



Instituto Politécnico Nacional

**Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo
Integral Regional unidad Oaxaca**

Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de
Recursos Naturales
(Biodiversidad del Neotrópico)

**“Efecto del forofito sobre la germinación de *Alamania
punicea* y *Oncidium brachyandrum*”**

**Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias
presenta:**

Biol. Gustavo Ramiro Hernández Álvarez

Directores.

Dra. Demetria Martha Mondragón Chaparro

Dr. Celerino Robles Pérez

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México 2021



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de México, 07 de junio del 2021

El Colegio de Profesores de Posgrado de **CIIDIR UNIDAD OAXACA** en su Sesión
(Unidad Académica)

Ordinaria No. 6 celebrada el día 7 del mes junio de 2021 conoció la solicitud presentada por el (la) alumno (a):

| | | | | | |
|-------------------|-----------|-------------------|---------|-------------|----------------|
| Apellido Paterno: | Hernández | Apellido Materno: | Álvarez | Nombre (s): | Gustavo Ramiro |
|-------------------|-----------|-------------------|---------|-------------|----------------|

Número de registro: B 1 8 0 4 7 2

del Programa Académico de Posgrado: Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

“Efecto del forofito sobre la germinación de *Alamania punicea* y *Oncidium brachyandrum*”

Objetivo general del trabajo de tesis:

1) Caracterización física y química de los forofitos, 2) Evaluación del efecto de extractos acuosos de las cortezas de los forofitos sobre la germinación ex situ de *O. brachyandrum* y *A. punicea*, 3) Germinación in situ de *O. brachyandrum* y 4) Caracterización de la comunidad de hongos micorrízicos de individuos adultos de *O. brachyandrum* creciendo sobre diferentes forofitos

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director: Dra. Demetria Martha Mondragón Chaparro 2° Director: Dr. Celerino Robles Pérez

No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

Laboratorio de Epífitas. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, unidad Oaxaca.

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director(a) de Tesis

Dra. Demetria Martha Mondragón Chaparro

Aspirante

Hernández Álvarez Gustavo Ramiro

2° Director de Tesis (en su caso)

Dr. Celerino Robles Pérez

Presidente del Colegio



Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD OAXACA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de siendo las horas del día del mes de del , se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado del: para examinar la tesis titulada: del alumno:

| | | | | | |
|--------------------------|------------------|--------------------------|----------------|--------------------|-----------------------|
| Apellido Paterno: | HERNÁNDEZ | Apellido Materno: | ÁLVAREZ | Nombre (s): | GUSTAVO RAMIRO |
|--------------------------|------------------|--------------------------|----------------|--------------------|-----------------------|

Número de registro:

Aspirante del Programa Académico de Posgrado:

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 4 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI** **NO** **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: (Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)

La mayoría de las similitudes ocurren en metodología e introducción, que están convenientemente referidas a las fuentes originales. En las secciones que representan las principales contribuciones de la tesis, Resultados, Discusión y Conclusiones, no hay señalamientos de similitud.

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente, y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** o **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

El trabajo de tesis es una contribución original al conocimiento de las orquídeas epífitas. Los integrantes de la Comisión Revisora de Tesis han solicitado modificaciones y correcciones al documento, mismos que han sido atendidos por el estudiante e incorporados a la versión final del documento.

COMISIÓN REVISORA DE TESIS

Dra. Demetria Martha
Mondragón Chaparro

Directora de Tesis
Nombre completo y firma

Dr. Celerino Robles
Pérez

Director de Tesis
Nombre completo y firma

Dr. Aniceto Rodolfo Solano
Gómez

Nombre completo y firma

Dra. Araceli Minerva Vera
Guzmán

Nombre completo y firma

Dr. Alejandro Flores Palacios

Nombre completo y firma

Dr. Salvador Isidro Bolívar
Jiménez

Nombre completo y firma
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
COLEGIO DE PROFESORES
UNIDAD OAXACA

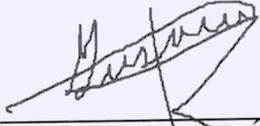


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca el día 25 del mes mayo del año 2021, el (la) que suscribe Gustavo Ramiro Hernández Álvarez alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales con número de registro B180472, adscrito a CIIDIR Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Demetria Martha Mondragón Chaparro y Dr. Celerino Robes Pérez y cede los derechos del trabajo intitulado Efecto del forofito sobre la germinación de *Alamania punicea* y *Oncidium brachyandrum* al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección gusheral180472@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Gustavo Ramiro Hernández Álvarez
Nombre y firma



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD OAXACA

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mis padres y mi hermana por apoyarme en todo momento, a mi abuela quien sembró en mí el amor por la naturaleza y las plantas. A mis directores de tesis por la paciencia, el apoyo y la confianza depositada en mí.

Agradecimiento

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis la Dra. Demetria Mondragón Chaparro y el Dr. Celerino Robles, quienes con su apoyo y paciencia me ayudaron en el proceso de formación de este trabajo.

A mi compañera del laboratorio de epifitas vasculares M. en C. Adriana Ramírez Martínez por compartir su conocimiento y experiencia en el tema.

También quiero agradecer al Centro Interdisciplinario de Investigación para el desarrollo Integral Regional CIIDIR unidad Oaxaca perteneciente al Instituto Politécnico Nacional así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Quienes me brindaron el espacio y las herramientas para llevar a cabo esta investigación.

A los miembros del comité: Dra. Demetria Mondragón Chaparro, Dr. Celerino Robles, Dra. Araceli Vera Guzmán, Dr. Rodolfo Solano Gómez, Dr. Alejandro Flores Palacios. Gracias por su atención, por su paciencia, por sus consejos y por la guía durante el proceso de desarrollo de la tesis.

Asimismo agradezco a la Dra. Araceli Vera Guzmán por el apoyo y consejos brindados durante el proceso de la tesis, de igual manera al equipo del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales en especial a la M. en C. Mónica Lilian Pérez Ochoa y a la M. en C. Yatziil García.

De igual manera agradezco a la comunidad de Tooxi, Yanhuitlán, Oaxaca, por permitirme realizar mi estudio en sus bosques.

Por ultimo quiero agradecer a mi familia y amigos quienes con su fuerza y apoyo mantuvieron encendido el motor que me movió en este trayecto.

Muchas gracias a todos.

Resumen

La germinación de las orquídeas epífitas está muy ligada a las características propias del árbol en donde se establecen, las cuales, a su vez, pueden afectar el crecimiento de las micorrizas necesarias para su germinación. Esta interacción orquídea-forofito-micorriza afecta tanto la distribución como la abundancia de las orquídeas epífitas sobre diferentes forofitos. En un encinar de la Mixteca Oaxaqueña se observó que *Oncidium brachyandrum* y *Alamania punicea* son abundantes sobre *Quercus rugosa* y *Q. martinezii*, y escasas sobre *Q. castanea*, por lo que la pregunta de investigación de este trabajo es ¿cómo afecta el forofito la germinación de estas dos especies de orquídeas epífitas? Para contestar esto se realizaron los siguientes experimentos: 1) Caracterización física y química de los forofitos, 2) Evaluación del efecto de extractos acuosos de las cortezas de los forofitos sobre la germinación *ex situ* de *O. brachyandrum* y *A. punicea*, 3) Germinación *in situ* de *O. brachyandrum* y 4) Caracterización de la comunidad de hongos micorrízicos de individuos adultos de *O. brachyandrum* creciendo sobre diferentes forofitos. La corteza de *Quercus* fue la más rugosa, en tanto que *Q. castanea* presentó la mayor concentración tanto en fenoles como en flavonoides ($F = 30995.2$, g. l. = 2, $p < 0.05$) como para flavonoides ($F = 14581.1$, g. l. = 2, $p < 0.05$). Solamente se llegó a la etapa de formación de protocormos con las concentraciones más altas de extractos acuosos de *Q. rugosa* y *Q. martinezii* para *A. punicea*; en el caso de *O. brachyandrum* en todas las concentraciones, aunque a menor concentración hubo un mayor porcentaje de tránsito entre las diferentes etapas germinativas. La germinación *in situ* fue menor del 1% y no difirió entre los tres forofitos. El porcentaje de colonización micorrízica de individuos adultos de *O. brachyandrum* difirió estadísticamente entre forofitos (*Q. rugosa* 74 ± 28 %, *Q. martinezii* 46 ± 12 % y *Q. castanea* 26.7 ± 18 %; $F = 4.47$, g.l.= 2, $p < 0.05$), mientras que en términos absolutos *O. brachyandrum* creciendo sobre *Q. castanea* presentó el mayor número de géneros (6), seguido de *Q. martinezii* (5 géneros) y *Q. rugosa* (1 género). Los resultados muestran que la composición química y la comunidad de hongos simbioses difiere entre forofitos y esto pudiera explicar la variación existe del forofito sobre la germinación de *A. punicea* y *O. brachyandrum*, que pudiera explicar las variaciones de densidad de estas dos orquídeas observadas en el campo.

Palabras clave: alelopatía, encinos, endófitos, micorrizas, orquídeas.

Abstract.

The germination of epiphytic orchids is closely linked to the characteristics of the tree where they were obtained, which, in turn, can affect the growth of the mycorrhizae necessary for their germination. This orchid-plant-mycorrhiza interaction affects both the distribution and the abundance of epiphytic orchids on different plant species. In a holm oak grove in the Mixteca region of Oaxaca, it is said that *Oncidium brachyandrum* and *Alamania punicea* are abundant on *Quercus rugosa* and *Q. martinezii*, and scarce on *Q. castanea*. The research question for this work is how does the plant affect the germination of these two species of epiphytic orchids? To answer this, the following experiments were carried out: 1) Physical and chemical characterization of plants, 2) Evaluation of the effect of aqueous extracts from plant barks on *ex-situ* germination of *O. brachyandrum* and *A. punicea* 3) Germination in situ of *O. brachyandrum* and 4) Characterization of the mycorrhizal fungal community of adult individuals of *O. brachyandrum* growing on different plants. *Quercus* bark was the roughest, while *Q. castanea* presented the highest concentration in both phenols and flavonoids ($F = 30995.2$, $gl = 2$, $p < 0.05$) and for flavonoids ($F = 14581.1$, $gl = 2$, $p < 0.05$). The protocorm formation stage was only reached with the highest concentrations of aqueous extracts of *Q. rugosa* and *Q. martinezii* for *A. punicea*; in the case of *O. brachyandrum* in all concentrations, although at a lower concentration there was a higher percentage of transit between the different germinative stages. Germination in situ was less than 1% and did not differ between the three plants. The percentage of mycorrhizal colonization of adult *O. brachyandrum* individuals differed statistically between plants (*Q. rugosa* $74 \pm 28\%$, *Q. martinezii* $46 \pm 12\%$ and *Q. castanea* $26.7 \pm 18\%$; $F = 4.47$, $gl = 2$, $p < 0.05$), while in absolute terms *O. brachyandrum* growing on *Q. castanea* presented the highest number of genera (6), followed by *Q. martinezii* (5 genera) and *Q. rugosa* (1 genus). The results show that the chemical composition and the community of symbiotic fungi differ between plants and this could explain the variation of the plant on the germination of *A. punicea* and *O. brachyandrum*, which could explain the variations in density of these two orchids observed in the field.

Keywords: allelopathy, oaks, endophytes, mycorrhizae, orchids.

Índice

| | |
|--|----|
| Resumen | 7 |
| Abstract..... | 8 |
| Introducción..... | 11 |
| Objetivos particulares..... | 12 |
| Marco teórico..... | 14 |
| Interacción orquídea epífita-forofito..... | 14 |
| Alelopatía | 15 |
| Las orquídeas..... | 17 |
| Características de las semillas de orquídeas | 18 |
| Micorrizas de orquídeas | 19 |
| Variación de la comunidad fúngica asociada a orquídeas entre forofitos | 20 |
| Metodología | 21 |
| Área de estudio | 21 |
| <i>Alamania punicea</i> . Lex. | 22 |
| <i>Oncidium brachyandrum</i> . Lindl. | 24 |
| Forofitos | 25 |
| <i>Q. castanea</i> | 26 |
| <i>Q. rugosa</i> | 26 |
| <i>Q. martinezii</i> | 26 |
| Caracterización de los forofitos | 26 |
| Física..... | 26 |
| a) Rugosidad de las cortezas de los forofitos..... | 26 |
| Química | 27 |
| a) Medición de pH..... | 27 |
| b) Determinación de compuestos alelopáticos | 27 |
| Colecta de semillas | 28 |
| Evaluación de viabilidad..... | 28 |
| Evaluación del efecto de extractos acuosos de <i>Q. castanea</i> , <i>Q. rugosa</i> y <i>Q. martinezii</i> sobre las tasas de germinación de semillas y desarrollo de protocormos de <i>O. brachyandrum</i> y <i>A. punicea in vitro</i> | 29 |

| | |
|--|----|
| a) Obtención de muestras de cortezas de forofitos y preparación de extractos acuosos... | 29 |
| Germinación <i>in situ</i> de <i>O. brachyandrum</i> sobre <i>Q. castanea</i> , <i>Q. rugosa</i> y <i>Q. martinezii</i> | 32 |
| Determinación de la comunidad de hongos asociados presentes en individuos adultos de <i>O. brachyandrum</i> creciendo sobre <i>Q. castanea</i> , <i>Q. rugosa</i> y <i>Q. martinezii</i> | 32 |
| Resultados y discusión. | 37 |
| Caracterización de los forofitos | 37 |
| Física..... | 38 |
| a) Rugosidad | 38 |
| Química | 39 |
| a) pH de las cortezas | 39 |
| b) Composición química: | 40 |
| Viabilidad de <i>O. brachyandrum</i> y <i>A. punicea</i> en laboratorio..... | 40 |
| Efecto de los extractos acuosos en la germinación de <i>O. brachyandrum</i> | 41 |
| <i>Variación del porcentaje tránsito en las etapas germinativas</i> | 42 |
| Efecto de los extractos acuosos en la germinación <i>in vitro</i> de <i>A. punicea</i> | 45 |
| <i>Variación del porcentaje tránsito en las etapas germinativas de A. punicea</i> | 46 |
| Germinación <i>in situ</i> de <i>O. brachyandrum</i> sobre <i>Q. castanea</i> , <i>Q. rugosa</i> y <i>Q. martinezii</i> | 49 |
| Determinación de la comunidad de hongos asociados presentes en individuos adultos de <i>O. brachyandrum</i> creciendo sobre <i>Q. castanea</i> , <i>Q. rugosa</i> y <i>Q. martinezii</i> | 50 |
| Porcentaje de colonización en raíces de <i>O. brachyandrum</i> en diferentes forofitos | 50 |
| <i>Aislamiento de hongos endófitos presentes en raíces de O. brachyandrum</i> | 52 |
| Conclusión..... | 54 |
| Bibliografía | 55 |
| Anexo I | 72 |
| Anexo II..... | 74 |
| Anexo III | 77 |
| Anexo IV. | 79 |
| Anexo V..... | 80 |
| Anexo VI | 83 |
| Anexo VII..... | 84 |

Introducción

Las epífitas vasculares son plantas que crecen sobre plantas (forofitos) pero no se alimentan directamente de ellos (Benzing, 1990). Los forofitos juegan un papel crucial en su biodiversidad, la estructura de sus comunidades y en la dinámica de sus poblaciones (Wang et al., 2017). Se ha sugerido que el efecto de las forofitos sobre las epífitas está determinado por numerosas características del árbol hospedero, como son: patrones de ramificación (distribución, tamaño y ángulo de las ramas), características físicas y químicas de la corteza (p.ej. pH, retención de agua de la corteza, rugosidad, grado de exfoliación, presencia de compuestos alelopáticos)(Vergara-Torres *et al.*, 2010; Valencia-Díaz *et al.*, 2012, 2013); también se puede mencionar la tasa de crecimiento específica del árbol, tamaño máximo (Flores-Palacios y García-Franco 2006; López-Villalobos *et al.*, 2008), así como apertura del dosel y la fenología de sus hojas (Mehltreter *et al.*, 2005; Wagner *et al.* 2015, Rasmussen y Rasmussen 2018, Cortés-Anzúres *et al.*, 2020).

Para las orquídeas epífitas, quienes se estima que representan el 70% de las epífitas vasculares (Zotz, 2016), además de los factores anteriormente mencionados, la comunidad de hongos presentes en la corteza de cada especie de forofito puede afectar su presencia y desarrollo (Wang *et al.*, 2017). Si bien, los hongos simbiosntes pueden o no estar presentes a lo largo del ciclo de vida de las orquídeas, son fundamentales para la germinación y establecimiento de las orquídeas; la importancia de dicha asociación radica en la carencia de endospermo de sus las semillas que hace obligatoria su asociación con el hongo para que les provean del agua y nutrientes necesarios para su germinación; dicha asociación tiende a ser específica entre especies de orquídeas y especies de hongos (Dearnaley y Cameron, 2016).

Debido a los factores anteriormente mencionados ciertos forofitos pueden proveer de microambientes más aptos para el establecimiento y crecimiento de las orquídeas por ello algunas orquídeas muestran preferencia por ciertas especies, la cual se ve reflejada en la

frecuencia de colonización así como por la abundancia de sus poblaciones entre diferentes especies de árboles (de la Rosa-Manzano et al., 2014). En un encinar en la mixteca Oaxaqueña se observó que en una población muestral elegida aleatoriamente de *Oncidium brachyandrum* Lindl. y *Alamania punicea* Lex creciendo sobre *Q. castanea*, *Q. rugosa* y *Q. martinezii*, *O. brachyandrum* presento el 73 % de los individuos creciendo sobre *Q. martinezii*, el 26 % estuvieron en *Q. rugosa* y el 0% sobre *Q. castanea*. Mientras que *A. punicea* presentó el 50% sobre *Q. martinezii*, el 50 % sobre *Q. rugosa* y el 0% sobre *Q. castanea* Né (Ramírez-Martínez, 2018). Por lo que surge la pregunta, ¿Por qué existe esta variación en abundancias entre los diferentes forofitos?, dado que se sabe que en las epífitas la fase de establecimiento es la más crítica en el ciclo de vida (Phillips *et al.* 2020) decidimos evaluar el efecto del forofito sobre la germinación de estas dos especies, con el fin de ampliar el entendimiento de los factores que regulan las poblaciones de orquídeas epífitas.

Objetivo general

Evaluar el efecto del forofito sobre la germinación de semillas de *Oncidium brachyandrum* y *Alamania punicea*.

Objetivos particulares

1. Caracterizar a los forofitos física (rugosidad de la corteza); y químicamente (pH, concentración de fenoles y flavonoides).
2. Evaluar el efecto de extractos acuosos de *Q. castanea*, *Q. rugosa* y *Q. martinezii* sobre las tasas de germinación de semillas y formación de protocormos de *O. brachyandrum* y *A. punicea* en el laboratorio.
3. Medir el porcentaje de germinación de *O. brachyandrum* in situ sobre *Q. castanea*, *Q. rugosa* y *Q. martinezii*
4. Describir la comunidad de hongos endófitos presentes en raíces de individuos adultos de *O. brachyandrum* creciendo sobre *Q. castanea*, *Q. rugosa* y *Q. martinezii*, con base en caracteres morfológicos de los hongos.

Hipótesis

1. Dado que en la literatura se señala que existen diferencias físicas y químicas entre especies de encinos (Silleros *et al.*, 2019), se espera que tanto la rugosidad, el pH, el contenido de fenoles y flavonoides presentes en las cortezas de *Q. castanea*, *Q. rugosa* y *Q. martinezii* difieran entre estas especies de encinos.
2. Diferentes estudios muestran que las características químicas de la corteza pueden tener un efecto inhibitorio (alelopatía) sobre el establecimiento de plantas epífitas (Valencia-Díaz *et al.*, 2010, 2013), es por ello que se espera que los extractos acuosos de la corteza de *Q. castanea*, donde hay una baja densidad de individuos de ambas orquídeas, tengan un efecto negativo en la germinación de *A. punicea* y *O. brachyandrum*; mientras que los extractos de *Q. rugosa* y *Q. martinezii* tengan un efecto nulo o positivo sobre la germinación de estas orquídeas.
3. Dado que las características de las cortezas (rugosidad, presencia de sustancias alelopáticas, pH) afectan la capacidad germinativa de especies epífitas (Callaway *et al.*, 2002, Valencia-Díaz *et al.*, 2010, 2013; Barterls y Chen 2012), se espera encontrar variación en el porcentaje de germinación *in situ* de *O. brachyandrum* sobre las tres especies de forofitos evaluadas, debido a las diferencias morfológicas y químicas que puedan existir entre ellos.
4. Se sabe que la comunidad de hongos presentes en las raíces de las orquídeas epífitas adultas, pueden ser una fuente de inóculo para las semillas presentes a sus alrededores; sin embargo, dicha comunidad esta puede variar dependiendo del árbol en donde crezcan (Wang *et al.*, 2017), por lo que se espera encontrar diferencias en la comunidad fúngica entre las tres especies de encinos.

