



Aislamiento e identificación de hongos micorrizógenos promotores de germinación y desarrollo inicial de *Epidendrum radicans* Pav. ex Lindl †

[Isolation and identification of mycorrhizal fungi that promote germination and initial development of *Epidendrum radicans* Pav. ex Lindl]

Froylán Navarro-Álvarez¹, Isaac A. Salmeron-Santiago¹,
Pedro Antonio López², José Luciano Morales-García¹,
Martha Elena Pedraza-Santos¹ and Ana Tztzqui Chávez-Bárcenas^{1*}

¹Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Paseo Lázaro Cárdenas 2290, CP 60170, Uruapan, Michoacán, México. Emails: 1584870a@umich.mx; isaac.salmeron@umich.mx; jose.morales@umich.mx; martha.elena.pedraza@umich.mx; tztzqui.chavez@umich.mx*

²Colegio de Postgraduados Campus Puebla. Boulevard Forjadores de Puebla Núm. 205, Santiago Momoxpan, 72760. Municipio de San Pedro Cholula, Puebla, México. Email: palopez@colpos.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background. Seeds of the Orchidaceae family lack an endosperm with sufficient reserves to meet the carbon demands required during germination and the pre-autotrophic developmental stage. This limitation is compensated through symbiotic relationships with orchid mycorrhizal fungi (OMF). The roots of adult orchids also establish symbiotic relationships with OMF, some of which can extend their hyphae to colonize new seeds. *Epidendrum radicans* is a hemiepiphytic lithophytic, or terrestrial orchid native to Mexico, widely used as an ornamental species; and its fruits produce thousands of seeds. **Objective.** To isolate fungi that promote germination and early development of *E. radicans*, using roots from adult plants as the source. **Methodology.** The presence of OMF structures in *E. radicans* roots was verified using trypan blue staining. An *in vitro* co-culture system was designed to induce germination by pairing seeds and OMF-colonized roots. Hyphae associated with germinated orchids were isolated and cultured. One representative isolate from each identified genus was selected and evaluated for its colonization capacity and ability to promote germination, using stained protocorms obtained from co-culture. **Results.** Sixteen isolates were obtained and morphologically characterized, belonging to the genera *Fusarium* (14), *Rhizoctonia* (1), and *Ceratobasidium* (1). The selected *Fusarium* sp. isolate did not promote seed germination. In contrast, *Ceratobasidium* sp. and *Rhizoctonia* sp. facilitated both germination and early plant development. The number of leaf-bearing plantlets generated by *Ceratobasidium* sp. was 5.7 times higher than that obtained with *Rhizoctonia* sp. Seedlings and protocorms germinated in co-culture with both genera exhibited characteristic orchid mycorrhizal colonization structures. **Implications.** The co-culture protocols used for isolating germination-promoting OMF, along with the modified staining protocol for roots and protocorms, offer valuable tools for enhancing sexual propagation of orchids in breeding programs or conservation efforts targeting species at risk of genetic erosion. **Conclusion:** The co-culture protocol developed in this study enabled the isolation of two OMF species capable of promoting germination and early development of *E. radicans*. **Key words:** *Ceratobasidium*; *Rhizoctonia*; orchidoid mycorrhizae; protocorm.

RESUMEN

Antecedentes. Las semillas de la familia Orchidaceae carecen de endospermo con reservas suficientes para satisfacer las demandas de carbono requeridas durante la germinación y el desarrollo previo a la etapa autótrofa. Esta limitación se compensa mediante relaciones simbióticas con hongos micorrizógenos orquídeoides (HMO). Las raíces de orquídeas adultas también establecen asociaciones simbióticas con HMO, algunos de los cuales pueden extender sus hifas y colonizar nuevas semillas. *Epidendrum radicans* es una orquídea hemiepífita, litófito o terrestre, nativa de México, ampliamente usada como especie ornamental, y sus frutos contienen miles de

† Submitted September 2, 2025 – Accepted January 7, 2026. <http://doi.org/10.56369/tsaes.6577>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = F. Navarro Álvarez: <https://orcid.org/0009-0003-3613-1053>; I.A. Salmeron-Santiago: <https://orcid.org/0000-0003-3732-6736>; P.A. López: <https://orcid.org/0000-0001-6620-4549>; J.L. Morales-García: <https://orcid.org/0000-0001-7867-3676>; M.E. Pedraza Santos: <https://orcid.org/0000-0002-5938-485X>; A.T. Chávez-Bárcenas: <https://orcid.org/0000-0003-1416-3743>

semillas. **Objetivo.** Aislar hongos promotores de la germinación y desarrollo inicial de *E. radicans*, a partir de raíces de plantas adultas. **Metodología.** Se verificó la presencia de estructuras de HMO en raíces de *E. radicans* mediante tinción con azul de tripano. Para inducir la germinación *in vitro*, se diseñó un sistema de co-cultivo de semillas y raíces colonizadas por HMO. Posteriormente, se aislaron y cultivaron hifas asociadas a las orquídeas germinadas. Se seleccionó un aislado representativo de cada género identificado y se corroboró su capacidad de colonización y promoción de la germinación mediante tinción de protocormos obtenidos en co-cultivo. **Resultados.** Se obtuvieron 16 aislados, caracterizados morfológicamente como pertenecientes a los géneros *Fusarium* (14), *Rhizoctonia* (1) y *Ceratobasidium* (1). El aislado de *Fusarium* sp. seleccionado no promovió la germinación de las semillas. En contraste, los aislados de *Ceratobasidium* sp. y *Rhizoctonia* sp. promovieron tanto la germinación como el desarrollo inicial de plantas. El número de plántulas con hoja generado por *Ceratobasidium* sp. fue 5.7 veces mayor al obtenido con *Rhizoctonia* sp. Las plántulas y protocormos germinados en co-cultivo con ambos hongos mostraron colonización típica de micorriza orquideoide. **Implicaciones.** Los protocolos de co-cultivo empleados para el aislamiento de HMO promotores de la germinación, así como el protocolo de tinción modificado para raíces y protocormos, representan herramientas útiles para fomentar la propagación sexual de orquídeas en programas de mejoramiento o conservación de especies en riesgo de erosión genética. **Conclusión.** El protocolo de co-cultivo desarrollado permitió aislar dos especies de HMO capaces de promover la germinación y desarrollo temprano de *E. radicans*.

Palabras clave: *Ceratobasidium*; *Rhizoctonia*; micorriza orquideoide; protocormo.

INTRODUCCIÓN

Orchidaceae constituye la segunda familia más grande de plantas vasculares, después de Asteraceae, con un estimado de 30, 000-35, 000 especies distribuidas en 880 géneros y representa aproximadamente el 10 % de las angiospermas (Zhao *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022; Tsulsiyah *et al.*, 2021). Las orquídeas son plantas altamente evolucionadas, con estrategias de reproducción únicas, entre las que destacan sus estrechas interacciones con polinizadores específicos y con hongos micorrizógenos orquideoides (HMO) (Clements, Muir y Cribb, 1996; Mauseth, 2017; Arditti, 2022).

Las semillas de orquídeas tienen una longitud de 0.1 a 2 mm, están protegidas por una testa y contienen un embrión indiferenciado. En su gran mayoría, carecen de endospermo o presentan un endospermo reducido tanto en estructura como en función. Este tejido nutritivo, generado durante la fecundación del gametofito femenino, es esencial para sustentar el desarrollo embrionario en sus primeras etapas (Arditti, 2022; Kull y Arditti, 2002; Peterson *et al.*, 1998). Debido a esta carencia, las semillas requieren establecer relaciones micoheterotróficas con hongos saprófitos facultativos que les provean nutrientes hasta que la planta alcanza la autotrofia por su capacidad fotosintética (Wang *et al.*, 2021).

