wiens, J. J., Ackerly, D. D., Allen, A. P., Anacker, B. L., Buckley, L. B., Cornell, H. V., . . . Stephens, P. R. (2010). Niche conservatism as an emerging principle in ecology and conservation biology. *Ecology Letters*, *13*, 1310–1324. doi:10.1111/j.1461-0248.2010.01515.x
- Winkler, M., Hülber, K., & Hietz, P. (2009). Population dynamics of epiphytic orchids in a metapopulation context. *Annals of Botany*, *104*, 995–1004. doi:10.1093/aob/mcp188
- Xing, X., Gai, X., Liu, Q., Hart, M. M., & Guo, S. (2015). Mycorrhizal fungal diversity and community composition in a lithophytic and epiphytic orchid. *Mycorrhiza*, *25*, 289–296. doi:10.1007/s00572-014-0612-5
- Xing, X., Ma, X., Men, J., Chen, Y., & Guo, S. (2017). Phylogenetic constrains on mycorrhizal specificity in eight *Dendrobium* (Orchidaceae) species. *Science China Life Sciences*, *60*, 536–544. doi:10.1007/s11427-017-9020-1
- Xu, J. T., & Guo, S. X. (2000). Retrospect on the research of the cultivation of *Gastrodia elata* Bl, a rare traditional Chinese medicine. *Chinese Medical Journal*, *113*, 686–692.
- Yagame, T., & Yamato, M. (2013). Mycoheterotrophic growth of *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae) in tripartite symbioses with Thelephoraceae fungi and *Quercus serrata* (Fagaceae) in pot culture condition. *Journal of Plant Research*, *126*, 215–222.
- Yam, T. W., Chua, J., Tay, F., & Ang, P. (2010). Conservation of the Native Orchids Through Seedling Culture and Reintroduction—A Singapore Experience. *The Botanical Review*, *76*, 263–274. doi:10.1007/s12229-010-9050-z
- Yamazak, J., & Miyoshi, K. (2006). In vitro asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, *98*(6), 1197-206.
- Yang, F.-S., Sun, A.-H., Zhu, J., Downing, J., Song, X.-Q., & Liu, H. (2017). Impacts of Host Trees and Sowing Conditions on Germination Success and a Simple Ex Situ Approach to Generate Symbiotic Seedlings of a Rare Epiphytic Orchid Endemic to Hainan Island, China. *The Botanical Review*, *83*, 74–86. doi:10.1007/s12229-017-9178-1
- Ye, D. P. (2006). *Paphiopedilum spicerianum*, a new record of orchidaceae from China. *Acta Physica Sinica*, *44*(4), 471.

- Yeung, E. C. (2017). A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies*, 58(33), 1-14. doi:10.1186/s40529-017-0188-4
- Yeung, E. C., Li, Y., & Lee, Y. (2018). Understanding Seed and Protocorm Development in Orchids. In Y. Lee, & E. C. Yeung, *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols*, (pp. 3-26). New York: Springer. doi:10.1007/978-1-4939-7771-0\_1,
- Yokoya, K., Zettler, L. W., Kendon, J. P., Bidartondo, M., Stice, A. L., Skarha, S., . . . Sarasan, V. (2015). Preliminary findings on identification of mycorrhizal fungi from diverse orchids in the Central Highlands of Madagascar. *Mycorrhiza*, 25, 611–625.
- Yuan, Z.-J., Chen, Y.-c., & Yang, Y. (2009). Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 295–303. doi:10.1007/s11274-008-9893-1
- Zettler, L. W., & Corey, L. L. (2018). Orchid Mycorrhizal Fungi: Isolation and Identification Techniques. In Y.-I. Lee, & E. C.-T. Yeung, *Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses—Methods and Protocols* (pp. 27-59). New York,: Springer. doi:10.1007/978-1-4939-7771-0\_2,
- Zotz, G., & Vollrath, B. (2003). The epiphyte vegetation of the palm *Socratea exorrhiza*—correlations with tree size, tree age and bryophyte cover. *Journal of Tropical Ecology*, 19, 81–90.