Marco teórico

Interacción orquídea epífita-forofito

Muchas orquídeas epífitas, presentan una preferencia por ciertos árboles y arbustos, esto puede estar relacionado con los atributos físicos, químicos y biológicos del forofito (Vergara-torres *et al.* Cortez-Anzures *et al.*, 2020). Dentro de las características físicas se pueden mencionar por ejemplo el tamaño del hospedero, se ha encontrado que los árboles de mayor tamaño tienden a generar un mayor número de espacios para el establecimiento de muchas epífitas (Flores-Palacios y García-Franco, 2006; De la Rosa-Manzano, 2014). Otras cualidades son la estructura, la disposición y el ángulo de las ramas, así Zotz (2007) encontró que el mayor porcentaje de orquídeas (83%) preferían ramas con un ángulo de 25°. El mismo autor afirma que el mayor porcentaje de orquídeas crece sobre ramas delgadas en la parte alta del dosel, esto lo atribuye a que en esta zona existe una mejor captación de luz.

La textura de la corteza es otro atributo que influye la preferencia en el establecimiento de las plantas epífitas. Cuando un posible hospedero presenta una corteza fisurada y rugosa existe una mayor posibilidad de que las semillas se fijen. Callaway *et al.* (2002) encontraron que la rugosidad se relaciona positivamente con la capacidad de retener ramets de *Tillandsia sp.* Por otro lado, De la Rosa Manzano *et al.* (2014) señalan que existe una correlación entre la rugosidad de la corteza de *Gymnopodium floribundum* Rolfe y la cantidad de orquídeas que crecen en esta especie de árbol.

La humedad es un factor crucial en el ambiente epífita, la capacidad de retención de agua de la corteza es de suma importancia para las orquídeas, debido a esto los forofitos que absorban más agua y la liberen más lentamente serán preferidos por las epífitas, de esta manera el árbol proporcionará un ambiente propicio para su germinación, así como para su establecimiento (Callaway *et al.*, 2002; Mehltreter *et al.*, 2005; Philips *et al.*, 2020). Zarate-García *et al.* (2020) realizaron un estudio en donde compararon la capacidad de retención de agua de cinco tipos de hospedero, con la preferencia de distintas orquídeas, encierran que los dos forofitos

con mayor capacidad de retención de agua en sus cortezas, son los que poseen una preferencia mayor por parte de las orquídeas.

Los atributos químicos también juegan un papel importante en la preferencia de las orquídeas por ciertos forofitos, así se sabe que el pH de las cortezas está relacionado directamente con la captación de nutrientes en las plantas, así Steege y Cornelissen (1989) reportan que los valores de pH que prefieren ciertas especies de orquídeas para establecerse en un bosque lluvioso, son de entre 4.6 y 5.

Alelopatía

La alelopatía se define como el efecto tanto inhibitorio como estimulante de una planta sobre otra mediante la producción de químicos que libera al ambiente (Zhang *et al.*, 2021). Los aleloquímicos pueden alterar diferentes procesos fisiológicos tales como la diferenciación celular, división celular, captación de iones y agua, metabolismo de fitohormonas, respiración, fotosíntesis, función enzimática, señal de transducción para la expresión de un gen, entre otros (Hong *et al.*, 2010).

De acuerdo a las diferentes estructuras y propiedades de estos compuestos, los aleloquímicos pueden ser clasificados dentro de las siguientes categorías: ácidos orgánicos solubles en agua, alcoholes de cadena recta, aldehídos alifáticos, cetonas, lactonas, ácidos fáticos, quininas (benzoquinona, antraquinona y quininas complejas), fenoles, ácido cinámico y sus derivados, cumarinas, flavonoides, taninos, esteroides y terpenoides (lactonas sesquiterpénicas, diterpenos, triterpenoides). Los compuestos fenólicos son el tipo más importante y común de aleloquímicos en plantas dentro del ecosistema (Li *et al.*, 2010).

El efecto de los alelopáticos sobre la germinación se ha estudiado principalmente en plantas de consumo o cultivos. Por ejemplo, Bahit y Chauhan (2000) encontraron que los extractos de dos especies de encinos disminuyen este proceso en tres especies de plantas de cultivo, ellos

atribuyen este efecto a la alta concentración de taninos tanto en la corteza como en las hojas. Harchani *et al.* (2017) quienes evaluaron el efecto de extractos de tallos y raíces en *Casuarina glauca* Sieber ex Spreng. y *Populus nigra* Sieber ex Spreng sobre *Triticum durum* Desf., encontrando que existe un efecto negativo de los extractos de ambas plantas sobre la germinación, posiblemente relacionado con la alta concentración de compuestos fenólicos, especialmente taninos. Sobrero *et al.* (2004) mencionan que los taninos pueden modificar la síntesis o la actividad enzimática, mientras que Mendoza *et al.* (2017) encuentran que los taninos tienen un efecto antagónico con las giberelinas, hormonas indispensables para romper la latencia en las semillas.

Los efectos alelopáticos de los forofitos sobre el epifitismo se han probado principalmente en algunas especies de líquenes, encontrándose que la presencia de ciertos compuestos como el ácido úsnico puede hacer que disminuya su crecimiento (Lokajová *et al.*, 2014). En cuanto a epífitas vasculares, Valencia-Díaz *et al.* (2010, 2012) comprobaron los efectos alelopáticos de *Ipomea murucoides* Roem. & Schult, y *Bursera copallifera* (DC.) Bullock sobre la germinación de *Tillandsia recurvata* (L.) L. encontrando que la concentración de compuestos como fenoles y flavonoides inhiben su germinación.

Para orquídeas epífitas, en el trabajo pionero es el de Frei y Dodson (1972), ellos determinaron el efecto alelopático de la corteza de diferentes especies de encino — *Quercus*— sobre el establecimiento de *Encyclia tampensis* Lindl, ellos sugieren que altas concentraciones de ácido elágico y gálico tienen un efecto negativo en la germinación de esta especie. Es importante señalar que en éste trabajo las cortezas que estudiaron provenían del sur de México, pero las semillas de orquídea eran de una especie de Florida, ellos *a priori* decidieron usar como alelopáticos a los ácidos elágico y gálico, pero esta decisión no está apoyada en la fitoquímica de las cortezas y sus conclusiones no están soportadas en análisis estadísticos; además, en este estudio no toman en cuenta otros factores como los hongos asociados, las condiciones microclimáticas y carece de una contraparte experimental en el campo. Así que aunque pionero, los resultados no son realistas.

Por otro lado, el estudio de Harshani *et al.* (2014) quienes encuentran que existe un efecto inhibitorio de los extractos de las cortezas de árboles hospedero y no hospederos sobre la germinación de *Dendrobium aphyllum*, (Roxb.) C.E.C Fisch., y que dicha inhibición aumenta a mayor concentración fenoles.

Las orquídeas

Orchidaceae es la familia de angiospermas que presenta el mayor número de especies a nivel mundial, actualmente se estima que cuenta con 26, 567 especies (Govearts *et al.*, 2014). Las principales características de la familia son: el polen agrupado en una estructura llamada polinio, las semillas llamadas “tipo polvo” carentes de endospermo, una estructura previa a la formación de la plántula llamada protocormo, además de características florales tales como: estambres en un sólo lado de la flor, los cuales están fusionados con los pistilos en una estructura llamada columna, así como la modificación del tercer pétalo (labelo) (Dressler, 1981).

Cerca del 70% de las orquídeas son epífitas (Zotz, 2016). Diferentes preadaptaciones les han permitido colonizar este ambiente, entre las que encontramos: raíces fotosintéticas especializadas para obtener agua y nutrientes con una estructura conocida como velamen, este tejido es una capa de células muertas que cubre la raíz y cuya función es retener agua; presencia de pseudobulbos que les ayudan a almacenar agua; y presencia de metabolismo fotosintético tipo CAM para la disminución de la pérdida de agua (Dressler, 1981)

Esta familia es una de las más amenazadas, debido entre otras cosas a que sus individuos dependen de mutualismos en etapas clave de su ciclo de vida; en las primeras etapas de su ciclo de vida la asociación con otros organismos, como hongos de micorriza, es obligada (Emeterio-Lara *et al.*, 2021), muchos de sus polinizadores son específicos. Entre otras

amenazas podemos mencionar, la sobre colecta de individuos de las sus poblaciones naturales (Flores-Palacios y Valencia-Díaz 2007), así como la pérdida de hábitat (Turner 1994; Ticktin *et al.*, 2020). Según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), del total de especies registradas, al menos 1,017 se encuentran en la lista roja. México cuenta con aproximadamente 1,300 especies (Solano *et al.*, 2017), de estas aproximadamente 200 se encuentran dentro de esta lista de riesgo (CITES, 2013). Uno de los estados con la mayor diversidad de orquídeas es Oaxaca, que cuenta con 733 especies (Solano *et al.*, 2016), de las cuales 62 son endémicas del estado y 68 se encuentran bajo alguna categoría de riesgo según la NOM-059-2001 (Soto-Arenas y Salazar, 2004).

Características de las semillas de orquídeas

Dentro de las angiospermas, las orquídeas son una de las familias de plantas que poseen las semillas de menor tamaño, en general, cada cápsula contiene cientos de miles de semillas (Mosqueda *et al.*, 2010, Arditti y Ghani 2010). Este tipo de semillas se conocen como “tipo polvo”, pueden medir entre 0.05-6 mm y pesar entre 0.31-24 μ g; cada semilla está cubierta por una testa con un grosor de una o dos capas de células muertas, el grosor depende de la especie de orquídea; debido a su tamaño tan pequeño, el embrión se encuentra poco desarrollado, además carecen de endospermo (Yeung *et al.*, 2019).

Debido a las características mencionadas, para germinar necesitan un aporte externo de nutrientes que ayuden al crecimiento y diferenciación del embrión, por esta razón dependen de una asociación simbiótica con un hongo, estructura a la que se le denomina micorriza, la cual le provee de los recursos necesarios para su germinación (Otero *et al.*, 2004).

El proceso de germinación y desarrollo post-germinativo de las orquídeas epífitas se divide en las siguientes etapas: imbibición de la semilla, ruptura de la testa, después del proceso formación del protocormo y el desarrollo de la plántula (adaptado de Huang *et al.*, 2018). El protocormo es una estructura heterótrofa única en las orquídeas que se caracteriza por ser un

grupo de células de parénquima, con clorofila que forman una esfera (Arditti, 1967), este tejido está especializado para establecer una relación simbiótica con un hongo compatible, tiene la capacidad de digerir pelotones de hifas y obtener nutrientes de ellas (Yeung, 2017). Cuando esta estructura alcanza cierto tamaño (Batygina *et al.*, 2003), se elonga y cambia a un color verde, después de esta etapa se forman los primeros pelos radicales y las primeras hojas (Utami y Hariyanto, 2019).

Micorrizas de orquídeas

Una micorriza es una asociación simbiótica entre la raíz de una planta y un hongo especializado. Esta es la más común y antigua asociación simbiótica que se ha encontrado en plantas (Rodríguez-Echeverría *et al.*, 2007); existen cuatro tipos: endomicorriza arbuscular, ectomicorriza, ericoide y orquideoide. Cada tipo de asociación tiene sus características particulares. Por su relevancia en este estudio ejemplificaré únicamente dos: las arbusculares, que son las más frecuentes, penetran en la raíz de la planta hospedera, se asocian principalmente con hongos del fílum Glomeromycota; y las orquideoides, que también son endomicorrizas, forman rollos de hifas que crecen en el interior de la célula, a esta estructura se le conoce como pelotón, los principales hongos con los que forman esta asociación pertenecen a las familias Tulasnellaceae y Ceratobasidiaceae (Brundrett y Tedersoo, 2018).

Se sabe que la presencia de adultos o juveniles de orquídeas puede ayudar al establecimiento de las plántulas, dando las condiciones necesarias al hongo de micorriza que ayuda a la germinación de las semillas (Rasmussen *et al.*, 2015); las especies que colonizan a las semillas pueden ser sustituidas por otras especies durante el ciclo de vida. Por ejemplo, Huang *et al.* (2018) encontraron que las semillas de *Dendrobium devonianum* germinan al asociarse con diferentes especies extraídas de las raíces de plantas adultas, pero solo una de ellas, ayudan a la formación del protocormo, y ninguna de ellas puede hacer que se desarrolle la plántula. Esto sugiere que esta orquídea requiere otro tipo de hongo para continuar con su desarrollo.

En la germinación, las micorrizas proveen a la semilla de carbono, nitrógeno y fósforo. Además, le ayudan a la captación y retención de agua. En tanto que las semillas ofrecen a los hongos protección, nutrientes y hormonas (Dearnaley y Cameron, 2017). Cuando las orquídeas se desarrollan, entonces los hongos proveen de compuestos nitrogenados, fosfatos y enzimas, a la vez que las orquídeas les dan a los hongos fotosintatos (Yeh *et al.*, 2019).

Variación de la comunidad fúngica asociada a orquídeas entre forofitos

Se ha encontrado que la presencia o ausencia de un hongo simbiote afecta la distribución de las orquídeas, por ejemplo, Otero *et al.* (2005) encontraron que la distribución de *Tolumnia variegata* (Sw.) Braem, estaba ligada a la disponibilidad de simbiontes fúngicos afines a esta especie de orquídea.

La comunidad fúngica asociada a orquídeas puede verse afectada por diferentes factores bióticos y abióticos (Xing *et al.*, 2020). El clima, la temperatura, el sustrato, o forma de vida, todas estas características tienen influencia sobre los hongos que se asocian a las raíces de orquídeas (Qin *et al.*, 2020). Se ha demostrado que la distribución de las orquídeas está ligada a la distribución de sus micobionte y la distribución de éstos, a su vez, está fuertemente influenciada por el forofito en donde crecen (Phillips *et al.*, 2020). En el caso de las orquídeas epífitas, estudios muestran que la diversidad de hongos cambia dependiendo de la especie de forofito; por ejemplo, Gowland *et al.* (2013) encuentran que la comunidad de hongos varía dependiendo del forofito al que se asocien, además que hay hongos que son específicos a una especie de árbol.

Por otra parte, el conjunto de características de cada árbol, así como dentro de diferentes partes del árbol, pueden afectar directamente a la comunidad de hongos. Así, por ejemplo, existen grupos de hongos que prefieren las partes altas del dosel, otras las ramas más delgadas, o las cortezas más fisuradas (Osono, 2014).

Metodología

Área de estudio

Este estudio se llevó a cabo en un bosque de encinos en la localidad de Tooxi en el municipio de Yanhuitlán, Oaxaca, México, localizado a los 96° 35' oeste y 17° 11' norte; a una altitud de 2,145 m s.n.m. (Figura 1). La temperatura media anual es de 19.9 °C y el promedio de lluvia anual es de 570 mm (Comisión Nacional del Agua, 2017). La época de lluvias comprende los meses de abril a diciembre. El tipo de vegetación es un encinar, donde el componente arbóreo está representado principalmente por especies de encinos como: *Quercus candicans* Neé, *Q. castanea* Née, *Q. crasifolia* Bonpl., *Q. laurina* Bonpl., *Q. rugosa* Née y *Q. martinezii* C.H. Mull.

Además, en la región podemos encontrar otras especies como *Juniperus flaccida* Schltld. y *Arbutus xalapensis* Kunth. Por su parte, la comunidad de epífitas está constituida por *Tillandsia bourgaei* Baker, *T. macdougallii* (L.B.) Sm., *T. plumosa* Baker, *T. prodigiosa* (Lem.) Baker, *T. recurvata* (L.) L., *T. usneoides* (L.), *Alamania punicea*, *Oncidium brachyandrum* Lindl. *Pleopeltis conzatti* (Weath.) R.M. Tryon y A.F. Tryon, y *Polypodium martensii* Mett. (Ramírez-Martínez, 2018)

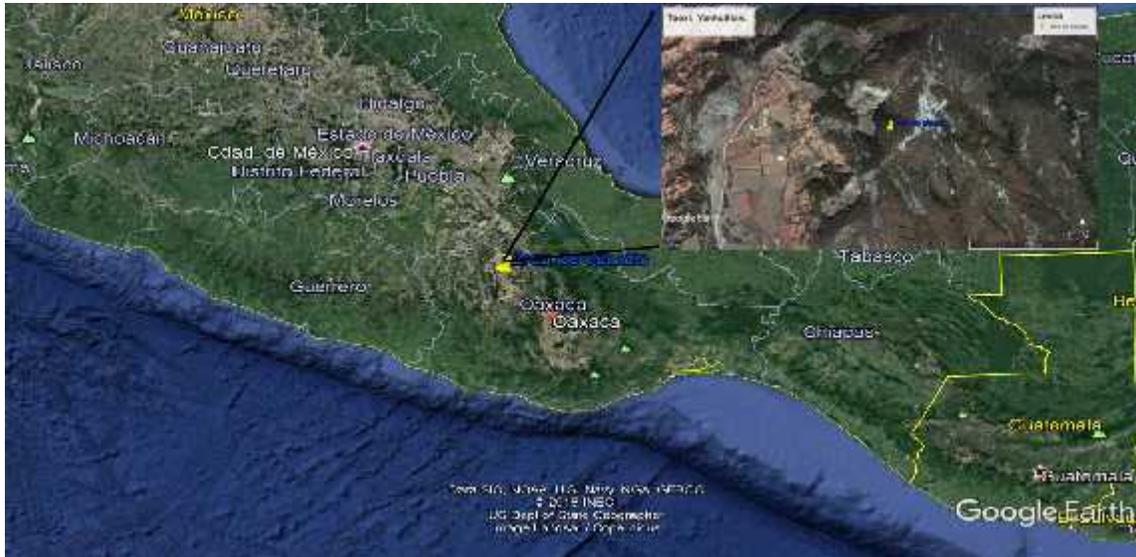


Figura 1. Área de estudio. En el recuadro grande se señala con un pin amarillo la localidad de Yanhuatlán, en el estado de Oaxaca; mientras que en el recuadro pequeño se señala el bosque de encino en Tooxi, Yanhuatlán, donde se realizó el estudio

***Alamania punicea.* Lex.**

Orquídea epífita; flores 7 a 14, rojas a rosado rojizas; capsula ovoide, de 14-17 mm de largo (Figura 2). Crece principalmente sobre encinos, a una altitud de entre 1,850 a 2,350 m s. n. m. su floración es de marzo a junio. Es una especie endémica de México. Se distribuye en los estados de Durango, San Luis Potosí, Querétaro, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Puebla, Veracruz y Oaxaca (García-Cruz *et al.*, 2003).



Figura 2 *Alamania punicea* creciendo sobre *Quercus rugosa* en un encinar de Tooxi, Yanhuatlán, Oaxaca.

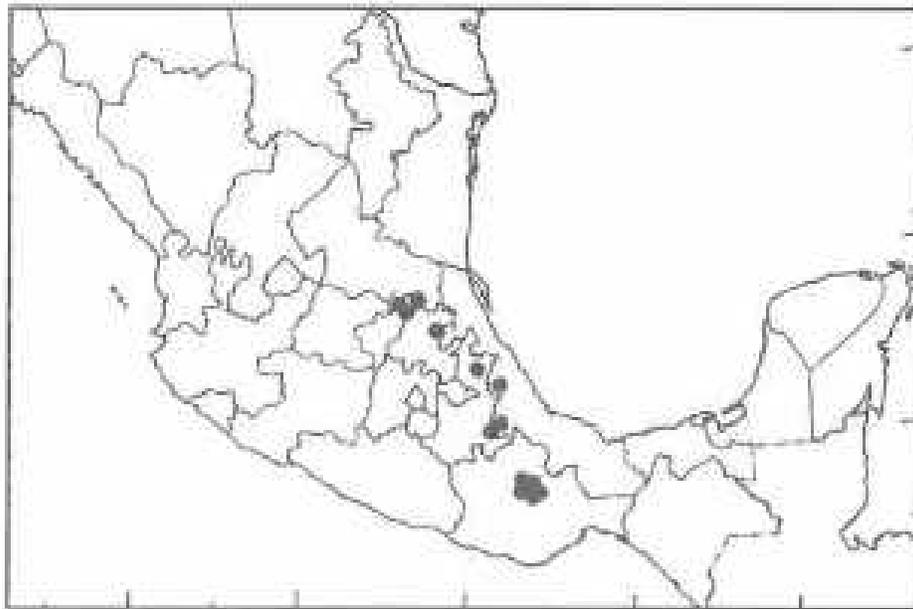


Figura 3.
Distribución de
Alamania
punicea dentro
de la República
Mexicana
(tomado de
Soto y Jiménez
2003)

Oncidium brachyandrum. Lindl.

