

## Propagación in vitro de semillas de la orquídea *Comporettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas

### *In vitro* propagation of *Comporettia falcata* Poepp. & Endl. (Orchidaceae) seeds using symbiotic and asymbiotic techniques

Héctor Karol Chávez<sup>1</sup>, Ana Teresa Mosquera-Espinosa<sup>1,2</sup>, Joel Túpac Otero Ospina<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Grupo de investigación en Orquídeas, Ecología y Sistemática Vegetal. <sup>2</sup>Programa de Ingeniería Agronómica, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. <sup>3</sup>Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. <sup>4</sup>Instituto de Estudios Ambientales IDEA Palmira, Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira. Autor para correspondencia: [jtoeroo@unal.edu.co](mailto:jtoeroo@unal.edu.co)

Rec.: 01.09.2014 Acep.: 13.09.2014

### Resumen

Para su germinación, las orquídeas dependen de hongos micorrízicos y muchas de las características únicas de estas plantas están asociadas con el hongo que las coloniza. En este trabajo se evaluó la germinación de semillas de la orquídea *Comporettia falcata* en condiciones de laboratorio utilizando los métodos simbióticos: dos hongos micorrízicos de orquídeas de diferentes especies y un aislamiento patogénico de *Rhizoctonia solani* obtenido de arroz, y los asimbióticos: formulación de Knudson C y MS (Murashie & Skood). Se encontraron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos, resultando mejor el método asimbiótico con la formulación Knudson C y el simbiótico con *R. solani*, patógeno de arroz. Además, se observó que los tratamientos donde se implementó la metodología simbiótica tuvieron menor porcentaje de contaminación por microorganismos que los tratamientos de tipo asimbiótico.

**Palabras clave:** *Ceratobasidium*, Colombia, conservación de orquídeas, Orchidaceae, propagación in vitro, germinación, micorrizas de orquídeas, simbiosis.

### Abstract

Orchids depend on mycorrhizal fungi for seed germination and many unique characteristic of orchids are related to this interaction. In this paper, the seed germination of *Comporettia falcate* (Orchidaceae) was evaluated using both symbiotic (with two mycorrhizal fungi isolated from orchids and a *Rhizoctonia solani* strain isolated from rice) and asymbiotic techniques (with two growing media Knudson C and MS - Murashie & Skood) in laboratory conditions. There were significant differences among treatments. The best treatments for *C. falcata* seed germination was the asymbiotic method with Knudson C media and the symbiotic method with the rice pathogenic *R. solani*. Additionally, the symbiotic treatments had lower contamination than asymbiotic ones.

**Keywords:** *Ceratobasidium*, Colombia, germination, Orchidaceae, orchid conservation, orchid mycorrhiza, symbiosis.

## Introducción

La familia botánica Orchidaceae (orquídeas) es una de las que mayor número de especies posee en el reino vegetal, con cerca de 27,135 en todo el mundo y 900 géneros (Zotz, 2013), sin contar que día tras día se encuentran nuevas especies e híbridos naturales. Las orquídeas son plantas extremadamente diversificadas predominantes en las regiones de climas tropicales y subtropicales, en zonas localizadas entre 300 y 4500 m.s.n.m. (Calderón-Sáenz, 2007). Estas plantas producen flores que pueden tardar largo tiempo para desarrollarse, además, sus semillas son muy pequeñas y poseen escasa reserva de nutrientes para germinar (Arditti y Ghani, 2000). Por esta razón, en condiciones naturales requieren una relación simbiótica con hongos que cumplen una actividad micorrizica, proporcionando a las plantas jóvenes azúcares y nutrientes necesarios para desarrollarse y crecer lo suficiente para fabricar sus propios nutrientes (Rasmussen, 1995, 2002).

Las orquídeas dependen de hongos micorrizicos para germinar y muchas de las características únicas que las distinguen están asociadas con el hongo que las coloniza (Otero *et al.*, 2002, 2004). Según Bayman y Otero (2006) y Otero *et al.* (2005, 2007) las relaciones micorrizicas pueden ser formadas por selección natural, afectar la distribución de las orquídeas e inclusive determinar la diversificación de las orquídeas.

En un comienzo, se consideró que las orquídeas obtenían hidratos de carbono sólo a partir de hongos (Hadley, 1982), pero se ha comprobado que también reciben aminoácidos y nutrientes minerales (Hyner y Arditti, 1973). Knudson (1922) demostró que en ausencia de hongos era posible la germinación de semillas de orquídeas en un medio simple, rico en minerales y azúcares. Este investigador además encontró que las semillas de algunos géneros, entre las que se encuentran *Cattleya* y *Epidendrum*, germinaban en forma asimbiótica en condiciones *in vitro*; no obstante se estimó que no siempre es posible desarrollar un medio de cultivo en el cual una determinada orquídea pueda germinar y desarrollarse (Arditti, 1982). La

gran diversidad de orquídeas probablemente significa una fuerte diversidad de requerimientos para la germinación de cada especie; de hecho, se han desarrollado varios medios nutritivos para diferentes géneros y especies de orquídeas (Arditti 1967, 1982; Arditti y Ernest, 1993).