Las relaciones simbióticas entre las orquídeas y los hongos formadores de micorriza son diversas y funcionalmente dinámicas. Los hongos que colonizan los tejidos radicales de plantas adultas se denominan hongos micorrizógenos orquideoides radicales (HMO_r). En estos tejidos, la relación que se establece es típicamente una simbiosis mutualista, en la que los HMO suministran a la planta agua y nutrientes minerales, mientras que la orquídea aporta al hongo compuestos derivados de la fotosíntesis, como trehalosa y vitaminas (Bellino *et al.*, 2014; Jacquemyn *et al.*, 2017). Las hifas de los HMO_r

forman estructuras intrarradicales que se enrollan generando masas compactas denominadas “pelotones”. Algunos HMO_r tienen la capacidad de promover la germinación de semillas; estos se clasifican como hongos micorrizógenos orquideoides promotores de la germinación (HMO_g) y se asocian con las semillas desde los primeros eventos de la germinación (Zhao *et al.*, 2021).

Durante la germinación, el desarrollo y la diferenciación de protocormos, hasta la formación de plántulas con láminas foliares y radícula, los HMO_g proveen carbono y nitrógeno orgánicos - principalmente en forma de azúcares solubles y aminoácidos-, además de minerales como fósforo y azufre (De Rose *et al.*, 2023; Martin, 2017; E. Yeung, 2017). Aunque el flujo de nutrientes en esta etapa es predominantemente hacia la semilla, se ha observado recientemente un retorno de nitrógeno hacia el hongo, lo que sugiere que esta asociación podría considerarse mutualista incluso en esta etapa del desarrollo de las orquídeas. Sin embargo, la dependencia metabólica de la semilla respecto al hongo sigue siendo crítica para su germinación y el desarrollo posterior de la plántula (Fochi *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2025).

Las hifas de HMO_g colonizan el parénquima del protocormo, formando pelotones intracelulares que persisten hasta la diferenciación en plántulas (Yeung *et al.*, 2019). Inicialmente, estas estructuras son masas laxas de hifas que evolucionan hasta formas densas, las cuales eventualmente colapsan y son digeridas por las células hospederas mediante un mecanismo denominado toliofagia (Rasmussen, 1995; Kuga, Sakamoto y Yurimoto, 2014).

Los HMO_g obtienen los nutrientes orgánicos desde las células corticales de las raíces y los transportan a través de sus hifas hacia las semillas en germinación (Bellino *et al.*, 2014). Algunas orquídeas emplean este mecanismo no solo durante la fase germinativa, sino también bajo condiciones ambientales adversas

o incluso durante toda su vida, como ocurre en orquídeas aclorofílicas o algunas terrestres (Rasmussen, 1995; Bellino *et al.*, 2014; Jacquemyn *et al.*, 2017). Otro mecanismo de obtención de nutrientes durante el desarrollo del protocormo la transformación de células hospederas de pelotones en “células digestivas”, que sintetizan quitinasas, peptidasas y otras enzimas líticas en sus vacuolas para la lisis y fagocitosis de los pelotones (Kuga, Sakamoto y Yurimoto, 2014). Al concluir la etapa heterótrofa juvenil y establecerse la fase autótrofa adulta, el flujo de carbono se invierte, dirigiéndose desde la planta hacia el hongo (Cameron *et al.*, 2007).

Epidendrum radicans crece de forma silvestre principalmente en los estados de Puebla, Veracruz, Oaxaca, Tabasco y Chiapas, extendiéndose por Centroamérica y parte de Panamá. Posee una amplia distribución y es utilizada como planta de ornato en muchos hogares mexicanos y florece prácticamente durante todo el año, produciendo múltiples cápsulas con miles de semillas (CONABIO, 2011; Wanderley *et al.*, 2014).

Muchas especies de orquídeas se encuentran amenazadas debido a la destrucción de su hábitat y el comercio ilegal; lo cual, provoca la pérdida de individuos en ambientes silvestres y las coloca en riesgo de erosión genética (Menchaca García y Moreno Martínez, 2011). Una estrategia para fomentar la heterogeneidad genética y promover la variabilidad es mediante la propagación sexual. En este contexto, los HMOg representan una herramienta biológica eficaz para incrementar el éxito de la germinación bajo condiciones controladas, y puede ser incorporada en programas de rescate de materiales genéticamente susceptibles o de mejoramiento genético. Ante esta panorámica, el objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de una estrategia para aislar HMOg a partir de protocormos de *E. radicans* germinados en un sistema de co-cultivo *in vitro* con raíces de plantas adultas colonizadas por HMOg.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

El material vegetal de *E. radicans* se recolectó en jardines y macetas de ornato particulares, ubicadas en cuatro zonas del municipio de Uruapan, Michoacán (Coordenadas: Zona 1: 19°23'33" N 102°02'56" O; Zona 2: 19°23'59" N 102°03'22" O; Zona 3: 19°25'02" N 102°02'58" O; Zona 4: 19°25'18" N 102°03'10" O) (Google Earth, 2021). Las raíces se extrajeron a una profundidad de 10 cm, en cuatro puntos equidistantes a partir del tallo principal, con el fin de obtener una muestra representativa del sistema radical de cada individuo. Las semillas se obtuvieron de cápsulas maduras, previo al estado de dehiscencia.

Tinción de estructuras fúngicas intracelulares en raíces y protocormos

La tinción de tejidos colonizados con hongos micorrizógenos se realizó siguiendo el protocolo de Chávez-Bárceñas *et al.*, (2013), con modificaciones propuestas por Navarro (2021). Se realizaron cortes transversales de raíz de aproximadamente 30 μm , los cuales se colocaron en mallas de tul inorgánico con un poro de exclusión de 240 μm^2 . Para hidrolizar las paredes celulares y clarear los tejidos, las bolsas con los cortes de raíz se sumergieron en una solución de KOH al 2.5 % y se colocaron en autoclave a 120 kPa durante 10 min. Posteriormente, se decantó el KOH, se enjuagó con agua destilada y se trató con HCl al 1 % durante 5 min. Los tejidos se tiñeron con azul de tripano en acetoglicerol (azul de tripano 0.05 %, ácido acético 26.6 %, glicerol 33.3 %) a 80 °C durante 15 minutos. El escrutinio de estructuras micorrízicas se realizó mediante microscopía óptica (Leica Primo Star).

Desinfección superficial de raíces y cápsulas de *E. radicans*

Las raíces se cortaron en fragmentos de 1 cm, se lavaron con agua corriente y se colocaron en tubos de 50 mL. Se agregaron 5 mL de solución de NaClO al 0.6 % con 50 μL de detergente líquido y se agitaron vigorosamente durante 30 s. Luego, se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril, se sumergieron en una solución antibiótica (gentamicina al 1 % y eritromicina al 2 %) durante 30 segundos, con agitación constante y se enjuagaron nuevamente cuatro veces con agua destilada estéril (Beltrán-Nambo *et al.*, 2018).

Las cápsulas se impregnaron con etanol al 96 % y se flamearon bajo condiciones axénicas. Posteriormente, se abrieron con una navaja estéril y las semillas se transfirieron a cajas de Petri estériles. Bajo microscopio estereoscópico (Leica EZ4), se seleccionaron las semillas con embrión aparente (Esquivel, 2013).

Aislamiento de hongos promotores de germinación de *E. radicans*

Se estableció un sistema de co-cultivo simbiótico basado en el principio de las cámaras ecológicas para el estudio *in situ* de semillas diminutas, desarrolladas por Rasmussen y Whigham (1993). Se colocaron 3 g de turba canadiense en recipientes de vidrio de 160 mL, se agregaron 10 mL de agua destilada y se tindalizó en autoclave a 120 kPa durante 1 hora, por tres días consecutivos. Sobre el sustrato se dispusieron 50 fragmentos de raíz de *E. radicans* desinfectada (0.5 mm de grosor). Encima de las raíces se colocó una malla de nylon estéril (poro de exclusión de 240 μm^2) y se humectó con 5 mL de agua destilada estéril. Sobre la malla se distribuyeron 100 semillas de *E. radicans*. Se establecieron nueve frascos de co-cultivo y tres frascos testigo, sin

fragmentos de raíz. Los frascos se incubaron a temperatura ambiente (16 a 26 °C), bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 oscuridad.