Orquídea epífita; 3-5 flores, amarillas con manchas irregulares pardas; capsula elipsoide, 20 mm de largo; su floración es de febrero a mayo (Figura 4). Es una especie endémica de México, que habita en bosque de encino y pino-encino en una altitud de 1,700-2,500 m s. n. En la figura 5 se observa que se distribuye en los estados de Durango, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Morelos y Oaxaca (Jiménez, 2008).

a)



b)



Figura 4. a) *Oncidium brachyandrum* (Fotografía por Ávila-González, 2018). b) Floración de *O. brachyandrum* en un bosque de encinos en la comunidad de Tooxi Oaxaca.

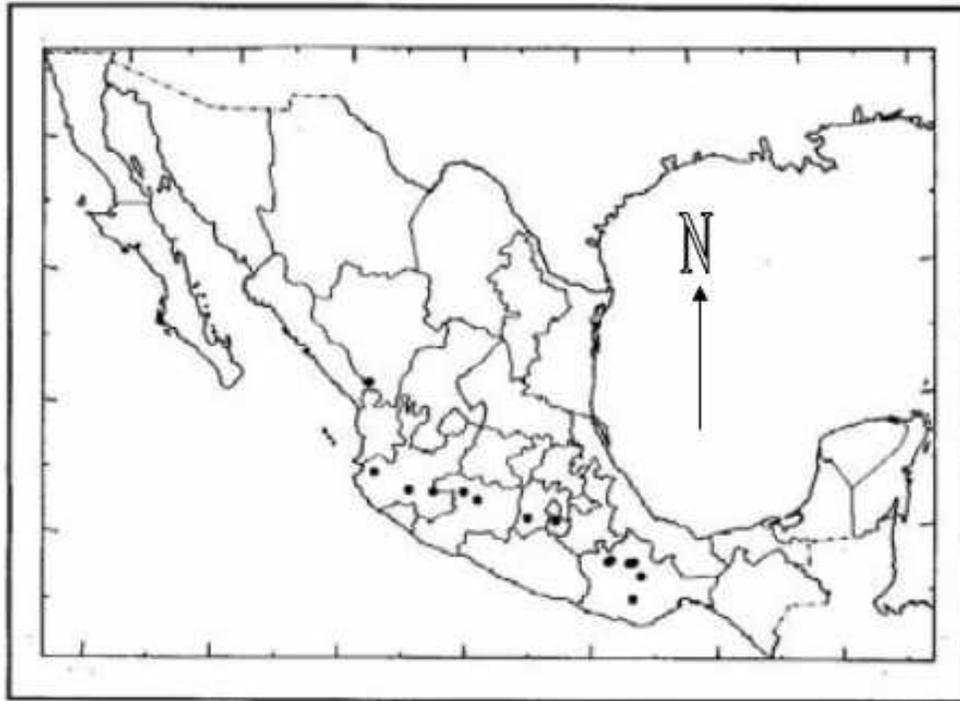


Figura 5 Distribución de *O. brachyandrum* dentro de la república mexicana (Tomado de Jiménez, 2008)

Forofitos

Para evaluar el efecto del forofito sobre la germinación de *O. brachyandrum* y *A. punicea* se eligieron a *Quercus castanea*, *Q. rugosa* y *Q. martinezii* (Mendoza *et al.*, 1994), ya que eran especies abundantes en la zona, poseían diferencias morfológicas visibles y diferían en su abundancia de individuos de orquídeas, *O. brachyandrum* presentó el 73 % de los individuos creciendo sobre *Q. martinezii*, el 26 % estuvieron en *Q. rugosa* y el 0% sobre *Q. castanea*. mientras que *A. punicea* presentó el 50% sobre *Q. martinezii*, el 50 % sobre *Q. rugosa* y el 0% sobre *Q. castanea* (Ramírez-Martínez 2018). Así, se observó que ambas especies de orquídeas son poco abundantes o inexistentes en *Q. castanea* y con mayor abundancia en las otras dos especies de encino.

Q. castanea

Árbol; altura de entre 5 y 15 metros con un diámetro de tronco de 30 a 60 cm; la lámina foliar es obovada, oblanceolada, con venas inferiores elevadas y reticuladas; la floración es de abril a mayo y su fructificación de agosto a diciembre (Valencia-Cuevas *et al.*, 2014); especie de amplia distribución a lo largo de la Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, Sierra Madre del Sur y el Eje Neovolcánico transversal una altura entre los 1,180 y 2,600 m s. n. m. (Valencia, 2004).

Q. rugosa

Árbol; altura en 10 a 30 m, con tronco de más de un metro de diámetro; hojas jóvenes con el haz rojizo y abundantes tricomas glandulares, envés con densa pubescencia; hojas maduras deciduas, coriáceas, rígidas, muy rugosas, elípticas, elíptico-obovadas, obovadas o casi sub-orbiculares; florece en agosto y fructifica en septiembre; se distribuye en: Aguascalientes, Coahuila, Chihuahua, Ciudad de México, Durango, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Veracruz (Rangel *et al.*, 2002).

Q. martinezii

Árbol; altura de 5 a 20 m con un diámetro de tronco de 20 a 45 cm; hojas oblongas a oblanceoladas; margen ondulado; haz verde grisáceo lustroso y pubescente; envés glauco-grisáceo y tomentoso; fructificación de julio a septiembre; especie endémica de México, se distribuye en Guerrero, Jalisco, Estado de México, Nayarit y Oaxaca (Arizaga *et al.*, 2009).

Caracterización de los forofitos

Física

a) Rugosidad de las cortezas de los forofitos

Para determinar la rugosidad se utilizó el método modificado de Callaway *et al.* (2002), el cual consistió en:

1. Se eligieron 10 individuos (septiembre 2019) aleatoriamente por especie de forofito, todas las lecturas se realizaron en la primera ramificación del árbol para homogenizar la lectura, ya que se sabe que la corteza varía en función del estrato y del tamaño.

2. Con la ayuda de una cinta métrica se midieron 20 cm lineales en forma transversal a la rama.
3. En esos 20 cm con la ayuda de hilo de pesca de 0.4 mm de diámetro y con la ayuda de un vernier, se midió la profundidad de cada hendidura a lo largo de esos 20 cm anotándose cada una de ellas, la rugosidad total fue la sumatoria de todas las profundidades por árbol, sacándose la media y desviación estándar de los 10 árboles utilizados para tener la rugosidad de cada especie de forofito.

Química

a) Medición de pH

Para realizar la medición de pH de las cortezas de las especies de forofitos se colectaron diez muestras de corteza por especie de árbol (Septiembre 2019), las cuales fueron tomadas a la misma altura (1,60 m); cada individuo representa una repetición. Se dejaron secar por cinco días, después de ese tiempo se molieron hasta pasar por una criba de 3 mm de luz de malla. Para medir el pH de las cortezas se siguió el método de Kricke (2002) el cual fue el siguiente:

1. Se suspendieron 0.5 g de corteza molida en 5 mL de agua desionizada.
2. La suspensión se dejó por cuatro horas, agitando cada hora manualmente.
3. Después de las cuatro horas, la mezcla se filtró y se evaluó el pH con un potenciómetro de la marca Hanna.

b) Determinación de compuestos alelopáticos

1. Se colectaron seis muestras de corteza de diferentes individuos por especie de forofito (enero 2020)
2. Las cortezas dejaron secar durante una semana en el laboratorio de epifitas vasculares en el CIIDIR Oaxaca.
3. Una vez secas se pulverizaron con la ayuda de molino eléctrico de la marca *Nutribullet*
4. Para determinar los compuestos presentes en las cortezas, se realizó la prueba sobre el polvo obtenido y sobre los extractos utilizados en la prueba de germinación.

5. Para el polvo de las cortezas la dilución se realizó con etanol al 80%, mientras que los extractos fueron hechos con agua destilada.
6. Se realizaron tres replicas por forofito tanto para las muestras del polvo de corteza como para los extractos.

Para determinar la presencia de (Ac. gálico) se realizó mediante la técnica método colorimétrico de Folin-Ciocalteu modificado por Singleton y Rossi (1965); en tanto que las Catequinas que han sido reportadas como alelopáticas (Valencia-Díaz *et al.* 2010) se obtuvieron mediante el método de Zhishen *et al.* (1999). Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro de la marca *VELAB*.

Colecta de semillas

En marzo de 2019 se colectaron seis cápsulas maduras de *O. brachyandrum* y en enero de 2020 cinco cápsulas maduras de *A. punicea*. Todas las cápsulas provenían de individuos creciendo sobre diferentes forofitos. Las cápsulas se guardaron en una bolsa de papel de estraza y se etiquetaron con datos de la especie, fecha de colecta y localidad, y fueron transportadas al laboratorio de epífitas del CIIDIR-Oaxaca, donde se extrajeron las semillas siguiendo el método de Salazar y Gélvez (2015). Posteriormente las semillas fueron almacenadas en sobres de papel de estraza a 4° C en un recipiente plástico con 10 g de sílica gel.

Evaluación de viabilidad

Se evaluó la viabilidad de las semillas mediante la prueba de tetrazolio al 1% (Cruz-Higareda *et al.*, 2015), para esto se utilizaron 0.5 cm³ de semillas, el volumen se midió con la ayuda de un tubo *ependorf* graduado y se realizaron cinco repeticiones por cada especie de orquídea.

Evaluación del efecto de extractos acuosos de *Q. castanea*, *Q. rugosa* y *Q. martinezii* sobre las tasas de germinación de semillas y desarrollo de protocormos de *O. brachyandrum* y *A. punicea in vitro*.

a) Obtención de muestras de cortezas de forofitos y preparación de extractos acuosos.

Para la colecta de las cortezas se eligieron aleatoriamente seis individuos por especie de forofito (febrero 2019), cada árbol representó una repetición. A cada repetición se les aplicó el siguiente procedimiento:

1. A una altura de 1,60 m se delimitó un cuadro de 10*10 cm, del cual se desprendió la corteza con la ayuda de un serrote, un martillo y un cincel; posterior al desprendimiento, cada corteza se envolvió en papel de estraza, se aseguró con cinta adhesiva en los cuales se pudieron los datos de colecta.
2. Las cortezas colectadas fueron llevadas al laboratorio de epífitas vasculares del CIIDIR Oaxaca, en donde se les retiraron los musgos y líquenes. Posteriormente, con la ayuda de tijeras de poda y guantes, cada corteza fue cortada en trozos pequeños; una vez cortadas en trozos se dejaron secar a temperatura ambiente, por una semana, dentro del laboratorio.
3. Una vez secas se pulverizaron las cortezas hasta pasar por una criba de 3 mm de luz de malla, en un molino eléctrico de la marca *Nutri Bullet*. Las aspas se limpiaron con etanol de 96 ° con una piseta y algodón con el fin de evitar contaminación entre muestras. Una vez limpio, se comenzó a moler cada muestra de corteza en porciones pequeñas, durante 30 segundos para evitar que las aspas se calentaran.
4. El polvo de corteza se vació en un frasco ámbar de plástico con la ayuda de una brocha de una pulgada, para recuperar la mayor cantidad. Una vez terminado este proceso, cada frasco se cerró bien y se selló para evitar que se humedecieran; cada frasco se colocó en el congelador hasta el siguiente procedimiento.

5. Para el proceso de extracción se colocaron 100 g de corteza molida con 200 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer cubierto con papel aluminio y etiquetado con los datos correspondientes (especie de árbol y número de repetición). Cada matraz se le colocó en un agitador magnético en agitación constante durante 24 h.
6. Los extractos obtenidos fueron filtrados con un embudo de porcelana y papel filtro y colocados en frascos ámbar de vidrio, los cuales se etiquetaron y se sellaron.

A partir de esos extractos acuosos, se realizaron tres concentraciones para cada uno de ellos, para lo cual se agregaron 10, 100 y 1000 μ L de cada extracto en 10 mL de agua destilada estéril y un control el cual no contenía ningún extracto únicamente agua destilada.

Para la germinación *in vitro* de las semillas se utilizó el medio de cultivo Kundson C (Knudson, 1922). El medio de cultivo se vació en tubos de ensayo esteriles de 8 mL, en cada tubo se vaciaron 6 mL de medio, los tubos se cubrieron con tapones de algodón y gasa; una vez vaciado el contenido, se dejaron los medios a temperatura ambiente durante tres días para descartar aquellos con contaminación. Después de este tiempo, los medios se colocaron en refrigeración 3°C hasta que se utilizaron.

Se realizaron 10 repeticiones por cada tratamiento, cada repetición consistió en un lote de 100 semillas. Los lotes de semillas se hicieron, contando las semillas en un microscopio estereoscópico Marca Baitronyx (modelo WF 10x/20) sobre una caja de Petri adaptada con papel milimétrico en la base a manera de cuadrícula, la caja de Petri estaba adaptada con una ranura de 1.3 cm en la orilla de la caja (la ranura corresponde al ancho de la boca del tubo *ependorf* de 1.5cm³), para vaciar las semillas contadas directamente a un tubo *ependorf* con la ayuda de un pincel, para posteriormente esterilizarlas.

Los lotes de semillas se esterilizaron con una solución de 5 mL de hipoclorito de sodio al 6%, 5 mL de etanol al 96% y 90 mL de agua destilada. Para lo cual en cada uno de los tubos *ependorf* que contenían los lotes de semillas, se agregó con una pipeta pasteur de 5ml, la cantidad de 1.5 cc por tubo, enseguida se cerraron tubo y se agito vigorosamente durante 1 minuto; se dejaron en reposo para que las semillas sedimentaran al fondo del tubo y con una pipeta Pasteur se extrajo la solución esterilizante. Posteriormente a cada tubo se le agrego un 1.5 cc de agua destilada estéril y se agito vigorosamente durante 1 minuto, después se dejó reposar durante 1 minuto y se extrajo el agua, dicho procedimiento se repitió por segunda ocasión; para el segundo enjuague se repitió el procedimiento. Después del segundo lavado, se dejaron sedimentar ligeramente para posteriormente ser vaciadas en un tubo de ensayo con medio de cultivo ya preparado con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril.

Una vez que se tuvieron las diluciones de cada tratamiento, con una pipeta Pasteur para cada tratamiento se colocó una gota de solución sobre las semillas ya sembradas. Los tubos se mantuvieron a en condiciones de luz (12 horas) y temperatura promedio (24.2°C) dentro del laboratorio (chechar las horas luz y la temperatura. La variable a evaluar en el experimento fue el tránsito de semillas a las diferentes etapas germinativas, el cual fue calculado mediante la siguiente formula modificada de Soleymani y Shahrajabian (2018):

$$\%T = \frac{N}{N} \times 100$$

%TEG: porcentaje de tránsito de etapa germinativa

NS: número de semillas

i=etapa germinativa previa

j=etapa germinativa posterior

Debido a que en el año 2019 no fue posible coleccionar semillas de *A. punicea* el experimento fue realizado de febrero a abril del 2020, llevándose a cabo la metodología aplicada para *O. brachyandrum*.

Germinación *in situ* de *O. brachyandrum* sobre *Q. castanea*, *Q. rugosa* y *Q. martinezii*

Para evaluar el porcentaje de germinación en campo, se realizó el siguiente procedimiento:

1. En el laboratorio se hicieron 60 lotes, cada uno de ellos con 100 semillas de *O. brachyandrum*, los cuales fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5 cm³.
2. Se seleccionaron 60 árboles de manera aleatoria, 20 por cada especie de forofito, cada forofito fue tomado como una repetición.
3. Enseguida se utilizaron cuadros de malla agribon+ 6 * 6 cm, cada pieza se colocó sobre un árbol. Una vez colocados los cuadros, se aseguraron con tiras de tela adhesiva de manera que sólo cubrieron dos lados del cuadrado. Se le colocó un pin en cada esquina del cuadro para sujetar la malla
4. Al terminar el paso anterior, las orillas fueron selladas con pegamento blanco líquido; cuando éste se secó, se le colocó la tela adhesiva en las orillas de la malla.
5. En cada árbol se vació un lote de semillas en la corteza, para lo cual se colocó agua destilada al tubo eppendorf con la ayuda de una pipeta Pasteur y se agitó el tubo, se esperó a que se sedimentara, con la pipeta se tomó el contenido y se vació sobre la corteza por el lado de arriba del cuadro previamente puesto; para asegurar que todo el contenido del tubo se vaciará a la corteza, se repitió el procedimiento.
- 6.-Se realizó seguimiento cada dos días, del 29 abril al 25 de mayo del 2019, con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de germinación sobre cada especie de forofito.

Determinación de la comunidad de hongos asociados presentes en individuos adultos de *O. brachyandrum* creciendo sobre *Q. castanea*, *Q. rugosa* y *Q. martinezii*

Debido a que se obtuvieron muy pocos protocormos en campo, se decidió explorar la comunidad de hongos presentes en las raíces de individuos adultos de *O. brachyandrum*, debido a que se ha reportado que en raíces de plantas adultas puede haber hongos capaces de promover la germinación (Gao *et al.*, 2020), para lo cual se determinó el porcentaje de

colonización de las raíces de individuos creciendo en cada especie de forofito y posteriormente se aislaron e identificaron los géneros de hongos presentes en las raíces.

Para poder llevar acabo dichos experimentos, primeramente, en campo, se colectaron tres tramos de raíz de 6 cm por individuo, cada individuo fue una repetición; en total fueron diez repeticiones para orquídeas creciendo en *Q. rugosa* y *Q. martinezii*, mientras que para *Q. castanea* el total solo fue de seis, debido a que no fue posible encontrar otros árboles de esta especie con individuos adultos de *O. brachyandrum* en la zona de estudio. El muestreo se hizo únicamente con individuos adultos y solo se colectaron raíces que estuvieran en contacto directo con la corteza.

a) Determinación del grado de colonización de raíces de individuos de *O. brachyandrum* creciendo sobre *Q. rugosa*, *Q. martinezii* y *Q. castanea*

Para determinar el grado de colonización de las raíces se modificó la técnica de tinción con azul de tripano de Barrow y Aaltonen (2004), de tal forma que se siguió la siguiente metodología:

1. Se realizaron cortes transversales de las diferentes raíces.
2. Los cortes fueron colocados en tubos de ensayo, cada tubo etiquetado con el forofito y el número de repetición.
3. A cada tubo se le adicionó 3 mL de KOH al 10%. Enseguida se les aplicó calor en un horno de microondas 6 s por dos veces. Después del paso anterior los cortes fueron lavados dos veces con agua corriente.
4. Al terminar el lavado se le agregó agua oxigenada a cada tubo. Del mismo modo que el paso tres se les aplicó calor con un horno de microondas 6 segundos por dos veces.
5. Enseguida se retiró el agua oxigenada, se lavaron con agua corriente y se les colocó HCl al 10% durante 5 minutos.
6. Al pasar los 5 minutos se retiró el HCl y se les colocó el azul de tripano al 0.05% en glicerol y ácido láctico durante 3 minutos.