La interacción micorrizica-orquídeas es un tema de estudio en el ámbito mundial (Clements, 1987). Algunos autores afirman que en este sentido existen orquídeas generalistas (Curtis, 1939; Hadley, 1970; Masuhara *et al.*, 1993) y otros, argumentan que son específicas (Clements, 1988; McKendrick *et al.*, 2002). No obstante, algunos estudios como los de Taylor y Bruns (1997) demostraron que algunas orquídeas, generalmente las epifitas, son específicas en su interacción micorrizica. La especificidad del hongo micorrizico en orquídeas epifitas tropicales puede ser variable (Otero *et al.*, 2002; 2004; 2007). En el caso de *Epidendrum nocturnum* Jacq., una orquídea epifita, se encontró que puede germinar con un hongo aislado de otra orquídea (Zettler *et al.*, 2007) y que la especificidad de los hongos micorrizicos varía entre especies de orquídeas epifitas (Otero *et al.*, 2002, 2004). Otero *et al.* (2002) aislaron un único clado fúngico (clado B) de varias especies de orquídeas; pero debido al tamaño de la familia, es posible la ocurrencia de un amplio espectro de especificidad (Clements, 1988).

Hasta el presente, la sistemática de hongos micorrizicos de orquídeas es pobremente entendida (Otero *et al.*, 2002). La mayoría de estos se encuentran clasificados dentro del género-forma *Rhizoctonia*, siendo un grupo artificial muy diverso (Harley y Smith, 1983; Vilgalys y Cubeta, 1994; Cubeta y Vilgalys, 1997). La taxonomía del hongo está basada en la morfología de estructuras sexuales (teleomorfo), pero es difícil inducir a estos hongos para que produzcan tales estructuras en el laboratorio.

La germinación asimbiótica de semillas en medios artificiales es una manera simple de conservar diferentes especies de orquídeas; en este sentido existen varios métodos de conservación mediante micropropagación (Shimasaki y Uemoto, 1991; Arditti y Ernst,

1993; Latha y Seeni, 1994; Nayak *et al.*, 1998; Murthy y Pyati, 2001; Chen *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2002; Pyati *et al.*, 2002). Igualmente existen metodologías para la germinación simbiótica (Zettler y Hofer, 1998; Zettler *et al.*, 2001, 2007), no obstante aún no es claro cuándo se debe utilizar una u otra metodología (Otero y Bayman, 2009; Otero *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2005).

La determinación del nivel de especificidad micorrizica es un factor que debe ser tenido en cuenta para la conservación de orquídeas mediante la germinación simbiótica de las semillas (Otero *et al.*, 2013). Una especie de orquídea es considerada específica cuando interactúa de forma estrecha con un grupo de hongos filogenéticamente emparentados; por el contrario, se le considera generalista cuando sus hongos micorrizicos incluyen una gran variedad de orígenes filogenéticos. En orquídeas existe un gradiente de niveles de especificidad y las diferentes especies varían dentro de estos niveles (Taylor *et al.*, 2003; Otero *et al.*, 2002, 2004; Otero y Bayman, 2009). En este caso es importante diferenciar entre especificidad ecológica (in situ) y especificidad potencial (in vitro) (Masuhara y Katsuya, 1994; Rasmussen, 2002).

La especie *Comparettia falcata* Poepp. & Endl., es una orquídea epífita, caracterizada por un ciclo de vida muy corto y flores de tamaño mediano polinizadas por colibríes (Pedroza-Manrique *et al.*, 2005). La especie es cultivada por floricultores aficionados y también es un componente en algunos ecosistemas. En el presente estudio se evaluó la germinación de semillas de *C. falcata* en condiciones simbióticas con dos aislados del género-forma de *Rhizoctonia* sacados de raíces de orquídeas y un aislado patogénico de *R. solani* obtenido de arroz; igualmente se evaluó la germinación asimbiótica utilizando medios de cultivos artificiales comerciales. Como el conocimiento sobre micorrizas de *C. falcata* es escaso, con base en resultados previos obtenidos en investigaciones con orquídeas epífitas se plantea la hipótesis de que las semillas germinarían mejor al usar métodos asimbióticos que simbióticos (Otero y Bayman, 2009).