Para el aislamiento de hongos, se utilizaron protocormos y plántulas de 120 dds (días después de la siembra). Se disectó la zona basal de los protocormos, la cual se desinfectó por inmersión en etanol al 100 % durante 2 min y en NaClO al 6% durante 1 min, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Los tejidos se transfirieron a cajas de Petri con medio HMO (Modified Oats Medium; Clements *et al.*, 1996) y se incubaron en oscuridad a 26 °C durante 8 días. Plántulas de 120 dds que ya contaban con raíces se desinfectaron por inmersión en etanol al 10 % y 100 µL de solución antibiótica (gentamicina 1 % y eritromicina 2 %), seguido de cuatro enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, se colocaron en cajas de Petri con medio HMO y se incubaron en oscuridad a 26 °C durante 8 días. Transcurrido este tiempo, se observaron bajo microscopio esteroscópico para rastrear hifas emergentes a partir de los fragmentos de protocormos o de las raíces de las plántulas. Las puntas de hifas se disectaron y transfirieron a cajas con medio HMO para establecer cultivos axénicos. La identificación morfológica de los aislados se realizó utilizando las claves de Barnett y Hunter (1998).

Evaluación de la capacidad promotora de germinación y desarrollo temprano de los aislados obtenidos.

Para evaluar la capacidad de los hongos aislados en la promoción de la germinación de *E. radicans*, se sembró cada aislado en frascos de co-cultivo con semillas. Se colocó un disco de 0.5 cm de diámetro de medio HMO con crecimiento micelial sobre turba canadiense, seguido de una malla de nylon estéril (poro de exclusión de 240 µm²), humectada con 5 mL de agua destilada estéril. Sobre el filtro se distribuyeron 50 semillas de *E. radicans*. Cada frasco con un disco micelial y 50 semillas se consideró una unidad experimental. Se establecieron seis réplicas por aislado y seis frascos testigo con discos de medio HMO estéril. Los frascos se dispusieron bajo un diseño completamente al azar y se incubaron a temperatura ambiente (16 a 26 °C), con un fotoperiodo de 16 h luz/8 oscuridad.

Análisis estadístico

El porcentaje de germinación y el desarrollo temprano de *E. radicans* se evaluaron semanalmente en cada unidad experimental, durante un periodo de cuatro meses. Se estableció una escala de desarrollo con base en las etapas descritas para *Dendrobium chrysotoxum* (Gao *et al.*, 2023), correspondientes a la siguiente descripción: estado 1, embrión hinchado; estado 2, embriones crecidos y con testa

rota; estado 3, desarrollo de rizoides y cotiledones del embrión; estado 4, desarrollo de primeras hojas verdaderas; estado 5, desarrollo de hojas verdaderas y raíces de la plántula. Las variables evaluadas correspondieron al número de individuos que alcanzaron cada etapa. Los datos acumulados se sometieron a análisis de esfericidad y posteriormente a un análisis de varianza múltiple (MANOVA) de medidas repetidas mediante el comando PROC GLM. La comparación entre grupos se realizó con la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.01$). La aleatorización del experimento y los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software SAS® OnDemand for Academics, versión 3.81 (SAS, 2012-2020).

RESULTADOS

Presencia de hongos endófitos y formadores de micorriza orquideoide en las raíces adultas de *E. radicans*

Nuestros resultados y análisis confirmaron la presencia de estructuras micorrízicas en las raíces adultas de *E. radicans* provenientes de las cuatro zonas de colecta (Figura 1), lo que sugiere que el material analizado posee potencial para su uso en la bioprospección de HMOg. En los tejidos radicales se observaron hifas intracelulares colonizando extensamente el velamen y las células corticales, especialmente en regiones con mayor contacto con el sustrato (Figura 1A-D). A mayores aumentos, se evidenció la ramificación de hifas en el velamen (Figura 1F) y su penetración hacia el córtex. Se identificó el enrollamiento de hifas poco densas en la exodermis, estrato que separa el velamen de las células corticales (Figura 1G). Las hifas forman pelotones intracelulares -estructuras típicas de las asociaciones micorrízicas de tipo orquideoide-, interconectadas por hifas entre las células corticales, (Figura 1E y H).

Germinación y desarrollo temprano de *E. radicans* en sistema de co-cultivo con raíces colonizadas por HMO

El desarrollo de *E. radicans* se clasificó siguiendo las etapas descritas para *D. crissotum*, lo que permitió caracterizar la progresión del proceso en los frascos de co-cultivo (Gao *et al.*, 2023) (Figura 2). En los tratamientos testigo y en los co-cultivos con raíces de las cuatro zonas, se observaron semillas que alcanzaron la etapa 1 de desarrollo (Figuras 2A). Sin embargo, menos del 5 % de las semillas en los frascos testigo progresaron al estado 2 (Figura 2B) y ninguna continuó hacia etapas posteriores. En contraste, los tratamientos con raíces colonizadas alcanzaron un total del 32 % al 66 % de germinación a los 15 dds y las semillas germinadas llegaron al estado 3 a partir de los 30 dds (Figura 2C). En estos mismos tratamientos, se observó el estado 5 de desarrollo a los 45 dds (Figura 2E).

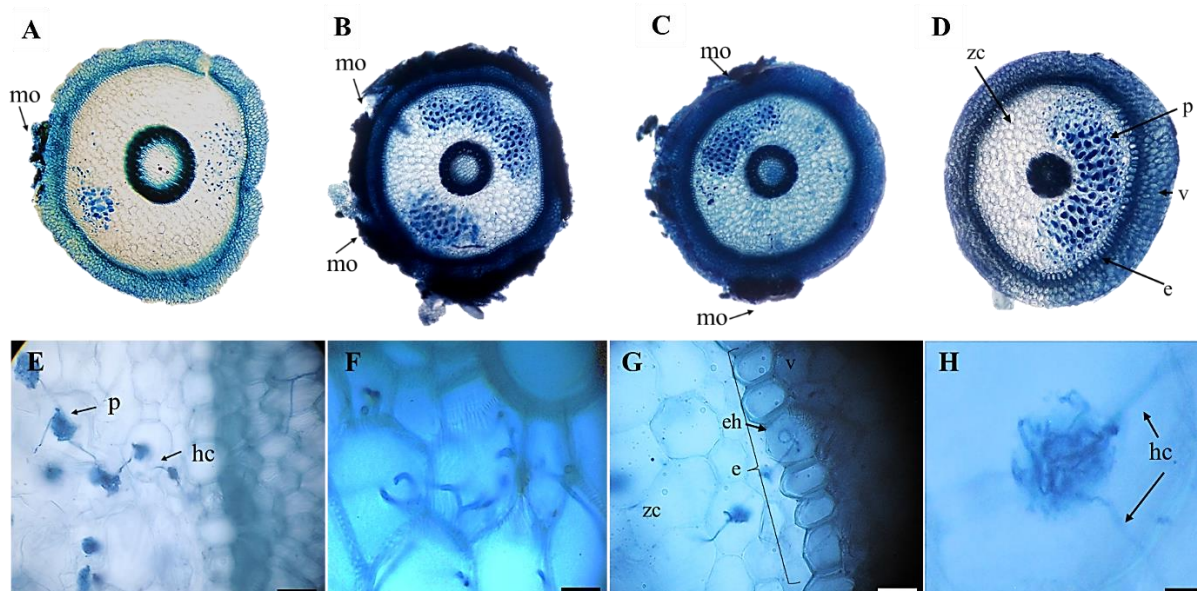


Figura 1. Micorriza orquideoide en tejidos intrarradicales de *E. radicans*. Ejemplos de cortes transversales de raíces colectadas en las zonas 1 (A), 2 (B), 3 (C) y 4 (D); células corticales colonizadas por HMOR (E); velamen con hifas intracelulares (F); región de transición de velamen, exodermis y zona cortical (G); pelotón en una célula cortical (H). En las figuras mo= materia orgánica; v= velamen; e= exodermis; zc= zona cortical; p= pelotón; hc= hifa intercortical y eh= enrollamiento hifal. La barra de escala representa 50 μ m en E, F y G; 10 μ m en H.