7. Una vez teñidos los cortes fueron montados en portaobjetos y fijados con una solución 1:1:1 de glicerina, agua destilada y alcohol de 96°.
8. Las muestras fueron observadas en microscopio estereoscópico (Marca Baitronyx modelo WF 10x/20) a 10X, se les tomó fotografías.
9. Se eligió un corte por repetición, con la ayuda del programa imageJ se realizó el conteo de células con y sin pelotones. Este procedimiento se realizó mediante cuadrantes ajustados a 25,000 píxeles y únicamente se contaron las células presentes en el córtex.

b) Aislamiento de hongos simbioses presentes en raíces de *O. brachyandrum*
Para aislar los hongos se utilizaron los medios de cultivo FIM (Cuadro 1) y PDA (Cuadro 2) de Cando y Cárdenas (2017) los cuales fueron como sigue:

Cuadro 1 Ingredientes para preparar medio de cultivo Fungal Isolation Media (FIM), utilizado para la siembra de raíces de *O. brachyandrum*

| Ingrediente | Cantidad |
|--------------------------|----------|
| Nitrato de sodio | 0.3gr |
| Cloruro de potasio | 0.1gr |
| Fosfato ácido de potasio | 0.2gr |
| Sulfato de magnesio | 0.1gr |
| Extracto de levadura | 0.1gr |
| Azúcar | 2.5gr |
| Ceftriaxona 500mg | 5mL |
| Agua destilada | 1000mL |

Cuadro 2 Ingredientes para preparar Medio de cultivo Papa Dextrosa Agar para la siembra y purificación de aislados de las raíces de *O. brachyandrum* (PDA)

| Ingredientes | Cantidad |
|--------------|----------|
|--------------|----------|

| | |
|-------------------|--------|
| Infusión de papa | 200 gr |
| Dextrosa | 20 gr |
| Agar | 15gr |
| Ceftriaxona 500mg | 5mL |
| Agua destilada | 1000mL |

1. De las muestras obtenidas para la tinción se ocuparon segmentos de 1 cm de raíz de *O. brachyandrum*, los cuales fueron cortados en 0.25cm.
2. Los cortes fueron esterilizados con etanol al 70% durante un 1 min, hipoclorito de sodio al 5% por 1 min. Después se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril.
3. Después del procedimiento de desinfección los cortes se sembraron en medio FIM, las cajas de Petri se etiquetaron con la especie del forofito, el número de repetición y la fecha de siembra.
4. Con el paso de los días las hifas comenzaron a crecer y formaron colonias, las colonias fueron separadas y resembradas en medio de cultivo PDA.
5. Se purificaron las colonias, esto es, una vez que hubo crecimiento se resembró en un medio nuevo, este procedimiento se repitió cuatro veces por cada colonia.
6. Al terminar la fase de purificación se registraron las características macro y microscópicas de cada colonia.
7. Con las diferentes características se utilizó la clave de hongos imperfectos de Romero-Cova (1993), Arditti y Pridgeon (1997) y Barnett y Hunter (1998) para determinar el género de los hongos asilados.

Análisis estadísticos de los datos

Los datos cuyos resultados están expresados en porcentaje (viabilidad, germinación *in vitro* e *in situ* y colonización de raíces de *O. brachyandrum*) se transformaron al arco seno de la raíz cuadrada para normalizarlos (Khodarahmpour *et al.*, 2011).

Posteriormente con ayuda del programa *SPSS* se aplicaron las diferentes pruebas estadísticas:

Con los datos de pH se aplicó una prueba de Kolmogorov-Smirnov, debido a que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Para la composición química (Ac. gálico y catequinas) de las cortezas de los encinos se les aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para corroborar la normalidad, posteriormente se aplicó un ANOVA de un factor seguido de una prueba de Tukey.

Los estadísticos que se aplicaron a los datos de rugosidad fueron Kolmogorov-Smirnov para corroborar la normalidad, seguida de un ANOVA de un factor y una prueba de Tukey.

A los datos de la germinación *in vitro* de *O. brachyandrum* se les aplicó Kolmogorov-Smirnov para corroborar su distribución normal; enseguida se comprobaron los supuestos para el análisis de covarianza (Colinealidad, homogeneidad de las pendientes), enseguida se les aplicó un ANCOVA, tomado como factor los forofitos, la variable respuesta fue la germinación y la covariable fue la concentración aplicada a cada tratamiento. Después de aplicar el análisis de covarianza se aplicó la prueba de DMS (diferencia mínima significativa) para determinar el nivel de significancia estadística.

Para comparar los datos de germinación de *O. brachyandrum* expuestas a las diferentes concentraciones de extractos de las cortezas de un mismo forofito se les aplicó una prueba de Kolmogorov-Smirnov, esto para corroborar su distribución normal; enseguida se aplicó un ANOVA de una vía, donde el factor fue concentración y la variable dependiente la germinación.

Con los valores del porcentaje de tránsito de las diferentes etapas germinativas se aplicó una prueba de Kolmogorov-Smirnov, seguida de un ANOVA de una vía; en el caso de encontrar diferencias estadísticas se aplicó una prueba de Tukey para determinar el nivel de significancia.

Resultados y discusión.

Caracterización de los forofitos

Existen diferencias físicas y químicas de las tres especies de forofitos (Cuadro 3). Se adicionaron características de los tres forofitos con base a la literatura y comunicaciones personales, que permite la presencia de ligeras variaciones en el microclima dentro de sus copas.

Cuadro 3. Caracterización física, química y microclimático de *Q. castanea*, *Q. rugosa* y *Q. martinezii* en un bosque de encino en Tooxi Oaxaca. Las letras mayúsculas diferentes en las columnas de características químicas, representan diferencias estadísticas significativas entre forofitos, con una $p < 0.05$

| Características | | | | | | | | |
|----------------------|------------------|---------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|----------------|--------------------------------|------------------|
| Químicas | | | | | | Físicas | | |
| Especie de encino | pH | Catequinas mg/gr extracto | Catequinas mg/gr (polvo de corteza) | Ac. gálico en extracto | Ac. Gálico mg/gr (polvo de corteza) | Rugosidad (cm) | Tipo de corteza | Caducifolia |
| <i>Q. castanea</i> | 6.8±1.03 n.s. | 0.390±0.06A | 2.998±0.035 *A | 5.4±0.039 A | 22.303±0.148 *A | 3.92±0.79A | Delgada y ligeramente fisurada | Caducifolia |
| <i>Q. rugosa</i> | 6.7±0.4n. s | 0.048±0.01B | 0.479±0.004 *B | 0.435±0.021 B | 1.529±0.068* B | 5.53±1.8B | Gruesa y muy fisurada | Semi-caducifolia |
| <i>Q. martinezii</i> | 6.7±0.4n. s | 0.049±0.001 B | 0.510±0.007 *B | 0.402±0.06B | 2.150±0.118* B | 5.87±1.2B | Gruesa, escamosa, y fisurada | Perennifolia |

** $p < 0.05$

Física

a) Rugosidad

Las cortezas más rugosas, la tuvieron individuos de *Q. rugosa* y *Q. martinezii*, presentando una rugosidad entre 8-9 cm, sin embargo, al realizar las pruebas estadísticas se encontraron diferencias entre ellas ($F = 10.2$, g. l. =2, $p < 0.05$). Por otra parte, *Q. castanea* (4.47) tuvo la menor rugosidad con un valor entre 4-6 cm, presentando diferencias significativas tanto con *Q. rugosa* (7.4), como con *Q. martinezii* (7.9), (cuadro 3).

La rugosidad es una característica física importante al momento del establecimiento y desarrollo de las semillas de las orquídeas epífitas. Diversos estudios como el de De la Rosa-Manzano *et al.* (2014) muestran que muchas orquídeas tienen preferencia por árboles con mayor rugosidad en sus cortezas; en tanto que Callaway *et al.* (2002) encuentran una correlación entre la rugosidad de la corteza de diferentes hospederos con la preferencia de diferentes plantas epífitas; esto pudiera explicar por qué Ramírez-Martínez 2018, encontró una mayor cantidad de plántulas en *Q. martinezii*, y *Q. rugosa*, las cuales presentaron la mayor rugosidad.

Una característica asociada a la rugosidad es el arreglo propio de las fisuras. Zárate-García *et al.* (2020) encontraron que las orquídeas tienen preferencia por árboles con cortezas rugosas y con fisuras lineales, en contraste con las cortezas escamosas. Esto concuerda con las características físicas de las cortezas de *Q. rugosa* y la preferencia de *O. brachyandrum* por esta especie de encino.

La rugosidad es importante al momento de establecerse, porque una corteza más rugosa puede proporcionar microambientes idóneos para el proceso germinativo de las orquídeas, además de proporcionar microclimas para los hongos de micorriza. La temperatura, así como la incidencia de luz, son importantes en la germinación de algunas orquídeas epífitas como lo muestran Tsutsumi *et al.* (2011), en su experimento orquídeas epífitas de género *Liparis*,

las cuales presentaron una mayor germinación en oscuridad y temperatura constante de 20 °C, de esta manera los árboles podrían favorecer la germinación proporcionando sitios más oscuros y con una temperatura más constante. Además, como Harshani *et al.* (2013) muestran, estas características físicas de los hospederos pueden tener una influencia positiva al momento del establecimiento. De esta manera *Q. rugosa* y *Q. martinezii* pueden estar proporcionando lugares idóneos en las oquedades dentro de sus cortezas para el establecimiento de las semillas de *O. brachyandrum*.

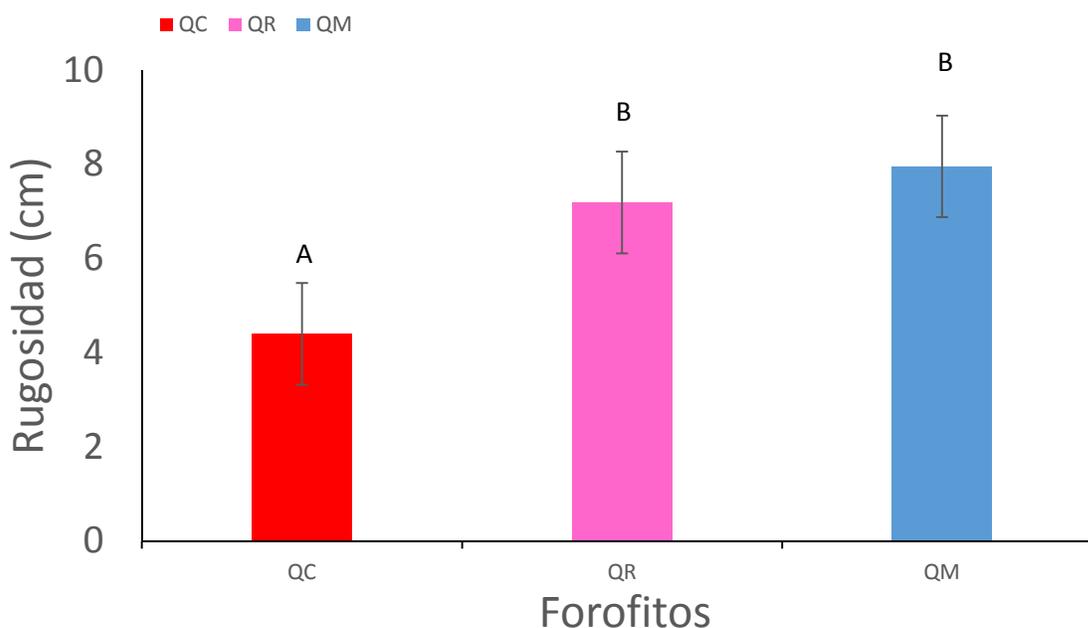


Figura 6. Rugosidad promedio de cortezas de *Q. castanea* (QC), *Q. rugosa* (QR) y *Q. martinezii* (QM) presentes en el Tooxi. Las letras mayúsculas representan las diferencias estadísticas entre las cortezas de los diferentes forofitos ($p > 0.05$). Las líneas de dispersión son la desviación estándar.

Química

a) pH de las cortezas

Los resultados muestran que los valores de pH de las cortezas de los distintos forofitos fueron ligeramente ácidos de 6.6 a 6.8 y no difiere entre ellos ($F = 0.065$, g. l. = 2, $p > 0.05$). Estos valores de pH, concuerdan con estudios como el Adhikari y Fisher (2011), en donde individuos de *Rhynchostylis retusa* tienen preferencia por forofitos con pH de corteza de 6.15 y 6.61; y el de

Arditti (1967) quien menciona que el pH óptimo para la germinación de orquídeas es entre 4.8 y 5.2.

b) Composición química:

El extracto acuoso de *Q. castanea* presentó la mayor concentración de Ac. Gálico (cuadro 3), la cual difirió estadísticamente de *Q. rugosa* y *Q. martinezii* ($F = 30994.2$, g. l. = 2, $p < 0.05$). Es importante señalar que la composición química de los arboles está relacionada con las características propias del ambiente donde crecen los árboles, así como las fluctuaciones climáticas, ya que, como la menciona Steinbauer *et al.* (2015). especies del género *Eucalyptus* tienen diferentes concentraciones de metabolitos secundarios dependiendo del lugar donde habitan, así como de las fluctuaciones medioambientales propias de las diferentes áreas de estudio, mientras que Gustafsson y Eriksoo (1995) reportan que la composición química de la corteza de *Populus tremula* L. está relacionada con las características propias del suelo en donde crecen.

La mayor concentración de catequinas se registró en cortezas de *Q. castanea* (cuadro 6), y difirió estadísticamente de *Q. rugosa* y *Q. martinezii* ($F = 14581.7$ g. l. = 2, $p < 0,05$). Lo que pudiera estar explicando, porque en esta especie crecen tan pocas orquídeas epífitas; ya que, como reportan lo Valencia-Díaz *et al.* (2010) y Harshani *et al.* (2014), concentraciones altas de flavonoides poseen un efecto inhibitorio en la germinación de diferentes plantas epífitas.

Viabilidad de *O. brachyandrum* y *A. punicea* en laboratorio

La viabilidad (Anexo I) de las semillas de orquídeas en general tiende a ser alta en laboratorio lo que concuerda con la viabilidad de *O. brachyandrum* ($93 \pm 1.61\%$) como las de *A. punicea* ($89\% \pm 4$) presentaron valores altos de viabilidad con la prueba de tetrazolium. Lo que concuerda con lo mencionado por Galdiano *et al.* (2013), quienes encuentran que la viabilidad de *Oncidium flexuosum* Sims es superior al 90%. En el caso de *A. punicea* desafortunadamente no existen registros previos de viabilidad en este género con los cuáles comparar los resultados reportados.

Efecto de los extractos acuosos en la germinación de *O. brachyandrum*

Variación entre forofitos:

Se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes totales de germinación de *O. brachyandrum* sobre los extractos de *Q. rugosa*, *Q. Castanea* y *Q. martinezii* ($F=4.611$, $g.l.=3$, $P<0.05$). Lo que nos indica un efecto del forofito sobre la germinación de esta orquídea.

De manera particular, se observa que el porcentaje de germinación del control fue de 77.3 ± 15.42 , y difirió únicamente con el porcentaje de germinación de *Q. castanea* en concentraciones medias y altas ($F=3.611$, $g.l.=3$, $p<0.05$), (Cuadro 4), la variación en los porcentajes de germinación entre las concentraciones de los diferentes extractos de *Q. castanea* y control, pudiera estar relacionada con un efecto inhibitorio de los extractos de este encino en la germinación de *O. brachyandrum*, esto concuerda con lo reportado por Harshani *et al.*, 2014, cuyos resultados muestran que la germinación de *Dendrobium aphyllum* es inhibida por los extractos de cortezas de árboles no hospederos, y en el caso de los hospederos presenta inhibición al aumentar la concentración. Esto puede deberse a que las concentraciones de fenoles y flavonoides (cuadro 3) son mayores en las cortezas de *Q. castanea*, lo que inhibe la germinación de *O. brachyandrum*. Se ha reportado que los fenoles tienen un efecto inhibitorio en la germinación de diferentes plantas (John y Sarada 2012).

Valencia-Díaz *et al.*, (2010) reportan que a altas concentraciones de catequinas existe un efecto inhibitorio en la germinación de *Tillandsia recurvata*, esto puede explicar por qué existe una diferencia en la germinación entre los extractos de *Q. castanea*, el control y los extractos de *Q. rugosa* y *Q. martinezii*.

Por otra parte, este resultado difiere de lo reportado por Frei y Dodson (1972), ellos reportan que la corteza de *Q. castanea* presenta menor cantidad de compuestos fenólicos (ac. gálico), además que es en donde crecen diferentes orquídeas epifitas; esta diferencia en resultados puede deberse que la cantidad de metabolitos secundarios está relacionado con el ambiente en el cual se desarrollan, esta relación entre el ambiente y los metabolitos secundarios se menciona en artículos como el de Li *et al.*, (2020)

Cuadro 4. Porcentaje de germinación total de *O. brachyandrum* sobre medio Knudson adicionado con diferentes concentraciones de extractos acuosos de tres especies de forofitos. Las letras mayúsculas muestran diferencias estadísticamente significativas entre forofitos a una misma concentración (renglones), mientras que las minúsculas señalan diferencias entre concentraciones dentro de un mismo forofito (columnas).

| Concentración ($\mu\text{L/mL}$) | <i>Q. castanea</i> | <i>Q. rugosa</i> | <i>Q. martinezii</i> |
|---------------------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| Control | 77.3 \pm 15.42A | 77.3 \pm 15.42A | 77.3 \pm 15.42 |
| 0.1 | 61.3 \pm 13.7Aa | 67.1 \pm 22.5Aa | 61 \pm 15.9Aa |
| 1 | 49.5 \pm 9Bb | 62.7 \pm 16.8Aa | 76.1 \pm 21.8Aa |
| 100 | 52.8 \pm 6.6Bb | 63.2 \pm 7.3Aa | 73 \pm 6.5Aa |

Variación del porcentaje tránsito en las etapas germinativas

Se observó que el efecto de los extractos acuosos no fue el mismo a lo largo del proceso de desarrollo (Figura 7). Así, en *Q. castanea* la imbibición se encontraron valores de tránsito 99 \pm 1 %(0.1), 99 \pm 1 %(1), 99 \pm 1 %(100) , los cuales no difirieron estadísticamente el control 98 \pm 2 (F=1.260, gl=3 P> 0,05).

En la etapa de la ruptura de testa los valores de tránsito fueron en el control fueron de 99 \pm 1 %(0.1), 98.7 \pm 1.44 %(1), 99 \pm 1 %(100), los cuales no difirieron del control 98 \pm 2 (F=0.891,

gl=2, $p>0.05$). En la etapa de la formación del protocormo los valores de tránsito fueron 56.4 ± 12.2 (0.1), 74.8 ± 15.3 (1) y 72.5 ± 14.8 (100), los cuales no difirieron estadísticamente del control 73.7 ± 14.6 (0.393, gl.=3, $p>0.05$). En la etapa de desarrollo del protocormo los valores de tránsito fueron 32.3 ± 12 (0.1), 17.7 ± 5 (1) y 15.9 ± 5.9 , los cuales difirieron del control 20.7 ± 4 a concentración media y alta ($F=4.681$, gl.=3, $p<0.05$).

En tanto que para *Q. rugosa* en la imbibición se encontraron valores de tránsito de 98.6 ± 1 (0.1), 99.4 ± 0.6 (1) y $98.21.8$ (100) los cuales no difirieron del control 98.7 ± 1.3 ($F=0.877$, gl.=3, $p>0.05$). En la ruptura de la testa los valores de tránsito fueron 99 ± 1 (0.1), 98.1 ± 1.2 (1) y 92.9 ± 11.4 , los cuales no difirieron del control 98 ± 2 (0.877, gl.=3, $p>0.05$). En la etapa del formación del protocormo los valores de tránsito fueron 54 ± 7.3 (0.1), 57.7 ± 13.8 (1) y 65.4 ± 21.7 (100), los cuales no difirieron del control ($F=2.95$, gl.=3, $p>0.05$). En la etapa del desarrollo del protocormo los valores de tránsito a esta etapa fueron 25.4 ± 11 (0.1), 25.7 ± 10 (1) y 25.8 ± 9 (100), los cuales no difirieron del control 20.7 ± 9 ($F=0.573$, gl.=3, $p>0.05$).

Los resultados de *Q. martinezii* en la imbibición los valores fueron de 99.3 ± 1 (0.1), 99.6 ± 0.9 (1) y 98.6 ± 1.3 (100) los cuales no difirieron de control 98 ± 2 ($F=0.657$, gl.=3, $p>0.05$). la etapa de ruptura de testa los valores fueron 98.9 ± 1.6 (0.1), 99 ± 1 (1) y 98.6 ± 1.2 (100), los cuales no difirieron del control 97.6 ± 2.8 ($F=0.859$, gl.=3, $p>0.05$). En la etapa de formación del protocormo los valores fueron 79.2 ± 10.5 (0.1), 96.5 ± 7.3 (1) y 87.1 ± 9.5 (100), los cuales difirieron del control 81.8 ± 11.5 (100) ($F=5.683$, gl.=3, $p<0.05$). En la etapa del desarrollo del protocormo los valores fueron 38.9 ± 14 (0.1), 23.3 ± 7.7 (1) y 18.6 ± 5.2 (100), los cuales difirieron del control 20.7 ± 9 ($F=7.54$, gl. 3, $p<0.05$).