## Materiales y métodos

**Especie de orquídea.** *Comparettia falcata* es una orquídea epífita de ramita, perenne, perteneciente a la subtribu Oncidinae y polinizada por colibríes (Ackerman *et al.*, 1994; Rodríguez-Robles *et al.*, 1992). Se encuentra distribuida en las Antillas mayores, México, Centroamérica y Suramérica tropical. Frecuentemente se halla asociada con árboles de guayabo (*Psidium guajava* L.) y otros árboles frutales. Económicamente tiene mucho potencial como planta ornamental, sus flores rojizas son llamativas, aunque relativamente pequeñas (Ackerman *et al.*, 1994).

**Recolección y procesamiento de semillas.** Las semillas de *C. falcata* fueron obtenidas a partir de cápsulas maduras, recolectadas en el departamento del Cauca, corregimiento de Pescador (2° 47' 32" N, 76° 32' 51" O), con temperatura, promedio anual de 19°C, a 1900 m.s.n.m. Una vez recolectadas las cápsulas fueron tratadas con etanol a 70% y almacenadas en bolsas plásticas con sílica-gel para su traslado al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Los frutos fueron esterilizados en condiciones asépticas según la metodología propuesta por Otero (2004), en la cual, antes de la dehiscencia de la cápsula, esta se desinfecta con hipoclorito de sodio al 1% por 10 min, luego se enjuaga con agua destilada estéril y posteriormente se sumerge en alcohol a 70% durante 5 min (Arditti, 1982); finalmente es flameada superficialmente.

A continuación, la cápsula fue colocada en una caja Petri con papel filtro en la base y con un bisturí se abrió longitudinalmente. El 80% de las semillas fueron extraídas con una pinza estéril de donde se tomó una submuestra para el análisis de viabilidad utilizando la prueba de tetrazolio. Una vez confirmada la viabilidad, las semillas seleccionadas fueron sumergidas en 10 ml de agua destilada estéril agitando lentamente para lograr su dispersión.

Para la inoculación uniforme sobre los medios de cultivo evaluados, se tomaron alícuotas de 100 µl con una pipeta de precisión y se colocaron sobre las cajas Petri

correspondientes a los tratamientos. La dispersión de las semillas sobre los medios se hizo siguiendo la metodología propuesta por Arditti (1982), antes de colocarlos en sala de incubación con ciclos de 12 h y luz artificial, a  $23 \pm 2$  °C. De la misma solución que contenía semillas se tomaron 10 alícuotas de 100 µl sobre porta-objetos para determinar al estereoscopio el promedio correspondiendo a  $110 \pm 10$  semillas por alícuota.

**Viabilidad de las semillas.** Para esta prueba, en una solución de tetrazolio contenida en un tubo Eppendorf se colocó una pequeña muestra de semillas de cada cápsula. Cuando la muestra se expuso a condiciones de oscuridad y durante 12 h el tejido embrionario tomó tonalidad rojiza indicando su viabilidad (Vujanovic *et al.*, 2000). Para esta prueba, de una misma planta de orquídea se tomaron dos cápsulas maduras con semillas.

**Evaluación de hongos en la prueba de germinación simbiótica.** Los tres aislamientos de hongos evaluados en este estudio pertenecían al género-forma *Rhizoctonia* y fueron obtenidos de estudios previos (Mosquera-Espinosa, 2010) y conservados en el Cepario de Hongos Micorrízicos de Orquídeas del Grupo de Investigación en Orquídeas, Ecología y Sistemática Vegetal en la Pontificia Universidad Javeriana sede Cali, Colombia, (Mosquera *et al.*, 2010, 2013a, 2013b). Se utilizaron los aislamientos: Q1.1M16 (teleomorfo: *Ceratobasidium*) obtenido de raíces de la orquídea litofítica *Epidendrum melinanthum* Schltr. en el municipio de Palmira; Q1M19 (teleomorfo: *Ceratobasidium*) obtenido de raíces de la orquídea epífita *Maxillaria* sp. en el municipio de Felidia; y *Rhizoctonia solani* patógeno de arroz obtenido del cepario del Programa de Patología en Arroz del CIAT-Palmira, Colombia. (Foto 1).



**Foto 1.** Aislamientos del género-forma *Rhizoctonia* evaluados en germinación simbiótica de semillas de *Comparettia falcata* a 40X. Izquierda: Q1.1M16 de *Epidendrum melinanthum* Schltr.; Centro: Q1M19 de *Maxillaria* sp.; Derecha: *Rhizoctonia solani* patógeno de arroz. (Fotos: Mosquera-Espinosa, 2013).