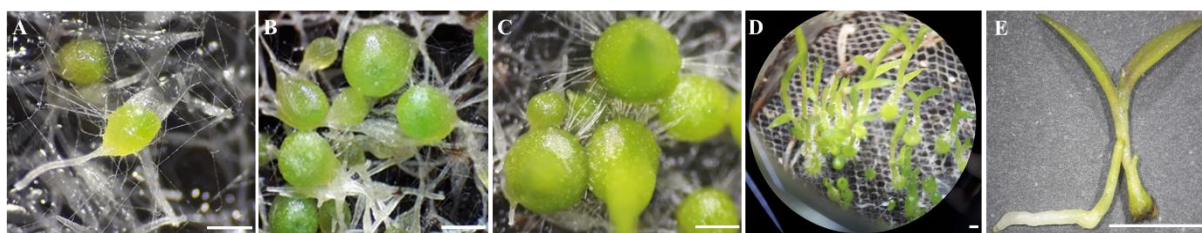


Figura 2. Identificación de estados de desarrollo de las *E. radicans*. Estado 1, embrión hinchado (A); estado 2, embriones crecidos y con testa rota (B); estado 3, desarrollo de rizoides y cotiledones del embrión (C); estado 4, desarrollo de primeras hojas verdaderas (D); estado 5, desarrollo de hojas verdaderas y raíces de la plántula (E). La barra de escala representa 500 μ m en A, B y C y 1 cm en D y E.

Hongos cultivables aislados

A partir de los protocormos y plántulas obtenidas en los frascos de co-cultivo, se aislaron 16 cultivos axénicos de hongos cultivables. Uno de los aislados presentó células moniloides binucleadas (Figura 3A), características del género *Ceratobasidium*, el cual incluye especies consideradas como teleomorfos de *Rhizoctonia*. Otro aislado mostró hifas septadas con ramificaciones en ángulos de 45 y 90°, sin estructuras reproductivas evidentes bajo las condiciones axénicas en las que se cultivó (Figura 3B), lo que coincide con características morfológicas del género *Rhizoctonia*. Los 14 aislados restantes presentaron estructuras reproductivas características de *Fusarium* spp., como clamidosporas, macroconidios y principalmente microconidios (Figura 3B).

Los aislados de *Ceratobasidium* sp. y *Rhizoctonia* sp. promovieron la germinación de *E. radicans*

Para corroborar la capacidad de los hongos aislados de promover la germinación de *E. radicans*, se seleccionó un aislado representativo de *Fusarium* sp., así como de los identificados morfológicamente como *Ceratobasidium* sp. y *Rhizoctonia* sp. Cada aislado se inoculó en seis frascos de co-cultivo y se compararon con frascos testigo sin hongos. En los frascos testigo, las semillas no progresan más allá del estado 3 de desarrollo (Figura 3D). En cambio, en presencia de *Ceratobasidium* sp. y *Rhizoctonia* sp., se observó desarrollo de plántulas hasta presentar hojas y raíces verdaderas (Figuras 3E y 3F). Por el contrario, la presencia de *Fusarium* sp. en los frascos de co-cultivo inhibió el desarrollo de *E. radicans* a partir de semillas (Figura 3G).

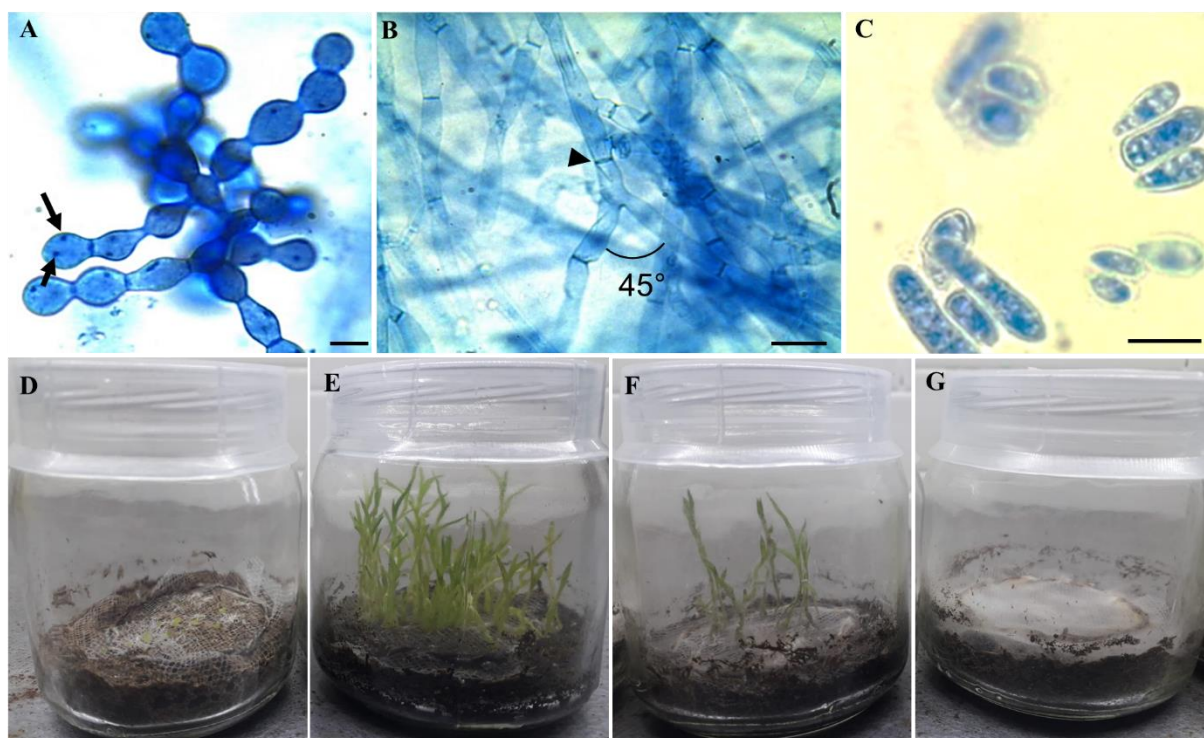


Figura 3. Morfología de los aislados fúngicos en cultivos axénicos y co-cultivo de semillas de *E. radicans* con los hongos aislados. Células moniloides binucleadas observadas en el morfotipo identificado como *Ceratobasidium* sp. (A); Hifas septadas en ángulo de 45° del morfotipo *Rhizoctonia* sp. (B); microconidios de un morfotipo identificado como *Fusarium* sp. (C). Frascos de co-cultivo del testigo (sin hongo) (D); co-cultivo con *Ceratobasidium* sp. (E); co-cultivo con *Rhizoctonia* sp. (F); co-cultivo con *Fusarium* sp. (G). En la imagen, las flechas señalan los núcleos en las células moniloides del morfotipo *Ceratobasidium* sp. y la punta de flecha señala un septo de una hifa ramificada en 45° del morfotipo *Rhizoctonia* sp.; la barra de escala representa 10 µm.

El análisis detallado del desarrollo de *E. radicans* en los frascos de co-cultivo reveló que, en el tratamiento testigo, el desarrollo autónomo de la semilla es limitado. Poco más del 20% alcanzó el estado 1 de desarrollo en la segunda semana de haber iniciado el co-cultivo (Figura 4A), pero menos del 20% llegó al estado 2 y menos del 10% al estado 3 (Figuras 4B y 4C). Ningún individuo progresó más allá de esta etapa.