El echo de que no hubiera diferencias en los tratamientos en la etapa de imbibición pudo deberse a que el único requerimiento en esta fase es agua (Yeung *et al.*, 2018), por lo que el medio de cultivo proporciona la humedad necesaria para transitar por este estadio. En la

ruptura de la testa tampoco se encontraron diferencias entre los diferentes tratamientos, esto puede deberse a que en esta fase el metabolismo de los embriones pudo activarse debido a la presencia del agua en el medio de cultivo, la cual pudo haber roto la dormancia y así continuar con el desarrollo embrionario (Lee *et al.*, 2015).

El tránsito a la fase de formación de protocormo, el no haber presentado diferencias en esta fase puede deberse a que el medio de cultivo soporta el desarrollo hasta esta fase en *O. brachyandrum*, el medio Knudson C ha sido probado en la germinación de orquídeas epífitas como *Catasetum macrocarpum* Rich. ex Kunth ha mostrando efectividad en la germinación y formación del protocormo (Ferreira *et al.* 2018). En la fase del desarrollo del protocormo si hubo diferencias en el tránsito de etapa germinativa al comparar los diferentes volúmenes de extractos de cortezas de cada forofito. Se presentó menor tránsito a concentraciones mayores, esto puede estar ligado a el contenido de compuesto químicos (catequinas y ac. gálico) presentes en los extractos de las cortezas de los encinos (cuadro 3), los cuales hayan tenido un efecto inhibitorio, como se menciona en Valencia-Díaz *et al.* en donde la concentración de catequinas presentes en la corteza de *I. murucoides* tiene un efecto inhibitorio en la germinación de *T. recurvata*.

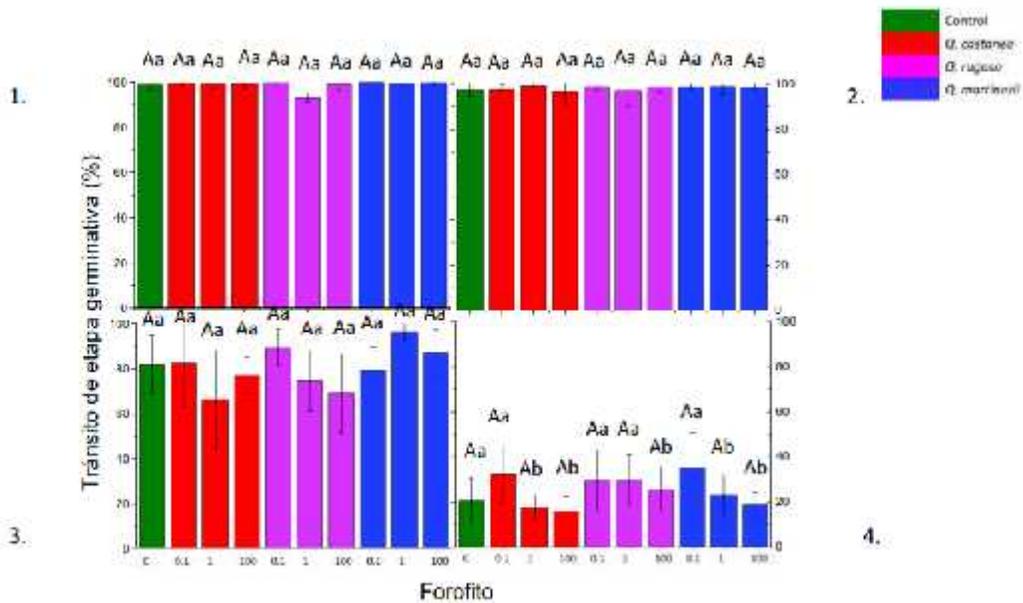


Figura 7. Porcentajes de tránsito de las etapas germinativas de *O. brachyandrum* bajo diferentes concentraciones de extractos acuosos de tres especies de forofitos. 1) Imbibición 2) Ruptura de testa y 3) Formación de protocormo 4) Desarrollo de protocormo. Las mayúsculas representan la comparación entre forofitos y las letras minúsculas representan la comparación de las concentraciones en un mismo forofito ($p < 0,05$).

Efecto de los extractos acuosos en la germinación *in vitro* de *A. punicea*

Se observa que solamente se presentó germinación en *Q. rugosa* (0.3 ± 0.91) concentración 1 y *Q. martinicensis* (1.1 ± 1.5) en concentración 1 y (1.7 ± 3.2) en concentración 100. Una posible explicación de haber obtenido bajas tasas de germinación es muchas orquídeas tienen requerimientos nutrimentales muy específicos (Nadarajan *et al.*, 2011) y el medio de cultivo utilizado en el experimento puede no ser el adecuado para *A. punicea*. Otra posible explicación es que, aunque se sabe que muchas orquídeas epífitas pueden germinar sin presencia de un simbionte, también se ha encontrado que algunas de ellas si requieren esa asociación (Alghamdi *et al.* 2019) quizá las semillas de *A. punicea* si requiere la simbiosis para poder germinar.

Variación del porcentaje tránsito en las etapas germinativas de *A. punicea*

Al igual que en *Oncidium brachyandrum* se observó que el efecto de los extractos acuosos no fue el mismo a lo largo del proceso de desarrollo. Así, en *Q. castanea* en imbibición se obtuvo un tránsito de 96 ± 19 (concentración 0.1), 96.3 ± 14 (concentración 1) y 95.6 ± 15 (concentración 100), los cuales no difirieron del control 91.4 ± 15 ($F=0.81$, $gl.=3$, $p>0.05$). En la fase de ruptura de testa el tránsito obtenido fue de 1 ± 0.7 (concentración 0.1), 0.8 ± 0.7 (concentración 1) y 0.3 ± 0.3 (concentración 100) la cual no difirió del control 0.2 ± 0.3 ($F=0.91$, $gl.=3$, $p>0.05$). No hubo formación de protocormos en los tratamientos con extractos de las cortezas de *Q. castanea*.

Mientras que en *Q. rugosa* en la etapa de imbibición los valores obtenidos fueron 94.8 ± 15 (concentración 0.1), 89 ± 11 (concentración 1) y 91.3 ± 11 (concentración 100), los cuales no difirieron del control 91.4 ± 15 ($F=0.53$, $gl.=3$, $p>0.05$). En la etapa de ruptura de testa los valores obtenidos fueron 2.4 ± 1.8 (concentración 0.1), 3.9 ± 2.7 (concentración 1) y 5 ± 5 (concentración 100) la cual no difirió estadísticamente del control ($F=1.9$, $gl.=3$, $p>0.05$). en la fase de formación de protocormo únicamente hubo tránsito en la concentración más alta con valores de 4.3 ± 0.3 en este caso no se pudo comparar con el control ya que no tuvo tránsito a esta etapa.

En el caso de *Q. martinezii* los valores obtenidos en imbibición fueron 95.1 ± 8.7 (concentración 0.1), 91.9 ± 12 (concentración 1) y 79 ± 10 los cuales no difirieron del control 91.4 ± 15 ($F=1.4$, $gl.=3$, $p>0.05$). en la etapa de ruptura de la testa los valores obtenidos fueron 2.2 ± 1.4 (concentración 0.1), 5.3 ± 5 (concentración 1) y 16 ± 5.2 (concentración 100). Los análisis estadísticos muestran diferencias significativas con el control 0.2 ± 0.3 ($F=8.6$, $gl.=3$, $p<0.05$). En cuanto a la etapa de formación de protocormo solo hubo tránsito en concentración media y alta; los valores son 21.4 ± 0.9 (concentración 1) y 14.2 ± 1.6 (concentración 100) no pudo realizarse comparación con el control debido a que este no tuvo

tránsito a esta etapa; sin embargo, se compararon ambos grupos con una prueba de t y se encontró diferencia estadística entre ambas concentraciones ($F=7.5$, $gl=14$, $p<0.05$)

Es interesante notar que el paso a la siguiente fase, que es la “ruptura de la testa”, los mayores porcentajes de desarrollo se registran en las semillas tratadas con extractos de *Q. rugosa* y *Q. martinezii*. Para que se dé el paso a esta fase significa que el metabolismo en la semilla se ha activado y ha comenzado la replicación celular. Cabe mencionar que todos los tratamientos tuvieron la transición a esta fase, pero ¿por qué no se dieron en el mismo porcentaje?

Una posible explicación sería que los diferentes extractos tienen un efecto positivo en esta etapa, quizá el contenido de minerales sea un aditivo para que se de este paso (Rasmussen *et al.*, 2015) dado que se ha demostrado que la calidad nutrimental de la corteza puede ser suficiente para mantener la germinación en orquídeas epífitas (Utami *et al.*, 2018). Quizá la calidad nutrimental tenga un efecto positivo en los tratamientos que presentaron los mayores porcentajes de germinación. Utami *et al.* (2020) mencionan que muchas orquídeas tienen preferencia por fuentes orgánicas de nitrógeno y fósforo.

En la formación del protocormo únicamente se desarrollaron las semillas en la concentración media de los extractos de *Q. rugosa* (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y para *Q. martinezii* en las concentración media y alta (100 y 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$). En este punto los individuos que alcanzaron esta etapa comienzan la activación del metabolismo, la división celular y, además, inicia la fotosíntesis. Para esto requieren de diferentes nutrientes que les ayuden con todas las funciones metabólicas (Miransari y Smith, 2014), por lo que, para lograr el máximo desarrollo en esta etapa, quizá los extractos que favorecieron de manera positiva pudieron haber sido los que contenían una mayor riqueza en minerales (Yeh *et al.*, 2019). Cabe señalar que, en campo, esta especie de orquídea crece únicamente sobre *Q. rugosa* y *Q. martinezii*, pero no crece sobre *Q. castanea*. Y dado que Ramírez-Martínez (2018) menciona que el contenido

nutrimental entre las tres especies de forofitos (*Q. rugosa*, *Q. castanea* y *Q. martinezii*) difieren en la concentración de algunos elementos; esto pudiera estar explicar parcialmente el porqué de este fenómeno.

Otra posible explicación al nulo desarrollo en esta etapa de las semillas en contacto con extractos de *Q. castanea* puede deberse a una posible alelopatía, ya que al realizar las pruebas del contenido químico de los extractos de las cortezas de los diferentes encinos se encontró una concentración más elevada en fenoles y flavonoides en las cortezas de *Q. castanea* (Cuadro 3). Este resultado concuerda con estudios realizados por Ferreira *et al.* (2020), quienes reportan que los extractos acuosos de *Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker sobre la germinación de *Bidens pilosa* L. afectan de manera negativa la germinación de esta Asteraceae, además de que a mayor concentración de fenoles y flavonoides existe una mayor inhibición. En el ámbito epifito, estudios como el de Valencia-Díaz *et al.* (2010) extractos de las cortezas de ciertos árboles sobre la germinación de plantas epífitas. y Harshani *et al.* (2014), de igual manera los extractos de las cortezas de algunos árboles tienen efecto sobre la germinación de *D. aphyllum*.

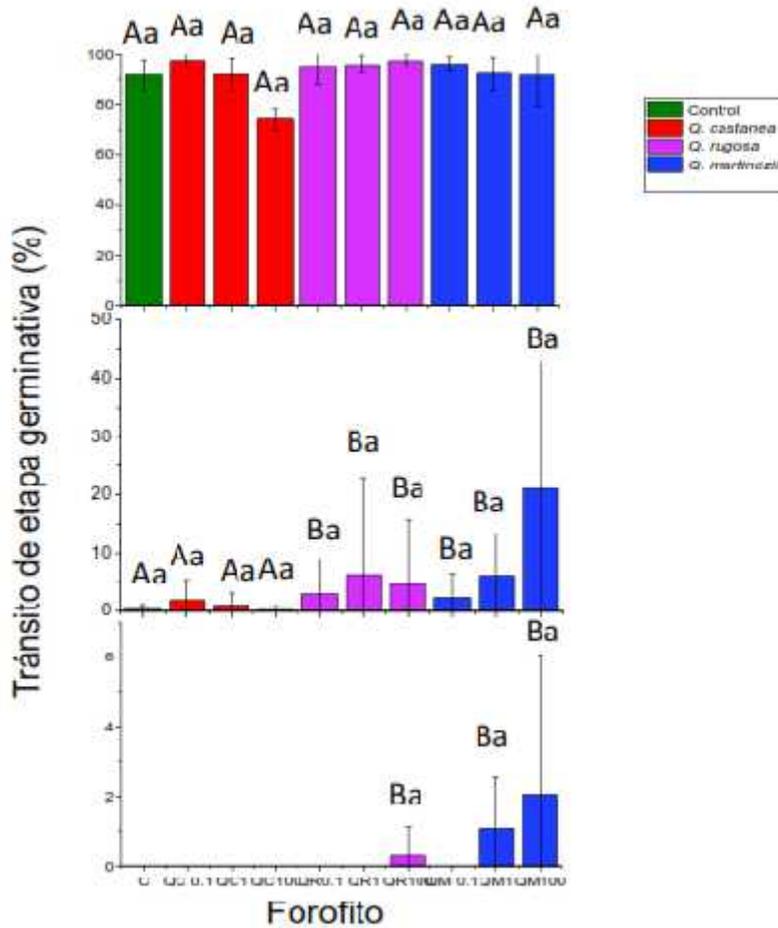


Figura 8. Porcentajes de tránsito de las etapas germinativas de *A. punicea* bajo diferentes concentraciones de extractos acuosos de tres especies de forofitos. 1) Imbibición, 2) Ruptura de testa y 3) Formación de protocormo. Las letras mayúsculas representan la comparación entre forofitos y las minúsculas entre concentraciones.

Germinación *in situ* de *O. brachyandrum* sobre *Q. castanea*, *Q. rugosa* y *Q. martinezii*

La germinación *in situ* de *O. brachyandrum* sobre *Q. castanea* fue de $0.05 \pm 0.22\%$, sobre *Q. rugosa* de $0.65 \pm 1.22\%$ y en *Q. martinezii* de $0.25 \pm 0.44\%$. El bajo porcentaje obtenido *in*

situ, comparado con el obtenido *in vitro*, es común en orquídeas (Rasmussen y Whigham 1993), esto se debe a que en campo la disponibilidad de agua es muy limitante, además de que las condiciones ambientales son muy fluctuantes, entre ellas la humedad y temperatura que son tan importantes en esta fase tan crítica como lo es la germinación (Lamichhane *et al.* 2018).

A pesar de que esperábamos encontrar diferencias en las tasas de germinación entre los diferentes forofitos, esto debido a que encontramos diferencias en las características físicas y químicas, no pudimos encontrar variaciones en campo aun cuando en laboratorio si se presentaron, esto pudiera deberse quizá a otras variable que no consideramos que enmascaran las diferencias encontradas entre los forofitos y los compuestos alelopáticos.

Determinación de la comunidad de hongos asociados presentes en individuos adultos de *O. brachyandrum* creciendo sobre *Q. castanea*, *Q. rugosa* y *Q. martinezii*

Porcentaje de colonización en raíces de *O. brachyandrum* en diferentes forofitos

Todos las raíces de los individuos de *O. brachyandrum* analizados estuvieron colonizados. El hecho de que se haya detectado colonización en las raíces de las orquídeas asociadas a los tres forofitos pudiera estar relacionado con que el material muestreado estaba en contacto directo con las cortezas. Se sabe que, en orquídeas epífitas, las raíces en contacto directo con las cortezas de los árboles hospederos son la que presentan mayor colonización (Rasmussen, 2002). Esto a su vez puede estar relacionado al hecho que los hongos ofrecen a las orquídeas la capacidad de adquirir mayor cantidad de minerales además de proveerles de agua, por lo que este tipo de asociaciones es más común en ambientes oligotróficos que en ambientes ricos tanto en nutrientes como en agua, como es el caso del ambiente epífito (Tedersoo *et al.*, 2020).

A pesar de que todas las raíces estuvieron colonizadas el porcentaje de colonización entre individuos entre individuos de *O. brachyandrum* creciendo sobre los diferentes forofitos

($F=4.4$, g.l. =2, $p < 0.05$); los individuos en *Q. castanea* tuvieron los porcentajes más bajos de colonización ($26.7 \pm 18\%$), seguido por *Q. martinezii* ($46.7 \pm 12\%$) y *Q. rugosa* ($74 \pm 28\%$) (Figura 5). Ramírez-Martínez (2018) menciona que la corteza de ramas primarias (es donde crecen las orquídeas principalmente) de *Q. castanea* (0.2 ± 0.09) es la que posee menores valores de captación de agua, mientras que la captación es mayor en las cortezas de *Q. rugosa* (0.33 ± 0.003) y *Q. martinezii* (0.2 ± 0.02). Por otro lado, en cuanto a la retención de agua, los valores más altos los posee *Q. rugosa*, mientras que los valores más bajos los tiene *Q. castanea*. Estas características pudieran explicar en parte la alta colonización de los hongos en las raíces de *O. brachyandrum* creciendo sobre *Q. rugosa*, esto puede deberse a que la corteza de este árbol retiene la humedad necesaria para favorecer el crecimiento de los hongos que se asocian en la micorriza en *O. brachyandrum*, ayudando así a su establecimiento, como los menciona Wang *et al.* (2017), quienes encuentran que la orquídea *Dendrobium sinense* presenta la mayor cantidad de hongos endófitos al crecer sobre *Syzygium buxifolium* Hook. & Arn., el cuál es el forofito con mayor capacidad de retención de agua en su corteza.

Por otro lado, la calidad nutrimental de los diferentes forofitos puede tener una influencia directa en la comunidad de hongos presentes en las cortezas de los árboles (Mujica *et al.*, 2020), al cambiar el comportamiento trófico de la misma especie de hongo al crecer sobre diferentes forofitos (Yeung y Lee, 2019); así Mujica *et al.* (2020) al estudiar la comunidad de hongos asociados a la orquídea *Bipinnula fimbriata*, encuentran que los niveles altos de fósforo están relacionados positivamente con la presencia de hongos benéficos para esta especie de orquídea. En el área de estudio *Q. castanea*, al presentar los niveles más bajos de macronutrientes como P, Ca, K (Ramírez-Martínez, 2018), sugiere que existe un efecto negativo en la colonización de hongos benéficos en sus raíces. Por el contrario, la mayor calidad nutrimental de las escorrentías corticales tanto de *Q. rugosa* y *Q. martinezii* pudiera estar cambiando la composición fúngica asociada a las orquídeas Campos *et al.*, 2011 evalúan la composición química de los hongos epifitos asociados a *Quercus ilex*. Lour.

encuentran que existe una relación entre la forma de vida de los hongos y el contenido nutrimental que obtienen del árbol.

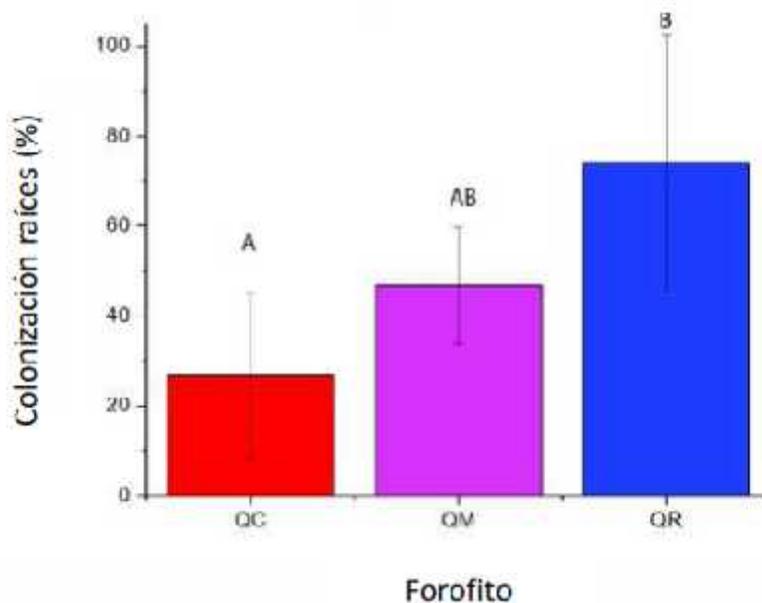


Figura 9. Porcentaje de colonización en raíces de individuos adultos de *O. brachyandrum* creciendo sobre diferentes forofitos. QC (*Q. castanea*), QM (*Q. martinezii*), QR (*Q. rugosa*). Las letras mayúsculas representan las diferencias estadísticas entre la colonización de las raíces ($p < 0.05$).