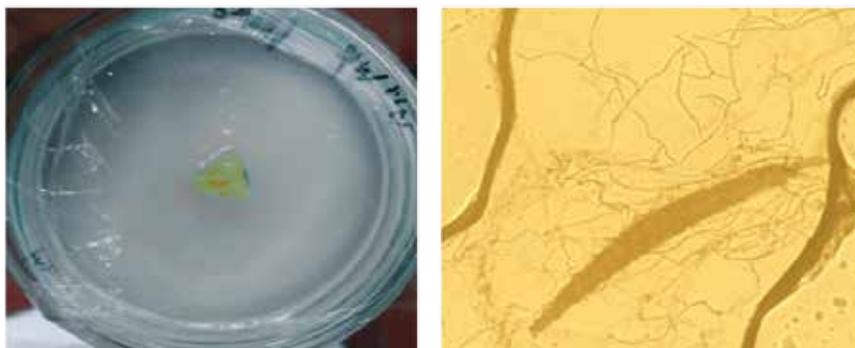
**Germinación simbiótica.** Para este ensayo se siguió la metodología propuesta por Otero *et al.* (2004). La propagación simbiótica se evaluó utilizando medio Clements modificado (Clements, 1988) denominado Medio Celulosa (MC) (bacto-agar Difco© 7 g, celulosa 10 g, 1 litro de agua destilada estéril). La celulosa es el sustrato nutritivo del hongo, sin embargo, el carbono no es directamente accesible para la semilla de la orquídea (Otero *et al.*, 2011; Valadares *et al.*, 2012). En este medio fueron inoculados

individualmente los tres aislamientos del género *Rhizoctonia* (Q1.1M16, Q1M19 y *R. solani* patogénico) en cajas Petri. (Foto 2).

En este ensayo se aplicaron dos tratamientos control sin inóculo de aislamientos de *Rhizoctonia*: (1) se utilizó el mismo medio para inocular sólo la semilla (Control 2); y (2) semillas y fungicida (Benomyl, 35 ppm) para inhibir el posible crecimiento de hongos contaminantes (Control 3). Ocho días después de la inoculación de los aislamientos de *Rhizoctonia* y cuando el micelio cubrió 2/3 de

la caja Petri, se sembraron las semillas de orquídeas suspendidas en agua destilada estéril, tomando alícuotas de 100  $\mu$ l. Los ensayos se montaron siguiendo normas de asepsia bajo cámara de flujo laminar. Se realizaron ocho repeticiones por cada tratamiento, con

un diseño experimental completamente al azar donde cada caja Petri correspondió a una unidad de muestreo independiente. Las cajas Petri se mantuvieron en sala de incubación con 12 h luz natural a  $23 \pm 2$  °C durante 60 días.



**Foto 2.** Ensayo de germinación simbiótica. Izq.: aislamiento de *Rhizoctonia* spp. inoculado en medio celulosa (MC) sin semillas de orquídeas. Der.: semillas de orquídea con embrión hinchado y colonizada por el hongo Q1M19 de *Maxillaria* sp. a 40X. (Fotos: Chávez, 2013).

**Germinación asimbiótica.** Para evaluar la germinación asimbiótica de las semillas de *C. falcata* se prepararon los medios nutritivos: (1) Knudson C. modificado (KC.m) (Arditti, 1992) y (2) Murashie & Skood (MS) (Arditti, 1992) versión comercial enriquecidos con Gelrite, sucrosa. Los reactivos y suplementos utilizados fueron definidos con base en los estudios de Arditti (1992).

Las evaluaciones de la germinación simbiótica y asimbiótica de las semillas se realizaron a los 25 días, considerando la presencia de germinación cuando se observó hinchamiento del embrión acompañado de coloración verde del tejido. Se contó el total de semillas dispuestas en cada caja Petri y se identificaron y cuantificaron aquellas que presentaban germinación. Para estos tratamientos se utilizaron 50 ppm de antibióticos (Otero *et al.*, 2002) a razón de 10 a 50 mg/l (Arditti, 1992). Los antibióticos empleados fueron paquetes de tres discos de penicilina G y tetraciclina de la empresa Oxoid Ltda, que fueron adicionados en la solución de semillas para dispensar 250 ml de medio. El control 1 consistió en medio enriquecido con Gel rite, sucrosa, BAP, ANA y antibiótico.

Las observaciones se hicieron durante diez semanas para determinar el desarrollo de los embriones de la semilla de la orquídea sembrada en los diferentes tratamientos, además de la colonización de los hongos donde fueron inoculados. Al momento de las observaciones se tomaron dos muestras aleatorias de los tratamientos simbióticos y se llevaron a microscopio con aumento 4X para observar el desarrollo embrionario, la colonización y la posible penetración del hongo en las semillas de la orquídea. En la semana diez las cajas Petri se colocaron en estereoscopio para determinar el porcentaje de germinación de las semillas y la posible presencia de microorganismos contaminantes en los diferentes tratamientos.