En los frascos inoculados con *Rhizoctonia* sp., se observó crecimiento micelial abundante desde la primera semana. 15 % de las semillas expuestas a este aislado alcanzaron el estado 1 a partir de la primera semana (Figura 4A). Para la segunda semana, 15.6% de los individuos llegaron al estado 2, y 8 % comenzaron a diferenciar cotiledones y rizoides (Figura 4B y 4C). A partir de la semana 5, menos del 10 % logró el estado 4 de desarrollo y menos del 20 % alcanzó esta etapa durante las 16 semanas que se mantuvo el experimento. Finalmente, el 4 % de los individuos formaron raíces verdaderas en la semana 9, sin incremento posterior (Figura 4D).

En los frascos inoculados con *Ceratobasidium* sp., el crecimiento micelial fue menos profuso, pero más eficiente en promover el desarrollo de *E. radicans*. El estado 1 se presentó en el 95% de las semillas y el 86.6 % progresó hasta el estado 4 durante las 16 semanas en que se evaluó el experimento ((Figuras 4A y 4D). Además de presentar hojas verdaderas, más del 8% de los individuos ya presentaban raíces verdaderas (Figura 4E).

Colonización micorrízica en protocormos y plántulas germinadas en co-cultivo con *Ceratobasidium* sp. y *Rhizoctonia* sp.

Los individuos de *E. radicans* germinados en co-cultivo con los aislados identificados como *Ceratobasidium* sp. y *Rhizoctonia* sp. presentaron estructuras fúngicas intracelulares características de las asociaciones micorrízicas orquideoides. Se extrajeron protocormos y plántulas correspondientes a los estados 1, 3 y 5 de desarrollo, los cuales fueron teñidos con azul de tripano para evidenciar la colonización fúngica. En todos los casos se observaron pelotones, que son las estructuras características de la micorriza orquideoides.

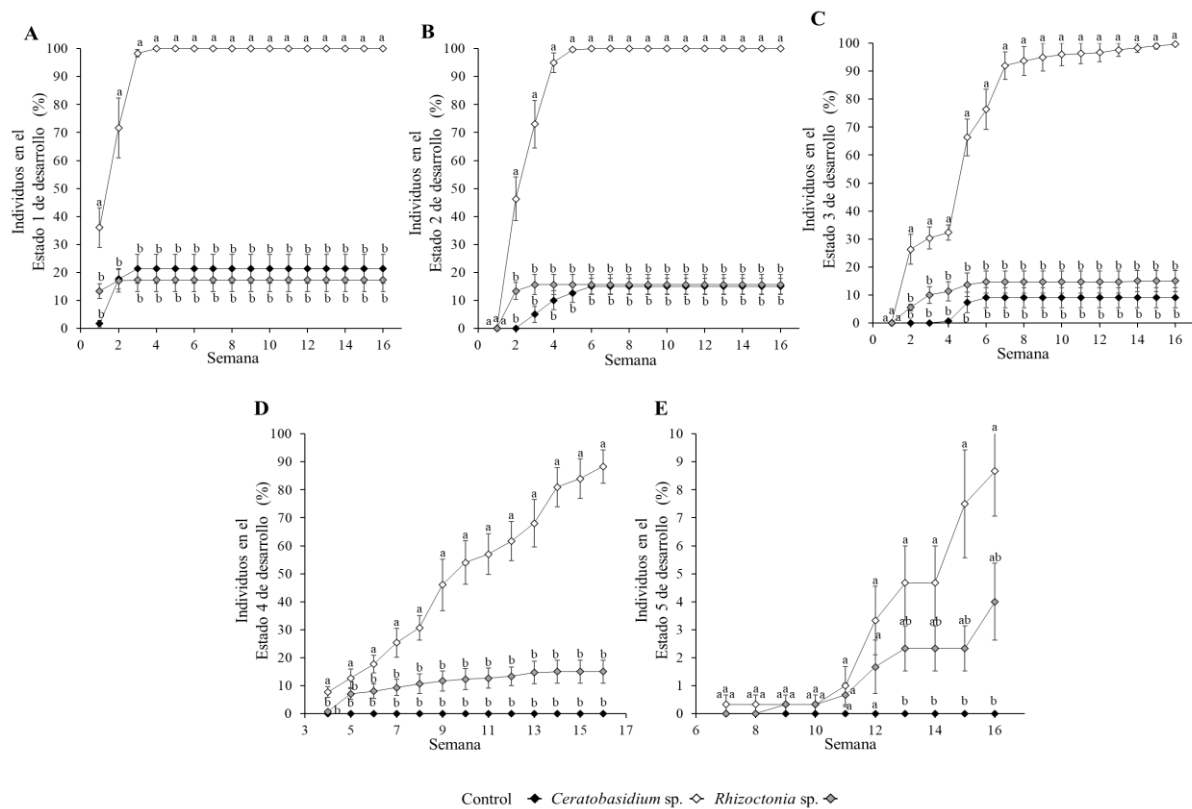


Figura 4. Curva acumulada de los estados de desarrollo de *E. radicans* en co-cultivo con los aislados obtenidos. Estado 1 de desarrollo (A); estado 2 de desarrollo (B); estado 3 de desarrollo (C); estado 4 de desarrollo (D); estado 5 de desarrollo (E). La significancia se determinó mediante análisis de varianza múltiple (MANOVA) de medidas repetidas mediante el procedimiento GLM de SAS; las barras corresponden al error estándar de la media; letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Tukey ($p < 0.01$).

Desde las etapas más tempranas de germinación (estado 1), se detectó la presencia de pelotones (Figura 5A). En los estados 3 y 5, la formación de pelotones se restringió principalmente a la región basal del embrión, zona de emergencia de los rizoides (Figura 5 B y 5C). La colonización fúngica también se evidenció en la protodermis y en los rizoides (Figuras 5D-F). En particular, los embriones co-cultivados con *Ceratobasidium* sp. mostraron la formación de células monilioides en los rizoides (Figura 5E), rasgo distintivo de este género.

Las hifas observadas en la protodermis y en los rizoides se extendieron hacia las células parenquimáticas basales del embrión, donde comenzaron a formar pelotones interconectados. A medida que las hifas colonizaban células parenquimáticas más internas, los pelotones incrementaron en tamaño y densidad (Figura 5G).

DISCUSIÓN

Las raíces adultas de *E. radicans* recolectadas mostraron estructuras típicas de la simbiosis micorrízica funcional de tipo orquídeoide, incluyendo hifas en el velamen y enrollamiento denso de las hifas formando pelotones intracelulares en células corticales. Esta observación valida el uso

de dichos tejidos como fuente confiable para la bioprospección de HMOg. La distribución de las hifas en el velamen, su penetración hacia la exodermis y la formación de pelotones en el córtex interno sugieren una colonización activa, estructurada y posiblemente estable, en concordancia con lo reportado para otras especies de orquídeas tropicales (Jacquemyn *et al.*, 2017; Brundrett y Tedersoo, 2018).

El sistema de co-cultivo simbiótico permitió establecer una interacción funcional *in vitro* entre las raíces colonizadas y las semillas. Se hizo evidente el crecimiento de hifas hacia las semillas y se alcanzaron tasas de germinación de hasta 66 % a los 15 dds. Estos resultados superaron ampliamente los obtenidos en el tratamiento testigo (menor a 5 %), lo cual demostró que la participación de los HMO de las raíces es determinante para la germinación y diferenciación de protocormos. El desarrollo progresivo hacia la formación de plántulas con hojas y raíces a los 45 dds ratifica la función simbiótica establecida en el sistema de co-cultivo, en línea con lo documentado por Wang *et al.* (2021) y Yeung *et al.* (2019), quienes destacaron el eminente papel de los HMOg en el suministro de carbono, nitrógeno y minerales para el desarrollo de las orquídeas durante sus etapas heterotróficas juveniles.