Aislamiento de hongos endófitos presentes en raíces de O. brachyandrum

Se determinaron nueve géneros de hongos endófitos. Los individuos creciendo sobre *Q. castanea* (Anexo IV) presentaron el mayor número con seis géneros, seguido de los individuos asociados con *Q. martinezii* (Anexo VII) con cinco géneros y finalmente en los individuos de *O. brachyandrum* creciendo sobre *Q. rugosa* (Anexo VI) se encontró un sólo género. Es importante señalar que en este estudio la determinación de géneros únicamente se realizó morfológicamente esto pudiera acarrear un sesgo en la identificación, por lo que se sugiere realizar estudios moleculares para corroborar.

Es muy interesante que la mayor número de géneros hongos endófitos se haya obtenido en *Q. castanea*, la especie de forofito donde se encuentra la menor abundancia de *O. brachyandrum*, esto pudiera estar relacionado con que los hongos aislados en estas orquídeas son reportados como endófitos, aunque aún se desconoce su función dentro de las raíces de las orquídeas existen estudios que sugieren que pueden ser promotores del crecimiento (Favre-Godal *et al.*, 2020).

Los hongos más citados como posibles simbiosiontes son el género tipo *Rhizoctonia* (Otero *et al.* 2002), al parecer las raíces de las orquídeas que crecen sobre *Q. rugosa* y *Q. martinezii* son las que mayormente tienen este género de hongos. Uno de los aislamientos provenientes de la raíz de una de las orquídeas creciendo sobre *Q. castanea* ha sido identificado como aff. *Moniliopsis*, el cual pertenece al grupo del género *Rhizoctonia* (Shan *et al.*, 2002).

De los géneros que se encontraron en *O. brachyandrum*, *Mortierella* ha sido reportado en raíces de orquídeas (Novotná *et al.*, 2018). Este hongo se aisló únicamente en individuos creciendo sobre *Q. martinezii*, además de que se aislaron de diferentes individuos, esto podría hablar de que existe una interacción mayor con este hongo por parte de esta orquídea al crecer en este tipo de forofito (Ogórek *et al.*, 2020).

Por otro lado, Tan *et al.* (2012) mencionan a *Alternaria* como parte de la diversidad de hongos endófitos en raíces de la orquídea epífita *Holcoglossum*. A su vez, Chand *et al.*, (2020) realizaron un estudio en donde caracterizan endófitos en la orquídea *Vanda cristata*, reportando la presencia de *Alternaria*, mencionan que este hongo promueve el crecimiento de la planta mediante la liberación de auxinas reguladoras del crecimiento vegetal. Esta especie fúngica fue aislada únicamente en individuos creciendo sobre *Q. castanea*. Este tipo de encinos es en donde menos crece esta orquídea, puede ser que con la ayuda del hongo la orquídea logre crecer aún con las limitantes que ofrece el forofito.

El género *Epiccocum* fue encontrado por Ogórek *et al.* (2020) en raíces de dos especies de orquídeas de *Epipactis* como parte de la diversidad de endófitos, y aunque no mencionan su función en este estudio en particular, se menciona que es endófito de otras plantas y que promueven su crecimiento mediante la liberación de hormonas (Gomes *et al.*, 2018).

Otro género que se obtuvo en este experimento fue *Xylaria*, el cual es encontrado en diferentes estudios (Ma *et al.*, 2015). Se le conoce por ser saprobio, además de patógeno para diferentes plantas. Bayman *et al.* (1997) encontraron como endófito a estos hongos en raíces del género *Lepanthes*. Este hongo fue aislado de individuos de *Q. brachyandrum* creciendo sobre *Q. castanea*.

Arhtirium fue aislado en un individuo creciendo sobre *Q. castanea* y en un individuo creciendo sobre *Q. martinezii*. Este género fue reportado por Novotná *et al.* (2018) como endófito en raíces de *Cyrtochilum myanthum* y de *Scaphyglottis punctulata*, dos orquídeas epífitas del sur de Ecuador.

Conclusión

Existen variaciones morfológicas y químicas entre los forofitos, así como en la comunidad fúngica en las raíces *O. brachyandrum* creciendo en las diferentes especies de forofitos además del efecto en laboratorio de los extractos acuosos en la germinación de ambas especies que pudieran estar explicando la variación en las abundancias de estas orquídeas creciendo en estos árboles (*A. punicea* 50% sobre *Q. martinezii*, 50% sobre *Q. rugosa* y 0% sobre *Q. castanea*; *O. brachyandrum* 73% sobre *Q. martinezii*, 27% sobre *Q. rugosa* y 0% sobre *q. castanea* (Ramírez-Martínez 2018). Sin embargo, nuestro experimento de germinación *in situ* en el caso de *O. brachyandrum* no mostro variación. Es importante señalar, que no obtuvimos germinación en varias réplicas del experimento entonces afín de

descartar el posible efecto del forofito en la germinación en campo de *O. brachyandrum* y a sería conveniente repetir el experimento con un mayor número repeticiones y un riego para detonar la germinación.

Bibliografía

- Adhikari, Y. P., & Fischer, A. (2012). Distribution pattern of the epiphytic orchid *Rhynchostylis retusa* under strong human influence in Kathmandu valley, Nepal. *Botanica Orientalis Journal of Plant Science*, 8(0), 90–99.
- Alamania punicea Lex. (s/f). Recuperado el 19 de noviembre de 2020, de Plantsoftheworldonline.org website:
<http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:60460310-2>
- Alghamdi, S. A. (2019). Influence of mycorrhizal fungi on seed germination and growth in terrestrial and epiphytic orchids. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(3), 495–502.
- Alvarez-Pardo, V. M., Ferreira, A. G., & Nunes, V. F. (2006). Seed disinfestation methods for in vitro cultivation of epiphyte orchids from Southern Brazil. *Horticultura brasileira*, 24(2), 217–220.
- Arditti, J. & Pridgeon, A. M. (2013). *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, Springer Science & Business Media.
- Arditti, J. (1967). Factors affecting the germination of orchid seeds. *The Botanical Review; Interpreting Botanical Progress*, 33(1), 1–97.
- Arditti, J. (1980). Aspects of the physiology of orchids. En H. W. Woolhouse (Ed.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 7, pp. 421–655). San Diego, CA, Estados Unidos de América: Elsevier.
- Arditti, J. & Ghani, A. K. A. (2000). Tansley Review No. 110: Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *The New Phytologist*, 145(3), 367–421.
- Arizaga, S., Martínez-Cruz, J., Salcedo-Cabrales, M., & Bello-González, M. (2009). Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos. Instituto Nacional de Ecología.

- Avila-Gonzaléz. (2018). Red de Herbarios Mexicanos Data Usage Guidelines. Recuperado el 18 de noviembre de 2020, de Herbanwmex.net website:
<https://herbanwmex.net/portal/includes/usagepolicy.php>
- Ballina Gómez, H. S., Ruiz-Sánchez, E., Ambriz Parra, E., & Alvarado López, C. J. (2017). Efecto de la luz y micorrizas en la germinación de semillas de árboles de selvas secas. *Madera y bosques*, 23(3), 29.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. West Virginia, USA. American Phytopathological Society (APS Press).
- Barrow, J. R., & Aaltonen, R. (2004). A staining method for systemic endophytic fungi in plants. *Emerging Concepts in Plant Health Management, Research Signpost, Kerala, India*, 61-67.
- Bartels, S. F., & Chen, H. Y. H. (2012). Mechanisms regulating epiphytic plant diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(5), 391–400.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (1985). The annual dormancy cycle in buried weed seeds: A continuum. *Bioscience*, 35(8), 492–498.
- Bayman, P., Lebron, L. L., Tremblay, R. L., & Lodge, D. J. (1997). Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *The New Phytologist*, 135(1), 143–149.
- Benzing, D. H. (2008). *Vascular epiphytes: General biology and related Biota*. (pp. 1-42) Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Bertolini, V., Cruz-Blasi, J., Damon, A., & Mora, J. V. (2014). Seasonality and mycorrhizal colonization in three species of epiphytic orchids in southeast Mexico. *Acta Botanica Brasilica*, 28(4), 512–518.
- Bhait, B., & Chauhan, D. S. (2000b). Allelopathic effects of *Quercus spp.* on crops of Garhwal Himalaya. *Allelopathy Journal*, 7(2), 265–272.
- Brundrett, M. C., & Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *The New Phytologist*, 220(4), 1108–1115.
- Burlacu, E., Nisca, A., & Tanase, C. (2020). A comprehensive review of phytochemistry and biological activities of *Quercus* species. *Forests*, 11(9), 904.

- Buyun, L. I., & Grakhov, V. P. (2015). Bioactivity of some orchid seeds substances and secondary metabolites composition. *MM Grishko National Botanical Garden, Kyiv, Ukraine*.
- Callaway, R. M., Reinhart, K. O., Moore, G. W., Moore, D. J., & Pennings, S. C. (2002). Epiphyte host preferences and host traits: mechanisms for species-specific interactions. *Oecologia*, *132*(2), 221–230.
- Campos, J. A. (2011). Nutrients and trace elements content of wood decay fungi isolated from oak (*Quercus ilex*). *Biological Trace Element Research*, *144*(1–3), 1370–1380.
- Cando, M. P., & Cárdenas, M. V. (2017). Determinación mediante aislamiento y purificación de hongos potencialmente micorrízicos en las raíces de seis especies de orquídeas en el cantón *Gualaceo*. Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Ceballos, S. J. (2020). Vascular epiphyte communities in secondary and mature forests of a subtropical montane area. *Acta Oecologica*, *105*(103571), 103571.
- Cervantes, S. E., Graham, E. A., & Andrade, J. L. (2005). Light microhabitats, growth and photosynthesis of an epiphytic bromeliad in a tropical dry forest. *Plant Ecology*, *179*(1), 107–118.
- Cevallos, S., Sánchez-Rodríguez, A., Decock, C., Declerck, S., & Suárez, J. P. (2017). Are there keystone mycorrhizal fungi associated to tropical epiphytic orchids? *Mycorrhiza*, *27*(3), 225–232.
- Chand, K., Shah, S., Sharma, J., Paudel, M. R., & Pant, B. (2020). Isolation, characterization, and plant growth-promoting activities of endophytic fungi from a wild orchid *Vanda cristata*. *Plant Signaling & Behavior*, *15*(5), 1744294.
- Chen, B. M., Liao, H. X., Chen, W. B., Wei, H. J., & Peng, S. L. (2017). Role of allelopathy in plant invasion and control of invasive plants. *Allelopathy Journal*, *41*(2), 155–166.
- Chiapusio, G., Sánchez, A. M., Reigosa, M. J., González, L., & Pellissier, F. (1997). Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? *Journal of Chemical Ecology*, *23*(11), 2445–2453.

- CITES. (2013). Resolución Conf. 16.7: Dictámenes de extracción no perjudicial, Secretaría de la CITES, Ginebra.
- Cortés-Anzúres, B. O., Corona-López, A. M., Damon, A., Mata-Rosas, M., & Flores-Palacios, A. (2020). Phorophyte type determines epiphyte-phorophyte network structure in a Mexican oak forest. *Flora*, 272(151704), 151704.
- Cova, S. R. (1993). *Hongos Fitopatógenos*. México: Universidad Autónoma Chapingo.
- Cruz-Higareda, J. B., Luna-Rosales, B. S., & Barba-Álvarez, A. (2015). A novel seed baiting technique for the epiphytic orchid *Rhynchostele cervantesii*, a means to acquire mycorrhizal fungi from protocorms. *Lankesteriana: La Revista Científica Del Jardín Botánico Lankester, Universidad de Costa Rica*, 15(1), 67–76.
- De la Rosa-Manzano, E., Andrade, J. L., Zotz, G., & Reyes-García, C. (2014). Respuestas fisiológicas a la sequía, de cinco especies de orquídeas epífitas, en dos selvas secas de la península de Yucatán. *Botanical Sciences*, 92(4), 607.
- Dearnaley, J. D. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17(6), 475–486.
- Dearnaley, J. D. W., & Cameron, D. D. (2017). Nitrogen transport in the orchid mycorrhizal symbiosis - further evidence for a mutualistic association. *The New Phytologist*, 213(1), 10–12.
- Diantina, S., Kartikaningrum, S., McCormick, A. C., Millner, J., McGill, C., Pritchard, H. W., & Nadarajan, J. (2020). Comparative in vitro seed germination and seedling development in tropical and temperate epiphytic and temperate terrestrial orchids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 143(3), 619–633.
- Dijk, E., Willems, J. H., & Van Andel, J. (1997). Nutrient responses as a key factor to the ecology of orchid species. *Acta Botanica Neerlandica*, 46(4), 339–363.
- Dressler, R. (1981). *The Orchids Natural History and Classification*. Harvard University Press.
- Dutta, S., Chowdhury, A., Bhattacharjee, B., Nath, P. K., & Dutta, B. K. (2011). In vitro multiplication and protocorm development of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) CEC Fisher. *University Journal of Science and Technology*, 7(1), 57–62.

- El Id, V. L., Braga, M. R., & Santos Junior, N. A. dos. (2020). Germination and initial development of forest species under the action of catechin, presents in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Fabaceae). *Hoehnea*, 47.
- Emeterio-Lara, A., García-Franco, J. G., Hernández-Apolinar, M., Toledo-Hernández, V. H., Valencia-Díaz, S., & Flores-Palacios, A. (2021). Does extraction of orchids affect their population structure? Evidence from populations of *Laelia autumnalis* (Orchidaceae). *Forest Ecology and Management*, 480(118667), 118667.
- Endres Júnior, D., Sasamori, M. H., Petry, C. T., Santos, M. da S., & Droste, A. (2019). Host tree bark traits and development of reintroduced *Cattleya intermedia* (Orchidaceae) plants in Southern Brazil. *Rodriguésia*, 70.
- Favre-Godal, Q., Gourguillon, L., Lordel-Madeleine, S., Gindro, K., & Choisy, P. (2020). Orchids and their mycorrhizal fungi: an insufficiently explored relationship. *Mycorrhiza*, 30(1), 5–22.
- Ferreira, P. J., Zonetti, P. da C., Albrecht, A. J. P., Rosset, I. G., Silva, A. F. M., Albrecht, L. P. Paulert, R. (2020). *Conyza sumatrensis* allelopathy effect on *Bidens pilosa* (Asteraceae) seed germination. *Botanical Sciences*, 98(2), 348–354.
- Ferreira, W. de M., Oliveira, S. P. de, Suzuki, R. M., Silva, K. L. F., & Soares Júnior, J. W. P. (2018). Germination, growth and morpho-anatomical development of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) in vitro. *Rodriguésia*, 69(4), 2137–2151.
- Flores-Palacios, A., & Garcia-Franco, J. G. (2006). The relationship between tree size and epiphyte species richness: testing four different hypotheses. *Journal of Biogeography*, 33(2), 323–330.
- Flores-Palacios, A., & Valencia-Díaz, S. (2007). Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes. *Biological Conservation*, 136(3), 372–387.
- Frei, J. K., P., O., & Dodson, C. H. (1972). The chemical effect of certain bark substrates on the germination and early growth of epiphytic orchids. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 99(6), 301.

- Fuji, M., Miura, C., Yamamoto, T., Komiyama, S., Suetsugu, K., Yagame, T., Kaminaka, H. (2020). Relative effectiveness of *Tulasnella* fungal strains in orchid mycorrhizal symbioses between germination and subsequent seedling growth. *Symbiosis (Philadelphia, Pa.)*, *81*(1), 53–63.
- Galdiano, R. F., Jr, de Macedo Lemos, E. G., & Vendrame, W. A. (2013). Cryopreservation, early seedling development, and genetic stability of *Oncidium flexuosum* Sims. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *114*(1), 139–148.
- Gao, Y., Zhao, Z., Li, J., Liu, N., Jacquemyn, H., Guo, S., & Xing, X. (2020). Do fungal associates of co-occurring orchids promote seed germination of the widespread orchid species *Gymnadenia conopsea*? *Mycorrhiza*, *30*(2–3), 221–228.
- García-Cruz, J., Sanchez Saldaña, L., Jiménez Machorro, R., & Solano-Gómez, R. (2003). Orchidaceae Tubu Epidrendrae. *Flora del Bajío y Regiones Adyacentes*, 119.
- Gauslaa, Y. (1985). The ecology of *Lobarion pulmonariae* and *Parmelion caperatae* in *Quercus* dominated forests in south-west Norway. *The lichenologist*, *17*(2), 117–140.
- Gomes, T., Pereira, J. A., Benhadi, J., Lino-Neto, T., & Baptista, P. (2018). Endophytic and epiphytic phyllosphere fungal communities are shaped by different environmental factors in a Mediterranean ecosystem. *Microbial Ecology*, *76*(3), 668–679.
- Gómez-Biedma, S., Vivó, M., & Soria, E. (2001). Pruebas de significación en Bioestadística. *Revista de Diagnóstico Biológico*, *50*(4), 207–218.
- Gominho, J., Costa, R. A., Lourenço, A., Quilhó, T., & Pereira, H. (2020). Eucalyptus globulus stumps bark: Chemical and anatomical characterization under a valorisation perspective. *Waste and Biomass Valorization*.
- Govaerts, R., Bernet, P., Kratochvil, K., Gerlach, G., Carr, G., Alrich, P., Pridgeon, A.M., Pfahl, J., Campacci, M. A., Holland Baptista, D., Tigges, H., Shaw, J., Cribb, P. J., George, A., Kreuz, K. & Wood, J.J. (2016). *World Checklist of Orchidaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew*.
- Gowland, K. M., van der Merwe, M. M., Linde, C. C., Clements, M. A., & Nicotra, A. B. (2013). The host bias of three epiphytic Aeridinae orchid species is reflected, but

- not explained, by mycorrhizal fungal associations. *American Journal of Botany*, 100(4), 764–777.
- Gustafsson, L., & Eriksson. I. (1995). Factors of importance for the epiphytic vegetation of aspen *Populus tremula* with special emphasis on bark chemistry and soil chemistry. *Journal of Applied Ecology*, 32, 412–424.
- Harshani, H. B. C., Senanayake, S. P., & Sandamali, H. (2014). Host tree specificity and seed germination of *Dendrobium aphyllum* (Roxb.) C.E.C. Fisch. In Sri Lanka. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 42(1), 71.
- Hauck, M., Jung, R., & Runge, M. (2001). Relevance of element content of bark for the distribution of epiphytic lichens in a montane spruce forest affected by forest dieback. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 112(2), 221–227.
- Hong, Y., Hu, H., Sakoda, A., & Sahegashi, M. (2010). Effects of Allelochemical Gramine on Metabolic Activity and Ultrastructure of *Cyanobacterium microcystis aeruginosa*. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Environmental and Ecological Engineering*, 47, 826–830.
- Hsu, R. C.-C., Tamis, W. L. M., Raes, N., de Snoo, G. R., Wolf, J. H. D., Oostermeijer, G., & Lin, S.-H. (2012). Simulating climate change impacts on forests and associated vascular epiphytes in a subtropical island of East Asia: Climate change impacts on forests and epiphytes. *Diversity & Distributions*, 18(4), 334–347.
- 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*. *The Journal of Microbiology*, 56(1), 42–48.
- Illyés, Z., Halász, K., Rudnóy, S., Ouanphanivanh, N., Garay, T., & Bratek, Z. (2009). Changes in the diversity of the mycorrhizal fungi of orchids as a function of the water supply of the habitat. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 83(1), 28–36.