**Prueba de contaminación.** Para evaluar la incidencia de microorganismos contaminantes entre tratamientos simbióticos y asimbióticos, se compararon los porcentajes de placas afectadas de los tratamientos con antibiótico y sin él.

**Análisis estadístico.** Los datos fueron analizados estadísticamente con la prueba de Anova de una vía, utilizando las herramientas de análisis de datos de Excel 2007

(Microsoft). Las unidades experimentales correspondieron a las cajas Petri. Se incluyeron ocho tratamientos: dos asimbióticos (Knudson C y MS), tres simbióticos (Q1.1M16, Q1M19, y *R. solani*) y tres controles (Control 1, Control 2 y Control 3). Ya que la variable de respuesta correspondía al porcentaje de germinación de semillas y que las varianzas entre los tratamientos no eran homogéneas, se realizó la transformación de datos utilizando el arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción de semillas germinadas (Zar, 1999). La proporción de unidades experimentales contaminadas se evaluó usando la prueba de Chi-cuadrado (Zar, 1999).

## Resultados

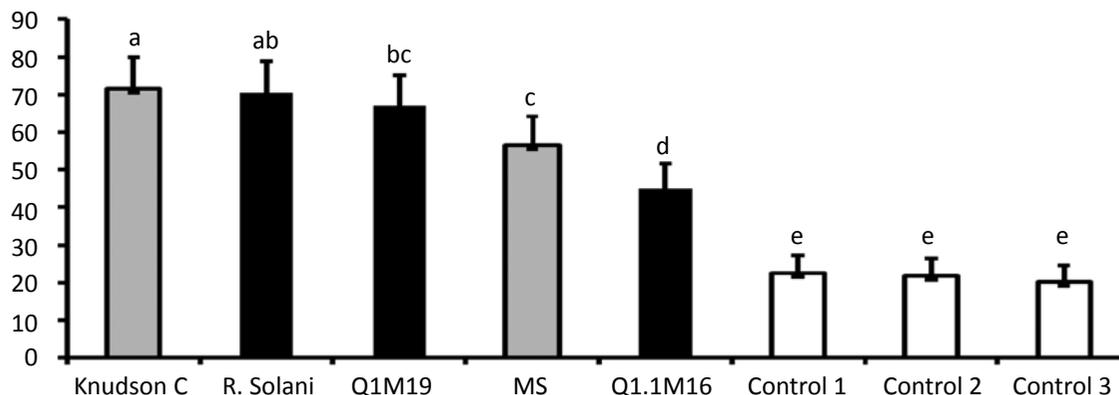
En la prueba con tetrazolio se encontró que la viabilidad de las semillas varió entre 72.8% y 75.7%, lo cual garantizaba su uso para los ensayos de germinación. La germinación de semillas en medio Muraashie & Skoog (MS) fue de 56.6%, en medio Knudson C de 71.5% y en el medio control de 20.25% (Figura 1).

Veinticinco días después de la siembra, la penetración del micelio del hongo en el tejido de la semilla se observó en los tratamientos de germinación simbiótica con los tres aislamientos de *Rhizoctonia* (Foto1). En el tratamiento con *R. solani* se presentó un

mayor tamaño de los embriones que en los tratamientos Q1.1M16 y Q1M19.

Se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de germinación entre los tratamientos evaluados ( $F_{8, 63} = 102.03$ ,  $P = 4.38E-33$ ). En el tratamiento con *R. solani* se presentó el mayor porcentaje de germinación de las semillas (70.5%) seguido del tratamiento Q1M19 (*Ceratobasidium* de la epífita *Maxillaria* sp.) con 67.1% de germinación (Figura 1). Los tratamientos control presentaron valores similares de los porcentajes de germinación, 22.6% para el control 1 (medio enriquecido con Gel-rite, sucrosa, BAP, ANA y antibiótico) y 21.8% en Control 3 (Benomyl). (Figura 1).

Los niveles de contaminación se observaron a partir del cuarto día después de la siembra, siendo estos de 50% en los ensayos de germinación asimbiótica, en el tratamiento con medio Murashie & Skoog (MS) y de 25% en el medio Knudson C modificado (KC); mientras que en el control 1 se observó 25% de contaminación. Ni en el ensayo de germinación simbiótica ni en el control 3 (Benomyl) se observaron indicadores de microorganismos fungosos contaminantes; no así en el tratamiento control con medio de celulosa sin aislamientos de *Rhizoctonia* (control 2) que presentó una contaminación de 50% ( $\chi^2 = 6.40$ ,  $P = 0.01$ ).