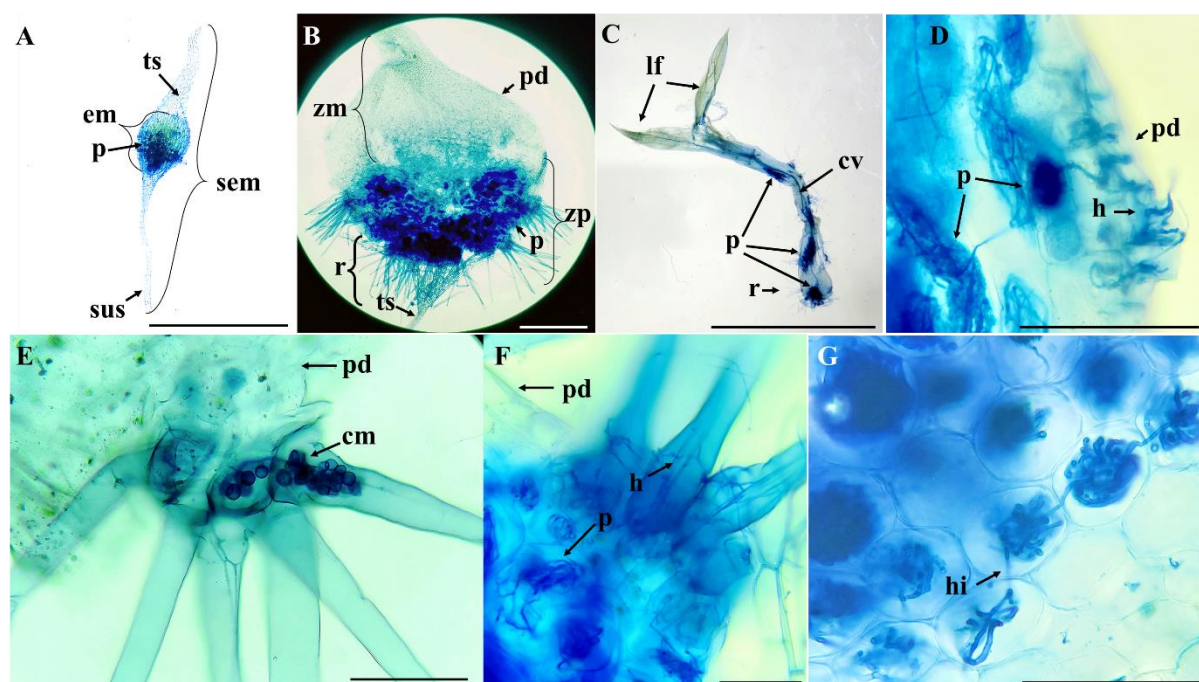


Figura 5. Tinción de individuos de *E. radicans* de estados tempranos de desarrollo, co-cultivados con los aislados fúngicos identificados como *Rhizoctonia* sp. y *Ceratobasidium* sp. Estado 1 de desarrollo (A); estado 3 de desarrollo (B); estado 5 de desarrollo (C); protodermis (D); rizoides de un individuo del estado 3 de desarrollo co-cultivado con *Ceratobasidium* sp. mostrando células monilioides en su interior (E); rizoides de un individuo del estado 3 de desarrollo co-cultivado con *Rhizoctonia* sp. (F); pelotones en células parenquimáticas, nótese el incremento del tamaño y densidad de hifas de los pelotones desde la esquina inferior derecha en dirección a la esquina superior izquierda (G). En las figuras em= embrión; ts= tegumento seminal; sem= semilla; sus= células del suspensor; p= pelotones; zm= zona meristemática; zp= zona parenquimática; pd= protodermis; r= rizoides; lf= lámina foliar; cv= cilindro vascular; h= hifa; hi= hifa intercortical y cm= células molioides. La barra de escala representa 500 µm en A y B; 1 cm en C; 50 µm en D, E, F y G.

Las especies de HMOg más comunes pertenecen a los agregados polifiléticos de “rhizoctonia”, que incluye géneros de Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae y Serendipitaceae; otros géneros como *Mycena*, *Thanatephorus* y *Fusarium* también han mostrado capacidad para promover la germinación simbiótica de orquídeas (Zhao *et al.*, 2021).

El predominio de morfotipos de *Fusarium* spp. entre los 16 aislados cultivables obtenidos, sugiere una alta incidencia de este hongo como endófito de las raíces de *E. radicans*. Especies del género *Fusarium* han sido comúnmente reportadas como endófitos no-micorrízicos de orquídeas, predominantemente saprófitos, parásitos o generando una colonización moderada sin ocasionar efectos negativos en las plantas adultas (Tsavkelova y Kolomeitseva, 2022; Petrolli *et al.*, 2024); sin embargo, se han reportado también algunos aislados de *Fusarium* spp. con un comportamiento correspondiente al de HMO funcionales, promotores de la germinación de orquídeas como *Cypripedium* spp. (Vujanovic *et al.*, 2000) y *Bletilla striata* (Jiang *et al.*, 2019). En este trabajo, el aislado de *Fusarium* sp. evaluado no mostró actividad micorrízica, aunque existe la posibilidad de que alguno de los otros 13 aislados de

este género obtenidos pudiera mostrar resultados distintos.

Los aislados de *Rhizoctonia* sp. y *Ceratobasidium* sp. promovieron la germinación y la diferenciación de protocormos hasta la formación de plántulas con hojas y raíces. El aislado de *Ceratobasidium* sp. mostró una capacidad significativamente superior para la promoción de germinación al promover que el 100% de los individuos alcanzaran el estado 2 de desarrollo en 5 semanas, mientras que *Rhizoctonia* sp. logró un máximo de 15 %, además *Ceratobasidium* sp. generó 5.7 veces más plántulas con hoja verdadera y 4.3 veces más plántulas con hoja y raíz. Esta diferencia podría atribuirse a la compatibilidad fisiológica entre *Ceratobasidium* sp. y *E. radicans*, así como a una eficiencia simbiótica más alta, implicando una mayor aptitud en la transferencia de nutrientes, como se ha documentado entre otras especies de orquídeas y hongos (Tsuksiyah *et al.*, 2021). Por otro lado, el micelio de *Rhizoctonia* sp. mostró un crecimiento más abundante que el de *Ceratobasidium* sp. lo cual sugiere una relación simbiótica menos estable o una mayor competencia por recursos en el sistema de co-cultivo. La variabilidad funcional del hospedero puede deberse a la compatibilidad simbiótica, como ha sido reportado en estudios donde *Rhizoctonia*

actúa como simbiote facultativo con variabilidad funcional según el hospedero y las condiciones ambientales (Tedersoo *et al.*, 2020).

Implicaciones biotecnológicas y ecológicas

El empleo de *E. radicans* como modelo de estudio se basó en sus características biológicas, la disponibilidad y fácil acceso a una fuente de material biológico para la estandarización y validación de los protocolos utilizados en la bioprospección de HMOg, pero no se excluye la posibilidad de utilizar los hongos aislados en la promoción de la germinación para aplicaciones biotecnológicas en horticultura y restauración ecológica.

La validación funcional de *Ceratobasidium* sp. y *Rhizoctonia* sp. como HMOg de *E. radicans* tiene implicaciones ecológicas y biotecnológicas como una opción para la generación de estrategias de conservación y propagación sexual que incrementa la variabilidad genética de orquídeas nativas. La capacidad de estos hongos para inducir la germinación de otras especies de orquídeas requiere la evaluación de su compatibilidad simbiótica en cada caso en particular. Los HMOg pueden presentar compatibilidad simbiótica con distintas especies de orquídeas, como ha sido documentado por Yang *et al.* (2021), quienes observaron compatibilidad simbiótica de distintos aislados de *Tulasnella* spp. con dos especies de orquídeas, *Cymbidium mannii* y *E. radicans*, la eficiencia de la germinación varió en las interacciones específicas entre los aislados fúngicos y las especies de orquídea, pero hubo aislados que promovieron la germinación de ambas orquídeas.