- Izuddin, M., Yam, T. W., & Webb, E. L. (2019). Germination niches and seed persistence of tropical epiphytic orchids in an urban landscape. *Journal of Plant Research*, 132(3), 383–394.
- Jiménez Machorro, R. (2008). *Una revisión del género Oncidium sw. (Orchidaceae) en México*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- John & Sarada, S. (2012). Role of phenolics in allelopathic interactions. *Allelopathy Journal*, 29(2), 215–230.
- Kauth, P. J., Dutra, D., Johnson, T. R., Stewart, S. L., Kane, M. E., & Vendrame, W. (2008). Techniques and applications of in vitro orchid seed germination.
- Khodarahmpour, Z. (2011). Effects of NaCl salinity on maize (*Zea mays* L.) at germination and early seedling stage. *African Journal of Biotechnology*, 11(2), 298–304.
- Kricke, R. (2002). Measuring Bark pH. En *Monitoring with Lichens — Monitoring Lichens* (pp. 333–336). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Lakshmanan, P., Loh, C. S., & Goh, C. J. (1995). An in vitro method for rapid regeneration of a monopodial orchid hybrid Aranda Deborah using thin section culture. *Plant Cell Reports*, 14(8), 510–514.
- Lamichhane, J. R., Debaeke, P., Steinberg, C., You, M. P., Barbetti, M. J., & Aubertot, J.-N. (2018). Abiotic and biotic factors affecting crop seed germination and seedling emergence: a conceptual framework. *Plant and Soil*, 432(1–2), 1–28.
- Laube, S., & Zotz, G. (2006). Neither host-specific nor random: vascular epiphytes on three tree species in a Panamanian lowland forest. *Annals of Botany*, 97(6), 1103–1114.
- Lee, Y.-I., Chung, M.-C., Yeung, E. C., & Lee, N. (2015). Dynamic distribution and the role of abscisic acid during seed development of a lady's slipper orchid, *Cypripedium formosanum*. *Annals of Botany*, 116(3), 403–411.
- Lee, Y.-I., & Yeung, E. C.-T. (Eds.). (2018). *Orchid propagation: From laboratories to greenhouses—methods and protocols*. New York, NY: Springer New York.
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80–89.

- Li, Z.-H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C.-D., & Jiang, D.-A. (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *15*(12), 8933–8952.
- Lokajová, V., Ba korová, M., & Ba kor, M. (2014). Allelopathic effects of lichen secondary metabolites and their naturally occurring mixtures on cultures of aposymbiotically grown lichen photobiont *Trebouxia erici* (Chlorophyta). *South African Journal of Botany*, *93*, 86–91.
- López-Villalobos, A., Flores-Palacios, A., & Ortiz-Pulido, R. (2008). The relationship between bark peeling rate and the distribution and mortality of two epiphyte species. *Plant Ecology*, *198*(2), 265–274.
- Lowman, M. D., & Bruce Rinker, H. (2004). *Forest Canopies*. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Ma, X., Kang, J., Nontachaiyapoom, S., Wen, T., & Hyde, K. D. (2015). Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids. *Current science*, *109*(1), 72–87.
- Martin, C., Lin, T.-C., Hsu, C.-C., & Lin, S.-H. (2007). No Effect of Host Tree Species on the Physiology of the Epiphytic Orchid *Bulbophyllum japonicum* in a Subtropical Rainforest in Northeastern Taiwan. *Taiwan Journal of Forest Science*, *22*((3), 241–451.
- McCormick, M. K., & Jacquemyn, H. (2014). What constrains the distribution of orchid populations? *The New Phytologist*, *202*(2), 392–400.
- McCormick, M. K., Lee Taylor, D., Juhaszova, K., Burnett, R. K., Jr, Whigham, D. F., & O'Neill, J. P. (2012). Limitations on orchid recruitment: not a simple picture: Limitation on orchid recruitment. *Molecular Ecology*, *21*(6), 1511–1523.
- McCormick, M. K., Taylor, D. L., Whigham, D. F., & Burnett, R. K., Jr. (2016). Germination patterns in three terrestrial orchids relate to abundance of mycorrhizal fungi. *The Journal of Ecology*, *104*(3), 744–754.
- McCormick, M. K., Whigham, D. F., & Canchani-Viruet, A. (2018). Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *The New Phytologist*.

- McDonald, L., Van Woudenberg, M., Dorin, B., Adcock, A. M., McMullin, R. T., & Cottenie, K. (2017). The effects of bark quality on corticolous lichen community composition in urban parks of southern Ontario. *Botany*, 95(12), 1141–1149.
- McVaugh, R. (1974). *Flora novo-galiciana* contributions from the University of Michigan Herbarium. 12(3), 1–93.
- Mehlreter, K., Flores-Palacios, A., & García-Franco, J. G. (2005). Host preferences of low-trunk vascular epiphytes in a cloud forest of Veracruz, Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, (21), 651–660.
- Menchaca García, R. A., Lozano Rodríguez, M. Á., & Sánchez Morales, L. (2012). Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 3(13), 09–16.
- Mendoza, L. M., & Paragas, D. S. (2017). The Allelopathic effect of *Mangifera indica* Leaves on Mustard Seeds. *International Journal of Agricultural Technology*, 13(7.3), 2575–2583.
- Mercado, S. A. S., & Delgado, E. A. B. (2020). Effect of the medium composition on the asymbiotic germination and *in vitro* development of the *Laeliocattleya* hybrid. *South African Journal of Botany*, 135, 80–86.
- Mehlreter, K., Flores-Palacios, A., & García-Franco, J. G. (2005b). Host preferences of low-trunk vascular epiphytes in a cloud forest of Veracruz, Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, 651–660.
- Miransari, M., & Smith, D. L. (2014). Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99, 110–121.
- Morales, D. (2021). Oak trees (*Quercus spp.*) as a source of extracts with biological activities: A narrative review. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 116–125.
- Mosqueda, M., Alberto, & Editor. (2010). Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco /. En Col. José N. Roviroso, *Biodiversidad, Desarrollo Sustentable y Trópico Húmedo*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

- Mujica, M. I., Cisternas, M., Claro, A., Simunovic, M., & Pérez, F. (2020). Nutrients and fungal identity affect the outcome of symbiotic germination in *Bipinnula fimbriata* (Orchidaceae). *Symbiosis (Philadelphia, Pa.)*.
- Nadarajan, J., Wood, S., Marks, T. R., Seaton, P. T., & Pritchard, H. W. (2011). Nutritional requirements for in vitro seed germination of 12 terrestrial, lithophytic and epiphytic orchids. *Journal of Tropical Forest Science*, 23(2), 204–212.
- Novotná, A., Benítez, Á. Herrera, P., Cruz, D., Filipczyková, E., & Suárez, J. P. (2018). High diversity of root-associated fungi isolated from three epiphytic orchids in southern Ecuador. *Mycoscience*, 59(1), 24–32.
- Ogórek, R., Kurczaba, K., Łobas, Z., ołubak, E., & Jakubska-Busse, A. (2020). Species Diversity of Micromycetes Associated with *Epipactis helleborine* and *Epipactis purpurata* (Orchidaceae, Neottieae) in Southwestern Poland. *Diversity*, 12(5), 182.
- Osono, T. (2014). Diversity and ecology of endophytic and epiphytic fungi of tree leaves in japan: A review. En *Advances in Endophytic Research* (pp. 3–26). New Delhi: Springer India.
- Otero, J. T., Ackerman, J. D., & Bayman, P. (2004). Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, 13(8), 2393–2404.
- Otero, J. T., Bayman, P., & Ackerman, J. D. (2005). Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* in vitro: the potential for natural selection. *Evolutionary Ecology*, 19(1), 29–43.
- Otero, T. J., Ackerman, J. D., & Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic Rhizoctonia-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89(11), 1852–1858.
- Phillips, R. D., Reiter, N., & Peakall, R. (2020). Orchid conservation: from theory to practice. *Annals of Botany*, 126(3), 345–362.
- Qin, J., Zhang, W., Zhang, S.-B., & Wang, J.-H. (2020). Similar mycorrhizal fungal communities associated with epiphytic and lithophytic orchids of *Coelogyne corymbosa*. *Plant Diversity*, 42(5), 362–369.

- Ramírez-Martínez, A. (2018). *Host tree effect on demography and phenology of epiphytic species (Avances de tesis)*. Instituto Politécnico Nacional.
- Rangel, S. R., Carlos, E., Zenteno, R., de Lourdes, M., & Enríques, A. (2002). El Género *Quercus* (Fagaceae) en el Estado de México. *Annals of the Missouri Botanical Garden. Missouri Botanical Garden*, 89(4), 551.
- Rasmussen, H. N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil*, 244(1/2), 149–163.
- Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersáková, J., & T šitelová, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of Botany*, 116(3), 391–402.
- Rasmussen, H. N., & Rasmussen, F. N. (2018). The epiphytic habitat on a living host: reflections on the orchid–tree relationship. *Botanical Journal of the Linnean Society. Linnean Society of London*, 186(4), 456–472.
- Rasmussen, H. N., & Whigham, D. F. (1993). Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *American journal of botany*, 80(12), 1374–1378.
- Robinson, P., Kakati, J. P., Sebastianraj, & Suriya. (2017). In vitro seed germination of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., a potential medicinal Orchid from Eastern Ghats of Tamil Nadu, India. *Journal of Plant Biotechnology*, 44(3), 343–348.
- Rodríguez-Echeverría, S., Costa, S., & Freitas, H. (2007). Biodiversity and Interactions in the Rhizosphere: Effect on Ecosystem Functioning. En *Functional Plant Ecology* (pp. 581–595). Bosa Roca, Estados Unidos de América: CRC Press.
- Ruiz-Cordova, J. P., Toledo-Hernández, V. H., & Flores-Palacios, A. (2014). The effect of substrate abundance in the vertical stratification of bromeliad epiphytes in a tropical dry forest (Mexico). *Flora*, 209(8), 375–384.
- Sadaf Choudhary, Andleeb Zehra, Kaiser Iqbal Wani, M. Naeem, Khalid Rehman Hakeem, and Tariq Aftab. (2020). The Role of Micronutrients in Growth and Development: Transport and Signalling pathways from crosstalks perspective. En Tariq Aftab, Khalid Rehman Hakeem Zaid, A., Ahmad, B., Jaleel, H., Wani, S. H., &

- Hasanuzzaman, M (Ed.), *Plant Micronutrients Deficiency and Toxicity Management*. Springer.
- Salazar Mercado, S. A., & Gélvez Manrique, J. D. (2015). Determining the Viability of Orchid seeds using the Tetrazolio and Carmín Índigo Tests. *Revista de ciencias*, 19(2), 59–69.
- Sánchez-Moreiras, A. M., de la Peña, T. C., & Reigosa, M. J. (2008). The natural compound benzoxazolin-2(3H)-one selectively retards cell cycle in lettuce root meristems. *Phytochemistry*, 69(11), 2172–2179.
- Santacruz García, N., & Espejel Rodríguez, A. (2004). *Los encinos (Quercus) de Tlaxcala, México*. Universidad Autonoma de Tlaxcala.
- Sathiyadash, K., Muthukumar, T., Karthikeyan, V., & Rajendran, K. (2020). Orchid mycorrhizal fungi: structure, function, and diversity. En *Orchid biology: recent trends & challenges* (pp. 239–280). Singapore: Springer.
- Shan, X. C., Liew, E. C. Y., Weatherhead, M. A., & Hodgkiss, I. J. (2002). Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. *Mycologia*, 94(2), 230–239.
- Shao, S.-C., Wang, Q.-X., Beng, K. C., Zhao, D.-K., & Jacquemyn, H. (2020). Fungi isolated from host protocorms accelerate symbiotic seed germination in an endangered orchid species (*Dendrobium chrysotoxum*) from southern China. *Mycorrhiza*, 30(4), 529–539.
- Sillero, L., Prado, R., Andrés, M. A., & Labidi, J. (2019). Characterisation of bark of six species from mixed Atlantic forest. *Industrial Crops and Products*, 137, 276-284.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Sobrero, M. T., Ochoa, M. del C., & Chaila, S. (2004). Potencial alelopático de *Wedelia glauca*: efecto sobre especies hortícolas. *Planta daninha*, 22(1), 71–75.

- Soetopo, L., & Utami, A. P. (2020). Biodiversity exploration of host trees (phorophyte) of epiphyte orchids in the natural habitat. *IOP conference series. Earth and environmental science*, 449, 012029.
- Solano, R., Salazar, G., Huerta, H., Hágsater, E., & Jiménez, R. (2017). Diversity of Mexican orchids: synopsis of richness and distribution patterns. En M. Pridgeon & A. Arosamena (Eds.), *Proceedings of the 22nd World Orchid Conference*.
- Solano-Gómez, R., Martínez-Ovando, E., Martínez-Feria, A., & Gutiérrez-Caballero, J. A. (2016). New records in the Orchidaceae family from Oaxaca, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(4), 1348–1351.
- Soleymani, A., & Shahrajabian, M. H. (2018). Changes in germination and seedling growth of different cultivars of cumin to drought stress. *Cercetari Agronomice in Moldova*, 51(1).
- Soto-Arenas, M. A., & Salazar, G. A. (2004). Orquídeas. En García-Mendoza, M. Ordóñez Díaz, & M. A. Briones Salas (Ed.), *Biodiversidad de Oaxaca* (pp. 271–296). México D.F.: Redacta S.A. de C.V.
- Soto-Arenas, Miguel A., Solano-Gómez., Salazar., Jiménez, Hágsater, Sosa, Gerlach. (2003). Orchids of Mexico. *Icones Orchidacearum*, 2–3(5–6), 501–700.
- Stanek, M., Piechnik, Ł., & Stefanowicz, A. M. (2020). Invasive red oak (*Quercus rubra* L.) modifies soil physicochemical properties and forest understory vegetation. *Forest Ecology and Management*, 472(118253), 118253.
- Steege, H. ter, and Johannes Hermanus Cornelis Cornelissen. (1989). Distribution and ecology of vascular epiphytes in lowland rain forest of Guyana. *Biotropica*, 331–339.
- Steinbauer, M. J., Wallis, I. R., Davies, N. W., & Watson, S. J. (2015). Foliar quality of co-occurring mallee eucalypts: balance of primary and secondary metabolites reflects past growing conditions. *Chemoecology*, 25(4), 179–191.

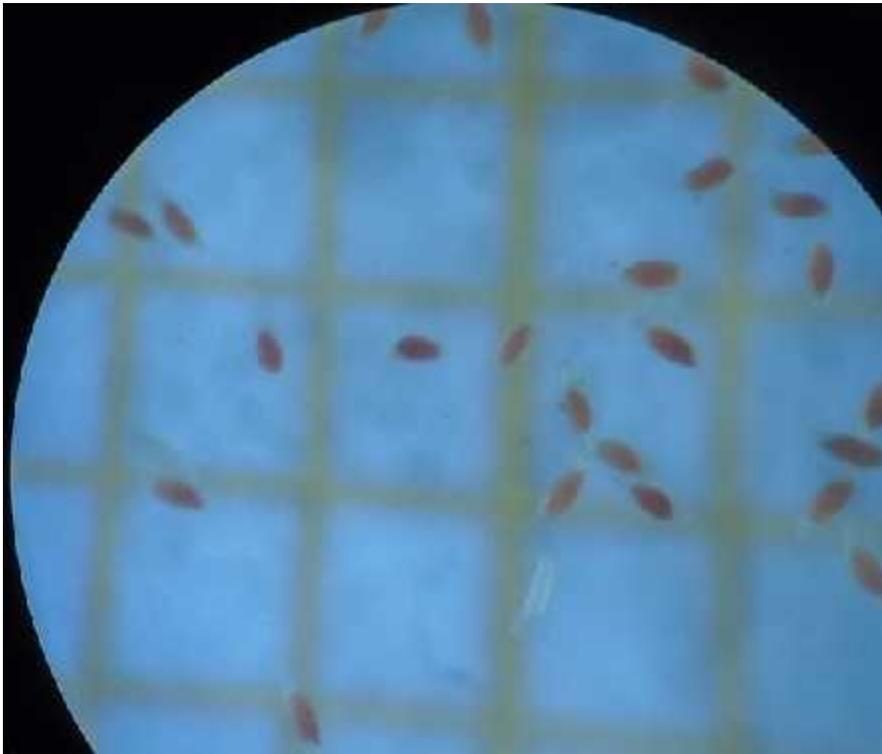
- Suárez, J. P., Weiss, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F., & Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research*, *110*, 1257–1270.
- Tan, X.-M., Chen, X.-M., Wang, C.-L., Jin, X.-H., Cui, J.-L., Chen, J., Zhao, L.-F. (2012). Isolation and identification of endophytic fungi in roots of nine *Holcoglossum* plants (Orchidaceae) collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan provinces of China. *Current Microbiology*, *64*(2), 140–147.
- Tedersoo, L., Bahram, M., & Zobel, M. (2020). How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. *Science (New York, N.Y.)*, *367*(6480),
- Tejeda-Sartorius, O., Téllez-Velasco, M. A. A., & Escobar-Aguayo, J. J. (2017). Estado de conservación de orquídeas silvestres (Orchidaceae). *Agroproductividad*, *10*(6), 3-12.
- Ticktin, T., Mondragón, D., Lopez Toledo, L., Dutra Elliott, D., Aguirre León, E., & Hernández Apolinar, M. (2020). Synthesis of wild orchid trade and demography provides new insight on conservation strategies. *Conservation Letters*, *13*(2).
- Tsutsumi, C., Miyoshi, K., Yukawa, T., & Kato, M. (2011). Responses of seed germination and protocorm formation to light intensity and temperature in epiphytic and terrestrial *Liparis* (Orchidaceae). *Botany*, *89*(12), 841–848.
- Turner, I. M., Tan, H. T. W., Wee, Y. C., Ibrahim, A. B., Chew, P. T., & Corlett, R. T. (1994). A study of plant species extinction in Singapore: Lessons for the conservation of tropical biodiversity. *Conservation Biology: The Journal of the Society for Conservation Biology*, *8*(3), 705–712.
- Ucar, M. B., & Ucar, G. (2011). Characterization of methanol extracts from *Quercus hartwissiana* wood and bark. *Chemistry of Natural Compounds*, *47*(5), 697–703.
- Utami, E. S. W., & Hariyanto, S. (2019). In vitro seed germination and seedling development of a rare Indonesian native orchid *Phalaenopsis amboinensis*. *Scientifica*, *2019*, 8105138.

- Utami, E. S. W., & Hariyanto, S. (2020). Organic compounds: Contents and their role in improving seed germination and protocorm development in orchids. *International Journal of Agronomy*, 2020, 1–12.
- Valencia, S. (2017). Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Botanical sciences*, (75), 33.
- Valencia-Cuevas, L., Piñero, D., Mussali-Galante, P., Valencia-Ávalos, S., & Tovar-Sánchez, E. (2014). Effect of a red oak species gradient on genetic structure and diversity of *Quercus castanea* (Fagaceae) in Mexico. *Tree Genetics & Genomes*, 10(3), 641–652.
- Valencia-Díaz, S., Flores-Palacios, A., Rodríguez-López, V., & Jiménez-Aparicio, A. R. (2013). Inhibitory effects of bark chemicals of host *Ipomoea murucoides* on seed germination of epiphyte *Tillandsia recurvata*. *Allelopathy Journal*, 32(1), 91.
- Valencia-Díaz, S., Flores-Palacios, A., Rodríguez-López, V., Ventura-Zapata, E., & Jiménez-Aparicio, A. R. (2010). Effect of host-bark extracts on seed germination in *Tillandsia recurvata*, an epiphytic bromeliad. *Journal of Tropical Ecology*, 26(6), 571–581.
- Vergara-Torres, C. A., Pacheco-Álvarez, M. C., & Flores-Palacios, A. (2010). Host preference and host limitation of vascular epiphytes in a tropical dry forest of central Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, 563–570.
- Wagay, N. A., Lone, R., Rafiq, S., & Bashir, S. U. (Ed.). (2020). Interactive Biology of Auxins and Phenolics in Plant Environment. En *Phenolics: A Game Changer in the Life Cycle of Plants. In Plant Phenolics in Sustainable Agriculture* (pp. 118–129). Springer.
- Wagner, K., & Zotz, G. (2020). Including dynamics in the equation: Tree growth rates and host specificity of vascular epiphytes. *The Journal of Ecology*, 108(2), 761–773.
- Wang, X., Li, Y., Song, X., Meng, Q., Zhu, J., Zhao, Y., & Yu, W. (2017). Influence of host tree species on isolation and communities of mycorrhizal and endophytic fungi from roots of a tropical epiphytic orchid, *Dendrobium sinense* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 27(7), 709–718.