**Figura 1.** Porcentaje de germinación de semillas de *Comporeteria falcata*, sin excluir semillas no viables. En gris tratamientos asimbióticos, en negro tratamientos simbióticos y en blanco los controles. El control 1 corresponde al medio enriquecido con Gel rite, sucrosa, BAP, ANA y antibiótico. El control 2 corresponde a medio con celulosa sin aislamientos de *Rhizoctonia*. El control 3 es medio con celulosa, semillas y fungicidas (Benomyl, 35 ppm) para evitar crecimiento de hongos contaminantes de la semillas.

## Discusión

En el presente estudio se observó que uno de los mejores métodos para la germinación de semillas de *C. falcata* fue la metodología asimbiótica con el medio Knudson C. Sin embargo, este método presentó una mayor incidencia de microorganismos contaminantes que los demás tratamientos del método simbiótico. Además, el tratamiento con el aislamiento patogénico de *R. solani* proveniente de arroz indujo porcentajes de germinación en semillas de *C. falcata* comparables con el método asimbiótico Knudson C. Este resultado no era esperado, ya que la condición de patogenicidad del aislamiento de *R. solani* conlleva esperar baja germinación o deterioro del tejido de la semilla de la orquídea en estudio. No obstante, existen estudios donde se demuestra que aislamientos de *Rhizoctonia* patogénica han inducido germinación de las semillas de *Dactylorhiza purpur* (Stephenson y Stephenson) Verm., una orquídea terrestre de zonas templadas (Smith, 1966). Igualmente de especies de *Vanilla* y de *Epidendrum melinanthum* se ha aislado *Thanatephorus*, que es el género del teleomorfo de *R. solani* (Mosquera-Espinosa et al., 2013a; Porras y Bayman, 2007). Lo anterior puede ocurrir, aunque es poco frecuente, indicando la actividad de *Rhizoctonia* en cualquier expresión como micosimbionte. (Carling et al., 1999).

En relación con la presencia de microorganismos fungosos contaminantes, se observó que los tratamientos que incluyeron hongos simbióticos presentaron una menor proporción de dichos contaminantes, que aquellos tratamientos donde no se aplicaron. Por esta razón, se apoya la hipótesis de que la utilización de técnicas simbióticas disminuye significativamente la contaminación en los procedimientos de germinación de semillas de orquídeas, como ha sido propuesto en otros estudios sobre este tema (Otero y Bayman, 2009; Porras-Alfaro y Bayman, 2007). En experimentos de germinación simbiótica con *Ionopsis utricularioides* (Sw.) Lindl. (Otero et al. 2004, 2007) y *Tolumnia variegata* (Sw.) Braem (Otero et al., 2005) en Puerto Rico, los controles sin hongos simbióticos,

mostraron mayor contaminación que los tratamientos con hongos simbióticos.

Este estudio sustenta la idea de que en caso de no conocer los hongos micorrízicos que inducen germinación de semilla sexual de especies de orquídeas, la germinación asimbiótica es una opción viable (Otero y Bayman, 2009). No obstante, dada la presencia de hongos que inducen dicha germinación, es preferible utilizar la metodología simbiótica ya que estos no solo contribuyen al proceso de germinación sino también a evitar la contaminación por microorganismos contaminantes.

## Conclusión

La germinación asimbiótica con medios Knudson C induce altos niveles de germinación de semillas de *Comporetia falcata*. En el método simbiótico, las semillas también germinaron adecuadamente con *Rhizoctonia solani*, patógeno de arroz, y con una micorriza de la orquídea epífita *Maxillaria* sp., por tanto, algunos hongos reportados como patógenos de cultivos podrían ser evaluados y utilizados para la conservación de orquídeas.

## Referencias

- Ackerman, J. D.; Rodríguez-Robles, J. A.; y Meléndez, E. J. 1994. A meager nectar offering by an epiphytic orchid is better than nothing. *Biotropica* 26(1):44 - 49.
- Arditti, J. 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds. *Bot. Rev.* 33(1):1 - 97.
- Arditti, J. 1982. Introduction, North-American terrestrial orchids. *Orchid Biology II. Reviews and Perspectives. Orchid Seed Germination and Seedling Culture –a Manual.* p. 245 - 273.
- Arditti, J. 1992. *Fundamentals of orchid biology.* Nueva York, John Wiley & Sons. Arditti and Ernest.
- Arditti, J. y Ernst, R. 1993. *Phalaenopsis.* Micropropagation of orchids. p. 467 - 520. New York Chichester Brisbane Toronto Singapore.
- Arditti, J. y Ghani A. K. 2000. Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytol.* 145(3):367 - 421.
- Bayman, P. y Otero J. T. 2006. Microbial endophytes of orchid roots: diversity and effects on plants. En: Schulz B., Boyle C, y Sieber T. (eds.). Mi-