El protocolo de tinción modificado en el presente estudio, así como el sistema de co-cultivo propuesto, representan herramientas innovadoras, reproducibles y de bajo costo para la identificación y aislamiento de HMOg, así como evaluación de compatibilidad simbiótica de HMOg y orquídeas bajo condiciones controladas.

Perspectivas futuras

Futuras investigaciones podrían profundizar en el estudio de la interacción tripartita entre HMOg, orquídeas y microbiota edáfica, así como el efecto de diferentes sustratos y condiciones ambientales en la eficiencia simbiótica. En este trabajo, se realizaron ensayos preliminares de compatibilidad simbiótica entre los aislados obtenidos y *E. radicans*, mediante co-cultivo en medio HMO. Sin embargo, estos ensayos mostraron una eficiencia sensiblemente baja y no reproducible (datos no mostrados). Al considerar estos resultados junto con la observación de una mayor densidad de estructuras micorrízicas en los tejidos de raíces adultas ubicados en las zonas con adherencias de materia orgánica (Figura 1), se sugiere que ciertos componentes del sustrato orgánico, ausentes en medios como el HMO, podrían

tener un papel clave en el establecimiento y éxito fisiológico de la simbiosis.

Investigaciones previas en *Laelia autumnalis* han reportado una mayor colonización micorrízica en raíces que contenían partículas de sustrato (Jiménez-Peña *et al.*, 2018). Asimismo, la disponibilidad y calidad de nutrientes se ha identificado como un factor determinante en la eficiencia de la germinación simbiótica de orquídeas (Yang *et al.*, 2021). Diversos estudios sobre especies terrestres y epífitas han demostrado que variables como la fuente de carbono, la intensidad lumínica, además de la compatibilidad simbiótica influyen significativamente en el éxito germinativo (Alghamdi, 2019). Por ejemplo, en co-cultivos de *Prasophyllum* sp. con *Ceratobasidium* sp., se observó que el comportamiento de la simbiosis varía dependiendo de la fuente de carbono: a mayor concentración de glucosa, el crecimiento micelial fue más vigoroso, pero con tendencia saprofítica; en cambio, bajo condiciones de menor concentración de glucosa, se favoreció la simbiosis y la tasa de germinación alcanzó hasta un 39.7 % (Freestone *et al.*, 2022).

Estudios metagenómicos en orquídeas terrestres como *Vanilla planifolia* han revelado una abundancia hasta nueve veces mayor de secuencias putativas de HMOg en raíces terrestres en comparación con raíces aéreas, lo que refuerza la hipótesis de que el entorno edáfico y sus componentes orgánicos modulan significativamente la colonización micorrízica (Johnson *et al.*, 2021)

Sería pertinente evaluar la persistencia de la simbiosis en etapas posteriores del desarrollo y bajo condiciones de estrés abiótico y/o biótico, para determinar la viabilidad de los aislados en programas de reintroducción. Asimismo, sería valioso establecer bancos de germoplasma simbiótico con aislados funcionales validados, que sirvan como recurso para la conservación de especies endémicas.

CONCLUSIONES

El protocolo de tinción modificado y el sistema de co-cultivo propuesto en esta investigación constituyen herramientas reproducibles, accesibles y de bajo costo para la identificación, aislamiento y evaluación de compatibilidad simbiótica entre HMOg y orquídeas bajo condiciones controladas.

Los aislados fúngicos obtenidos a partir de protocormos simbióticos pertenecieron a los géneros *Fusarium*, *Ceratobasidium* y *Rhizoctonia*.

Entre los aislados evaluados, *Ceratobasidium* sp. mostró una eficiencia simbiótica notablemente superior en comparación con *Rhizoctonia* sp., lo que sugiere una mayor compatibilidad fisiológica y capacidad de transferencia de nutrientes con *E. radicans*.

Aunque *Fusarium* spp. predominó entre los aislados cultivables, su papel como HMOg funcional permanece incierto; ya que, bajo las condiciones de cultivo, el aislado evaluado no mostró actividad simbiótica, pero otros morfotipos podrían presentar comportamientos distintos que ameritan una evaluación posterior.

El sistema de co-cultivo simbiótico desarrollado permitió establecer interacciones funcionales *in vitro* entre raíces colonizadas con HMO y semillas de *E. radicans*, alcanzando tasas de germinación significativamente superiores al tratamiento testigo, lo que confirma el papel determinante de los HMOg como promotores de la germinación y la diferenciación de protocormos.

Funding. Founding support was provided by A.T.C.-B. from Coordinación de la Investigación Científica (Project: 6790140), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, and from Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación, Gobierno de Michoacán (Project: FCCHTI23_ME-4.1.-00020). I. A. S.-S. (732373) and F. N.-R. (814469) received scholarships granted by the Secretaría de Ciencia, Humanidades Tecnología e Innovación (SECIHTI), Mexico.

Conflict of interest. The authors declare that they do not have conflicts of interest.

Compliance with ethical standard. Before collecting the seeds and plants used in this study, the owners of the gardens and nurseries from which the material was obtained were informed about the objectives and nature of the study. They agreed to donate it and their names were kept confidential.

Data availability: Data is available upon reasonable request to the corresponding author: tztzqui.chavez@umich.mx

Authors contribution statement (CredIT). F. Navarro-Álvarez – Investigation, Methodology, Data curation, Writing – original draft. I. A. Salmeron-Santiago – Writing – original draft, Writing – review & editing. P. A. López – Data curation, Validation, Visualization. J. L. Morales-García – Visualization, Validation. M. E. Pedraza-Santos – Data curation, Validation, Visualization. A. T. Chávez Bárcenas – Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Data curation, Investigation, Methodology, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

REFERENCES

- 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), pp.495–502.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.021>.
- Arditti, J., 2022. *Orchids - discoverers and firsts. South African Journal of Botany*.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.01.029>.
- Barnett H. and Hunter B., 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Bellino, A., Alfani, A., Selosse, M.A., Guerrieri, R., Borghetti, M. and Baldantoni, D., 2014. Nutritional regulation in mixotrophic plants: New insights from *Limodorum abortivum*. *Oecologia*, 175(3), pp.875–885.
<https://doi.org/10.1007/s00442-014-2940-8>.
- Beltrán-Nambo, M. de los A., Martínez-Trujillo, M., Montero-Castro, J.C., Salgado-Garciglia, R., Otero-Ospina, J.T. and Carreón-Abud, Y., 2018. Fungal diversity in the roots of four epiphytic orchids endemic to Southwest Mexico is related to the breadth of plant distribution. *Rhizosphere*, 7, pp.49–56.
<https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.07.001>.
- Brundrett, M.C. and Tedersoo, L., 2018. *Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity*. New Phytologist,
<https://doi.org/10.1111/nph.14976>.
- Cameron, D. D., Johnson, I., Leake, J. R. and Read, D. J. 2007. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botany*, 995, 831–834.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcm018>
- Chávez-Bárcenas, A., Lua-Aldama, J., Salmerón-Santiago, I., Silva-Adame, M. 6, García-Saucedo, P. and Olalde-Portugal, V., 2013. A modified staining technique for the anatomical observation of mycorrhizal roots of woody trees. *African Journal of Microbiology Research*, 7(28), pp.3589–3596.
- Clements, M., Muir, H. and Cribb, P., 1996. A Preliminary Report on the Symbiotic Germination of European Terrestrial Orchids. *Royal Botanic Gardens, Kew*, 41(2), p.437.
- CONABIO, 2011. *Ficha técnica E. radicans cultivo de planta de ornato potencial*.
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/orchidaceae/epidendrum-radians/fichas/ficha.htm>.