- Xing, X., Gao, Y., Zhao, Z., Waud, M., Duffy, K. J., Selosse, M., Guo, S. (2020). Similarity in mycorrhizal communities associating with two widespread terrestrial orchids decays with distance. *Journal of Biogeography*, 47(2), 421–433.
- Xing, X., Jacquemyn, H., Gai, X., Gao, Y., Liu, Q., Zhao, Z., & Guo, S. (2019). The impact of life form on the architecture of orchid mycorrhizal networks in tropical forest. *Oikos*, 128(9), 1254–1264.
- Yamazaki, J., & Miyoshi, K. (2006). In vitro asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 98(6), 1197–1206.
- Yeh, C.-M., Chung, K., Liang, C.-K., & Tsai, W.-C. (2019). New insights into the symbiotic relationship between orchids and fungi. *Applied Sciences (Basel, Switzerland)*, 9(3), 585.
- Yeung, E. C., Li, Y.-Y., & Lee, Y.-I. (2019). An overview of the life of an orchid protocorm a developmental perspective. *Acta Horticulturae*, (1262), 13–22.
- Yeung, E. C. (2017). A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies (Taipei, Taiwan)*, 58(1), 33.
- Yokoya, K., Zettler, L. W., Bell, J., Kendon, J. P., Jacob, A. S., Schofield, E., Sarasan, V. (2021). The diverse assemblage of fungal endophytes from orchids in Madagascar linked to abiotic factors and seasonality. *Diversity*, 13(2), 96.
- Yuan, Z.-L., 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(2), 295–303.
- Zarate-García, A. M., Noguera-Savelli, E., Andrade-Canto, S. B., Zavaleta-Mancera, H. A., Gauthier, A., & Alatorre-Cobos, F. (2020). Bark water storage capacity influences epiphytic orchid preference for host trees. *American Journal of Botany*, 107(5), 726–734.
- Zhang, Z., Liu, Y., Yuan, L., Weber, E., & van Kleunen, M. (2021). Effect of allelopathy on plant performance: a meta-analysis. *Ecology Letters*, 24(2), 348–362.

- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, *64*(4), 555–559.
- Zi, X. M., Sheng, C.-L., Goodale, U. M., Shao, S.-C., & Gao, J.-Y. (2014). In situ seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, *24*(7), 487–499.
- Zotz, G. (2016). *Plants on plants - the biology of vascular epiphytes* (1a ed.). (pp. 9-43) Cham, Switzerland: Springer International Publishing.
- Zotz, G., & Winkler, U. (2013). Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake. *Oecologia*, *171*(3), 733–741.

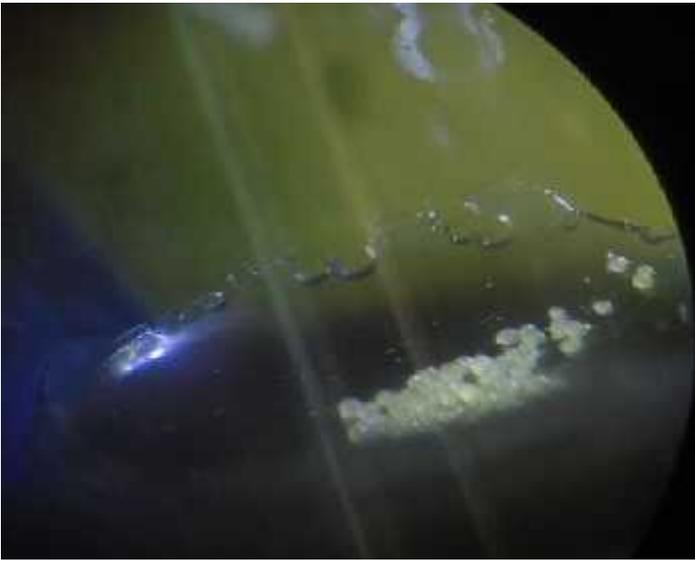
Anexo I Semillas de *Oncidium brachyandrum* tratadas con tetrazolio al 1%. Las semillas teñidas de rojo son viables, mientras las que no se tiñen carecen de embrión.



Anexo II. Etapas germinativas de *Oncidium brachyandrum* en medio de cultivo en medio Knudson C observadas en microscopio estereoscópico A) imbibición, B) ruptura de la testa y en algunas se observa la formación de protocormo, C) Protocormos de *O. brachyandrum* se comienza a formar la zona apical meristemática, se observa que algunos comienzan a tornarse verdes D) desarrollo de protocormos fotosintéticos, zona apical meristemática bien definida, la base comienza a tornarse rugosa, de ahí emergen los rizoides.



A)



B)

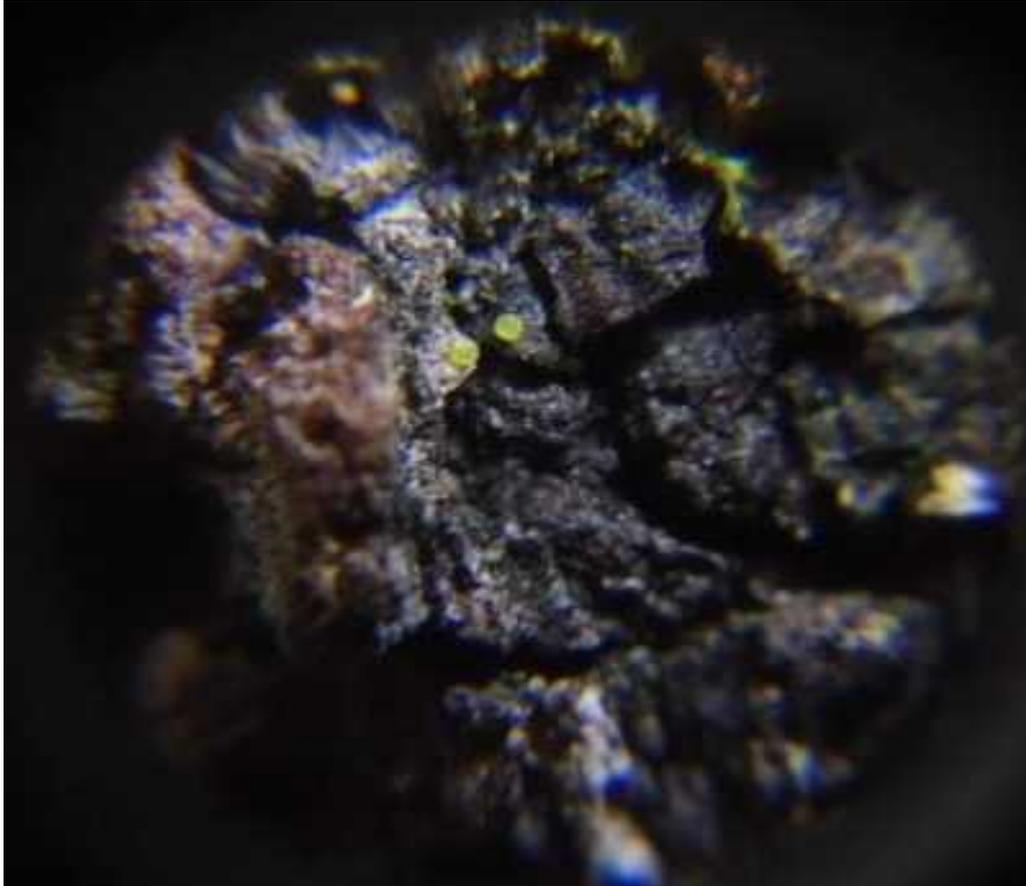


C)

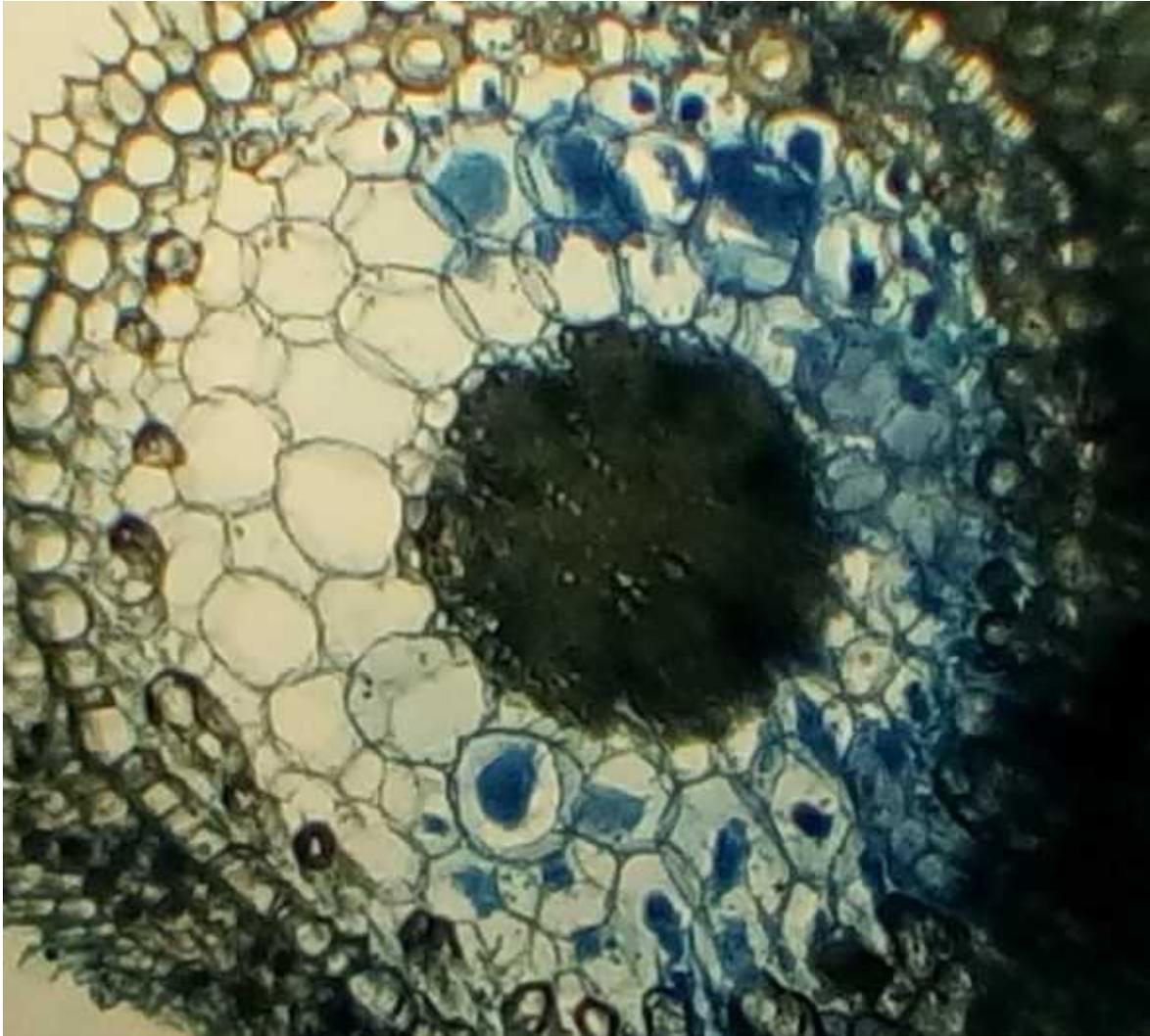


D)

Anexo III. Protocormos *Oncidium brachyandrum* creciendo en corteza de *Quercus rugosa*, en Tooxi, Oaxaca



Anexo IV. Corte transversal de raíz de individuo adulto de *Oncidium brachyandrum* con técnica de tinción azul de tripano, fotografía tomada a 40X. Se observan los pelotones de hongos teñidos de color azul que crecen en el córtex de la raíz.



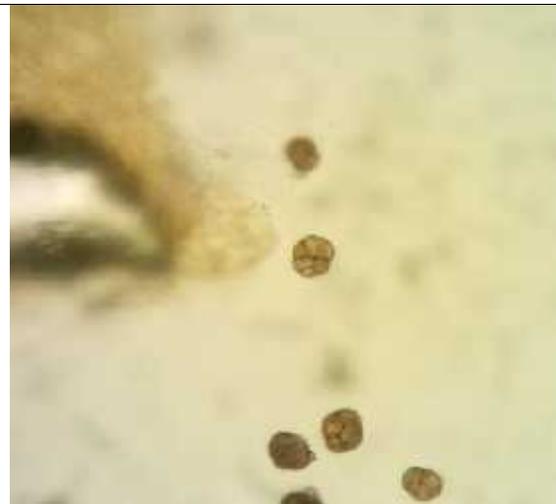
Anexo V. Colonias de hongos aislados de raíces de adultos de *Oncidium brachyandrum* creciendo sobre *Quercus castanea* en Tooxi, Santo Domingo Yanhuatlán, Oaxaca. Se puede observar de lado izquierdo las colonias aisladas en PDA, de lado derecho se muestran los frotis a través de microscopio óptico.

Colonia

Microscopio (100x)



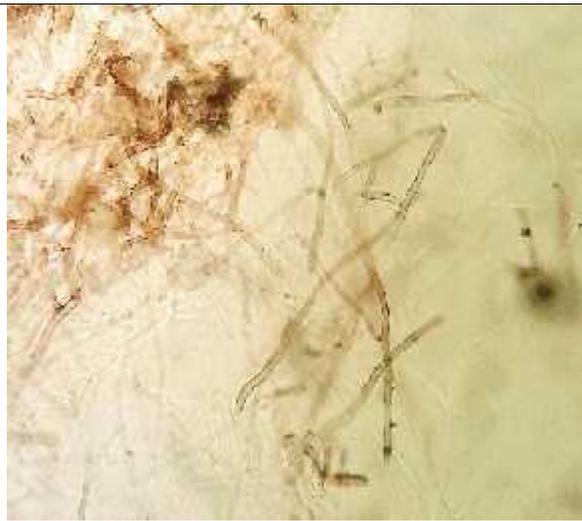
Alternaria spp.



Epicoccum spp



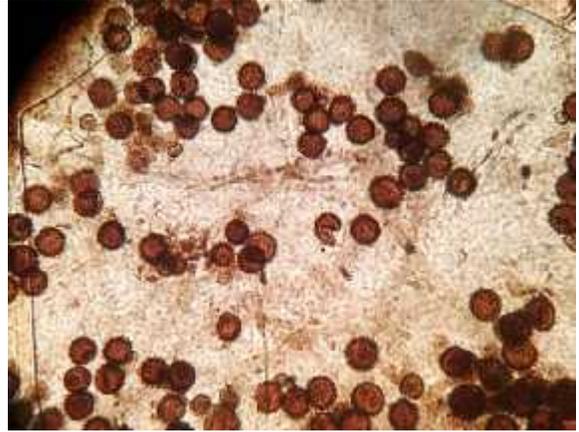
Thanatephorus spp



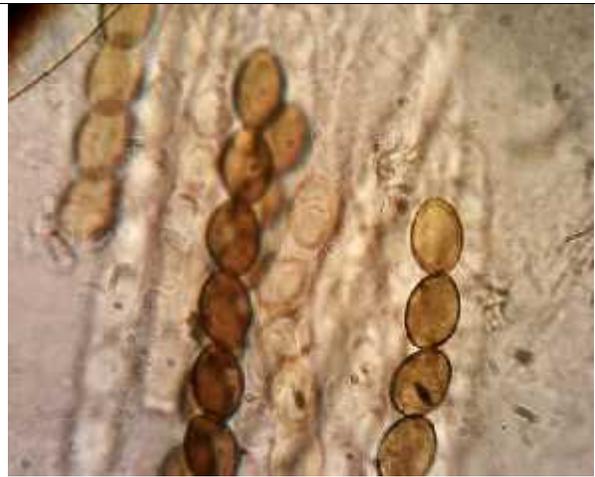
Ceratoriza spp



Arthrinium spp



Xylaria spp



Anexo VI. Colonias de hongos aislados de raíces de adultos de *Oncidium brachyandrum* creciendo sobre *Quercus rugosa* en Tooxi, Santo Domingo Yanhuitlán, Oaxaca. Se puede observar de lado izquierdo las colonias aisladas en PDA, de lado derecho se muestran los frotis a través de microscopio óptico.

Colonia



Rhizoctonia spp morfo tipo 1

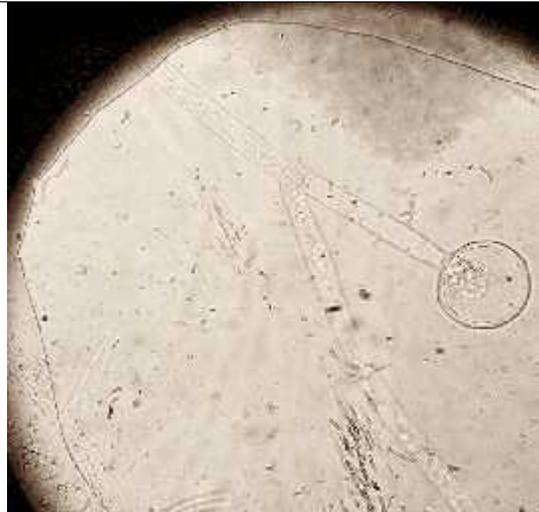
Microscopio (100X)





Rhizoctonia spp morfo tipo 2

Anexo VII. Colonias de hongos aislados de raíces de adultos de *Oncidium brachyandrum* creciendo sobre *Quercus martinezii* en Tooxi, Santo Domingo Yanhuitlán, Oaxaca. Se puede observar de lado izquierdo las colonias aisladas en PDA, de lado derecho se muestran los frotis a través de microscopio óptico.



Mortierella spp. morfo tipo 1



Mortierella spp. morfo tipo 2



Mortierella spp. morfo tipo 3





Rhizoctonia spp. morfo tipo 3



Leptodontium spp. morfo tipo 1



Mortierella spp. morfo tipo 4



Rhizoctonia spp. morfo tipo 4

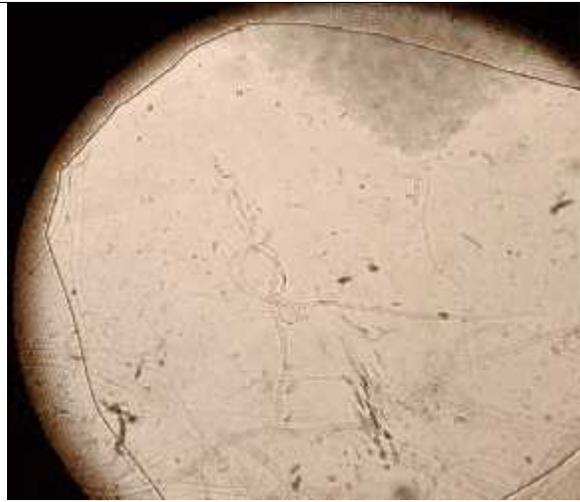




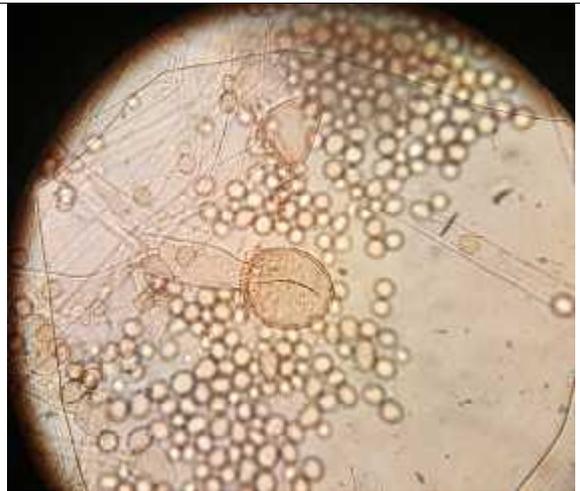
Mortierella spp. morfo tipo 5



Leptodontium spp. morfo tipo 2



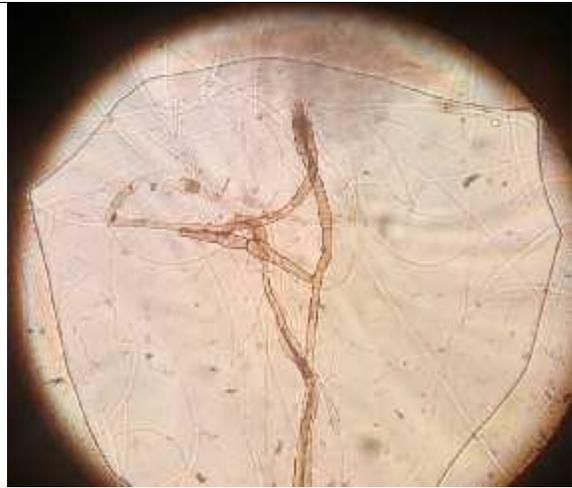
Arthrinium spp. morfo tipo 1



Mortierella spp. morfo tipo 5



Rhizoctonia spp. morfo tipo 5



Rhizoctonia spp. morfo tipo 6





Rhizoctonia spp. morfo tipo 7