- crobial root endophytes. *Soil Biology* 9, Berlín, Springer-Verlag, Berlín Heidelberg. p. 153 – 178.
- Calderón-Sáenz, E. 2007. Libro rojo de plantas de Colombia. Volumen 6: Orquídeas, primera parte. Instituto Humboldt, Colombia.
- Carling, D.; Pope, E.; Brainard, K.; y Cater, D. 1999. Characterization of mycorrhizal isolates of *R. solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. *Phytopath.* 64:492 - 496.
- Chen, F.; Lin, S.; y Wang, J. 2002. Advances in the micropropagation and breeding of orchid. Fujian Nonglin Daxue Xuebao. p. 31.
- Clements, M. A. 1987. The symbiotic method of orchid seed germination progress on Australasian epiphytes. En: Proceedings of the World Orchid Hiroshima Symposium, Nishiki Print Company. p. 65 - 68.
- Clements, M. A. 1988. Orchid mycorrhizal associations. *Lindleyana* 3:73 - 86.
- Cubeta, M. A. y Vilgalys, R. 1997. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. *Phytopath.* 87(4):480 - 484.
- Curtis, J. T. 1939. The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. *Am. J. Bot.* 26:390-399.
- Hadley, G. 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. *New Phytol.* 69(4):1015 - 1023.
- Hadley, G. 1982. European terrestrial orchids. Seed germination and culture, methods. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. Vol. 2.
- Harley, J. L.; Smith, S. E. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, Inc.
- Hyner, J. A. y Arditti, J. 1973. Orchid mycorrhiza. Vitamin production and requirements by the symbionts. *Am. J. Bot.* 60:829 - 835.
- Knudson, L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette* 73:1 - 25.
- Latha, P. G. y Seeni, S. 1994. Multiplication of the endangered Indian pitcher plant (*Nepenthes khasiana*) through enhanced axillary branching *in vitro*. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 38(1):69 - 71.
- Masuhara, G. y Katsuya, K. 1994. *In situ* and *in vitro* specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames, var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytol.* 127(4):711 - 718.
- Masuhara, G.; Katsuya, K.; y Yamaguchi, K. 1993. Potential for symbiosis of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* with seeds of *Spiranthes sinensis* var. *amoena* *in vitro*. *Mycol. Res.* 97(6):746 - 752.
- McKendrick, S. L.; Leake, J. R.; Taylor, D. L.; y Read, D. J. 2002. Symbiotic germination and development of the myco-heterotrophic orchid *Neottia nidus-avis* in nature and its requirement for locally distributed *Sebacina* spp. *New Phytol.* 154(1):233 - 247.
- Murthy, H. N. y Pyati, A. N. 2001. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37(2):223 - 226.
- Mosquera-Espinosa, A. T. 2010. Evaluación del efecto biocontrolador de *Rhizoctonia* de orquídeas sobre *Rhizoctonia solani* Kühn patógeno del suelo en arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 140 p.
- Mosquera-Espinosa, A. T.; Bayman, P.; y Otero, J. T. 2010. *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronómica* 59(3):316 - 326.
- Mosquera-Espinosa, A. T.; Bayman, P.; y Otero, J. T. 2013a. Hongos micorrízicos de orquídeas en poblaciones naturales en los departamentos del Valle del Cauca y Antioquia, Colombia. *Lanketiana* 13(1-2):144.
- Mosquera-Espinosa, A. T.; Bayman, P.; Prado, G.; Gómez-Carabalí, A.; y Otero, J. T. 2013b. The double life of *Ceratobasidium*: orchid mycorrhizal fungi and their potential for biocontrol of *Rhizoctonia solani* sheath blight of rice. *Mycologia* 105:141 - 150.
- Murthy, H. N. y Pyati, A. N. 2001. Micropropagation of *Aerides maculosum* Lindl. (Orchidaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 37(2):223 - 226.
- Nayak, N. R.; Chand, P. K.; Rath, S. P.; y Patnaik, S. N. 1998. Influence of some plant growth regulators on the growth and organogenesis of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. seed-derived rhizomes *in vitro*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 34(3):185 - 188.
- Otero, J. T.; Ackerman, J. D.; y Bayman, P. 2002. Diversity and host specificity of mycorrhizal fungi from tropical orchids. *Am. J. Bot.* 89:1852-1858.
- Otero, J. T.; Ackerman, J. D.; y Bayman, P. 2004. Differences in mycorrhizal specificity between two tropical orchids. *Mol. Ecol.* 13:2393-2404.
- Otero, J. T.; Bayman, P.; y Ackerman, J. D. 2005. Individual variation in plant and fungus for mycorrhizal seed germination in an epiphytic orchid. *Evol. Ecol.* 19:29-43.
- Otero, J. T. y Bayman, P. 2009. Symbiotic vs. asymptotic seed germination in epiphytic orchids. *Acta Agronómica* 58(4):270 - 276.
- Otero, J. T.; Flanagan, N.; Herre, E. A.; Ackerman, J.; y Bayman, P. 2007. Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in