- De Rose, S., Kuga, Y., Sillo, F., Fochi, V., Sakamoto, N., Calevo, J., Perotto, S. and Balestrini, R. 2023. Plant and fungal gene expression coupled with stable isotope labeling provide novel information on sulfur uptake and metabolism in orchid mycorrhizal protocorms. *Plant Journal*. <https://doi.org/10.1111/tj.16381>
- Esquivel, A., 2013. *Criocconservación de semillas y protocormos de especies de la Familia Orchidaceae en peligro de extinción*. Costa Rica: TEC.
- Fochi, V., Chitarra, W., Kohler, A., Voyron, S., Singan, V.R., Lindquist, E.A., Barry, K.W., Girlanda, M., Grigoriev, I. V., Martin, F., Balestrini, R. and Perotto, S., 2017. Fungal and plant gene expression in the *Tulasnella calospora*–*Serapias vomeracea* symbiosis provides clues about nitrogen pathways in orchid mycorrhizas. *New Phytologist*, 213(1), pp.365–379. <https://doi.org/10.1111/nph.14279>.
- Freestone, M., Linde, C., Swarts, N. and Reiter, N., 2022. *Ceratobasidium* orchid mycorrhizal fungi reveal intraspecific variation and interaction with different nutrient media in symbiotic germination of *Prasophyllum* (Orchidaceae). *Symbiosis*, 87(3), pp.255–268. <https://doi.org/10.1007/s13199-022-00874-9>.
- Gao, X., Wang, Y., Deng, D., Luo, Y., Shao, S. and Luo, Y. 2023. Morphogenesis Changes in Protocorm Development during Symbiotic Seed Germination of *Dendrobium chrysotoxum* (Orchidaceae) with Its Mycobiont, *Tulasnella* sp. *Horticulturae*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/horticulturae9050531>
- Google Earth. 2021. Mapa de Uruapan. Accesado de: <https://earth.google.com/>.
- Jacquemyn, H., Waud, M., Brys, R., Lallemand, F., Courty, P.E., Robionek, A. and Selsos, M.A., 2017. Mycorrhizal associations and trophic modes in coexisting orchids: An ecological continuum between auto- and mixotrophy. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01497>
- Jiang, J., Zhang, K., Cheng, S., Nie, Q., Zhou, S., Chen, Q., Zhou, J., Zhen, X., Li, X. ting, Zhen, T. wen, Xu, M., Hsiang, T., Sun, Z. and Zhou, Y., 2019. *Fusarium oxysporum* KB-3 from *Bletilla striata*: an orchid mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza*, [online] 29(5), pp.531–540.
- <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00904-3>
- Johnson, L. J. A. N., González-Chávez, M. del C. A., Carrillo-González, R., Porras-Alfaro, A. and Mueller, G. M. 2021. *Vanilla* aerial and terrestrial roots host rich communities of orchid mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. *Plants People Planet*, 3(5), 541–552. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10171>
- Jiménez-Peña, N., Sandoval-Villa, M., Volke-Haller, V.H., Pedraza-Santos, M.E. and Fernadez-Herrera, E., 2018. Colonización micorrízica de *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex.) Lindl. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 5(15), p.547. <https://doi.org/10.19136/era.a5n15.1756>
- Kuga, Y., Sakamoto, N. and Yurimoto, H., 2014. Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *New Phytologist*, 202(2), pp.594–605. <https://doi.org/10.1111/nph.12700>
- Kull, T. and Arditti, J., 2002. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives, VIII*. VIII ed. Springer Science & Business Media.
- Li, T., Wu, S., Yang, W., Selosse, M.A. and Gao, J., 2021. *How Mycorrhizal Associations Influence Orchid Distribution and Population Dynamics*. *Frontiers in Plant Science*, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.647114>
- Li, Y., Zhang, B. and Yu, H., 2022. *Molecular genetic insights into orchid reproductive development*. *Journal of Experimental Botany*, <https://doi.org/10.1093/jxb/erac016>
- Martin, F., 2017. *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. [online] Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, inc. Available at: <http://www.wiley.com/go/permissions.wiley.com>.
- Mauseth, J.D., 2017. *Botany. An introduction to plant biology*. 6th Ed ed. Burlington, Massachusetts: Jones & Bartlett.
- Menchaca García, R.A. and Moreno Martínez, D., 2011. *Conservación de orquídeas, una tarea de todos y la Agricultura*. Texcoco, México.
- Navarro, A., 2021. *Aislamiento e identificación de hongos micorrizógenos promotores de germinación y desarrollo inicial de Epidendrum radicans Pav. ex Lindl.*

- Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Peterson, L., Uetake, Y. y Zelmer, C., 1998. Fungal Symbiosis with orchid Protocorms. *Symbiosis*, 25, pp.29–55.
- Petrolli, R., Selosse, M.A., Bonillo, C., Griveau, C., Lalanne-Tisné, G., Comes, B., Kodja, H. and Martos, F., 2024. Mycorrhizal communities of *Vanilla planifolia* in an introduction area (La Réunion) under varying cultivation practices. *Plants People Planet*, 6(3), pp.683–696. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10476>
- Rasmussen, H. and Whigham, D., 1993. Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *American Journal of Botany*, 80, pp.1374–1378.
- Rasmussen, H.N., 1995. *Terrestrial orchids. From seed to mycotrophic plant*. 1st ed. New York: Cambridge University Press.
- SAS OnDemand for Academics. 2012-2020. *Statistical Analysis System, Version 3.81*. Cary, NC, USA.
- Tedersoo, L., Bahram, M. and Zobel, M., 2020. How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. *Science*, 367(6480). <https://doi.org/10.1126/science.aba1223>
- Tsavkelova, E.A. and Kolomeitseva, G.L., 2022. *Fusarium*–orchid interactions under greenhouse conditions. *South African Journal of Botany*, 146, pp.889–896. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.03.038>
- Tsulsiyah, B., Farida, T., Sutra, C.L. and Semiarti, E., 2021. Important role of mycorrhiza for seed germination and growth of dendrobium orchids. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, <https://doi.org/10.22146/JTBB.60805>
- Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barabé, D. and Thibeault, G., 2000. Viability Testing of Orchid Seed and the Promotion of Colouration and Germination. *Annals of Botany*, [online] 86(1), pp.79–86. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1162>
- Wanderley, C., Farla, T., Ventura, M. and Vendrame, W., 2014. Growth regulators in the development of potted *Epidendrum radicans* orchid. *African Journal of Agriculture Research*, 9(51), pp.3672–3678.
- Wang, D., Jacquemyn, H., Gomes, S.I.F., Vos, R.A. and Merckx, V.S.F.T., 2021. Symbiont switching and trophic mode shifts in Orchidaceae. *New Phytologist*, 231(2), pp.791–800. <https://doi.org/10.1111/nph.17414>
- Yang, Q., Xu, L., Xia, W., Liang, L., Bai, X., Li, L., Xu, L. and Liu, L. (2021). Mycorrhizal Compatibility and Germination-Promoting Activity of *Tulasnella* Species in Two Species of Orchid (*Cymbidium mannii* and *Epidendrum radicans*). *Horticulturae*, 7(11), 472. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7110472>
- Yeung, E., 2017. A perspective on orchid seed and protocorm development. *Botanical Studies*, 58(1).
- Yeung, E. C., Li, Y. Y. and Lee, Y. I. 2019. An overview of the life of an orchid protocorm – a developmental perspective. *Acta Horticulturae*, 1262. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1262.3>
- Zhao, D.K., Selosse, M.A., Wu, L., Luo, Y., Shao, S.C. and Ruan, Y.L., 2021. *Orchid Reintroduction Based on Seed Germination-Promoting Mycorrhizal Fungi Derived From Protocorms or Seedlings*. *Frontiers in Plant Science*, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.701152>
- Zhao, Z., Wang, Y., Yang, L., Qian, X., Yang, A., Liu, J., Jacquemyn, H., Li, T. and Xing, X., 2025. Metabolic Shifts and Nutrient Transfer Patterns in Orchid Seeds During Symbiotic Germination. *Plant, Cell and Environment*, 48(8), pp.6406–6420. <https://doi.org/10.1111/pce.15612>