- the neotropical, epiphytic orchid, *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 94:1944-1950.
- Otero, J. T.; Mosquera-Espinosa, A. T.; y Flanagan, N. S. 2013. Tropical orchid mycorrhizae: potential applications in orchid conservation, commercialization, and beyond. En: Fourth Scientific Conference on Andean Orchids. *Lankesteriana* 13(1-2):57 - 63.
- Otero, J. T.; Thrall, P. H.; Clements, M. A.; Miller, J. T.; y Burdon, J. J. 2011. Co-diversification of orchids (Pterostylidinae) and their associated mycorrhizal fungi. *Aust. J. Bot.* 59:480-497.
- Park, S.; Yeung, E.; Chakrabarty, D.; y Paek, K. 2002. An efficient direct induction of protocorm-like bodies from leaf subepidermal cells of *Doritaenopsis* hybrid using thin-section culture. *Plant Cell Rep.* 21(1):46-51.
- Pedroza-Manrique, J.; Fernandez-Lizarazo, C.; y Suarez-Silva, A. 2005. Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Comporettia falcata* seeds under in vitro conditions. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41(6):838 - 843.
- Pereira, O. L.; Kasuya, M. C.; Rollemberg, C. L.; y Borges, A. C. 2005. Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Coppensia doniana* flexuosum por fungos micorrízicos rizoctonióides. *Rev. Brasil. Cien. Solo* 29:199 - 206.
- Porras-Alfaro, A. y Bayman, P. 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia* 99(4):510 - 525.
- Pyati, A. N.; Murthy, H. N.; Hahn, E. J.; y Paek, K. Y. 2002. *In vitro* propagation of *Dendrobium macrostachyum* Lindl.-a threatened orchid. *Notes*, 62:1.
- Rasmussen, H. N. 1995. *Terrestrial orchids: From seed to mycotrophic plant*, Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido. 433 p.
- Rasmussen, H. N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil* 244:149 - 163.
- Rodríguez-Robles, J. A.; Meléndez, E. J.; y Ackerman, J. D. 1992. Effects of display size, flowering phenology, and nectar availability on effective visitation frequency in *Comporettia falcata* (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 79(9):1009-1017.
- Shimasaki, K y Uemoto, S. 1991. Rhizome induction and plantlet regeneration of *Cymbidium goeringii* from flower bud cultures in vitro. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 25(1):49 - 52.
- Smith, S. E. 1966. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. *New Phytol.* 65(4):488 - 499.
- Taylor, D. L. y Bruns, T. D. 1997. Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two non-photosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, EE.UU.* 94:4510 - 4515.
- Taylor, D. L.; Bruns, T. D.; Szaro, T. M.; y Hodges, S. A. 2003. Divergence in mycorrhizal specialization within *Hexalectris spicata* (Orchidaceae), a nonphotosynthetic desert orchid. *Am. J. Bot.* 90(8):1168 - 1179.
- Valadares, R. B.; Pereira, M. C.; Otero, J. T.; y Cardoso, E. J. 2012. Narrow fungal Mycorrhizal Diversity in *Coppensia doniana*. *Biotropica* 44:114 - 122.
- Vilgalys, R. y Cubeta, M. A. 1994. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Ann. Rev. Phytopath.* 32(1):135 - 155.
- Vujanovic, V.; St-Arnaud, M.; Barabé, D.; y Thi-beault, G. 2000. Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Ann. Bot.* 86(1):79-86.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*, 4/e. Pearson Education India.
- Zettler, L. W. y Hofer, C. J. 1998. Propagation of the little club-spur orchid (*Platanthera clavellata*) by symbiotic seed germination and its ecological implications. *Environ. Exp. Bot.* 39(3):189-195.
- Zettler, L. W.; Poulter, S. B.; McDonald, K. I.; y Stewart, S. L. 2007. Conservation-driven propagation of an epiphytic orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a mycorrhizal fungus. *HortScience* 42(1):135-139.
- Zettler, L. W.; Stewart, S. L.; Bowles, M. L.; y Jacobs, K. A. 2001. Mycorrhizal fungi and cold-assisted symbiotic germination of the federally threatened eastern prairie fringed orchid, *Platanthera leucophaea* (Nuttall) Lindley. *Am. Midland Nat* 145(1):168-175.
- Zotz, G. 2013. The systematic distribution of vascular epiphytes—a critical update. *Bot. J. Linnean Soc.* 171(3):453-481.