

UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO



Efecto de las interacciones entre hongos micorrícicos sobre la germinación simbiótica de *Bipinnula fimbriata*.

Seminario de título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Bióloga con mención en Medio Ambiente.

FRANCISCA CONSTANZA BRIONES ALBURQUENQUE

Directora: María Isabel Mujica P.

Patrocinador: Luis Felipe Hinojosa O.

2023

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la candidata:

FRANCISCA BRIONES ALBURQUENQUE

“Efecto de las interacciones entre hongos micorrícicos sobre la germinación simbiótica de *Bipinnula fimbriata*”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Bióloga con mención Medio Ambiente

Directora Seminario de Título: _____

Dra. María Isabel Mujica P.

Patrocinador del Seminario: _____

Dr. Luis Felipe Hinojosa O.

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: _____

Evaluador:

Santiago de Chile, Septiembre de 2023.

Biografía



Nací el 26 de Septiembre de 1991 en Santiago, mi madre Rossana me dio a luz en el hospital clínico de la Católica y mi padre Rolando grabó el parto. Mi familia siempre me hizo sentir que mi llegada era muy esperada y viví mis primeros años de vida muy cercanamente con mi familia materna; tías y tíos, primas y primos, abuela y abuelo, quienes también me hacían sentir muy querida, cuidada y especial. En los veranos, con mis primos nos quedábamos en casa de la abuela Rosa, compartíamos, pintábamos yeso, jugábamos en los patios que estaban llenos de plantas. Habían limoneros, calas, helechos, tréboles, hiedras y cardenales. Para que no nos aburriéramos, nuestra abuela nos daba tareas en el jardín: podábamos las plantas, sacábamos limones del limonero y recolectábamos las semillas de los cardenales para guardarlas en frasquitos. Creo que ese fue mi primer trabajo de Bióloga.

Agradecimientos

A mi familia, a mi Mamá, Papá y Hermana, que me han apoyado en cada una de mis decisiones

A mi tutor, L. Felipe, por la paciencia, confianza y apoyo. A mi tutora, Isa, por todo lo enseñado, por el cariño, por darme la oportunidad de trabajar, aprender de ella y por creer en mí. A Fefa, por facilitarme las dependencias de su laboratorio en la PUC y permitirme realizar los experimentos.

A mis amigas. Paola por darme la oportunidad de conocer el norte de Chile en toda su extensión, aprendiendo de su gran conocimiento sobre plantas y la vida. A Bárbara, por acompañarme en todo mi crecimiento desde que entramos a la universidad, por su amor y amistad que me ha entregado desde el primer día que nos conocimos.

A Joaquin, por el amor, cariño, compañía y confianza, por incentivarme a seguir y recordarme todos los días que soy capaz.

A mis compañeras del paleolab, Naty, Cote, Lili, Jeanette, Estefi, Kevin; y mis compañeras y compañeros del laboratorio de diversidad de plantas de la PUC, por los consejos, ayuda, conversaciones y risas. A la gente del Jardín botánico de Viña del Mar, en especial a Mauricio Cisternas y Bryan, por la buena onda y ayuda cada vez que iba a visitarlos.

A mis amigas y amigos de la universidad de los primeros años de U, por las risas, paseos, horas de estudio, conversaciones y cariño. A mis compañeras de la SESEGEN por incentivar mi interés por los derechos de las mujeres.

A mis amigas del patín, por mostrarme que la entretención puede ser tan sencilla como juntarse con amigas a patinar

Finalmente, a profesoras, científicas, ecólogas y al Amor que siento hacia la Naturaleza por la inspiración de esta tesis.

Índice de Contenidos

Biografía.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice de Contenidos.....	v
Índice de Tablas.....	vi
Índice de Figuras.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	xi
Introducción.....	1
Hipótesis.....	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
Metodología.....	7
Resultados.....	17
Discusión.....	27
Conclusiones.....	33
Referencias.....	34
Anexo.....	42

Índice de Tablas

Tabla 1. Hongos escogidos para realizar los experimentos con el código respectivo, lugar donde fueron colectados y la orquídea de donde fueron aislados.

Tabla 2. Prueba de Kruskal-Wallis con los valores de las diferencias entre los hongos explicados por la capacidad germinadora, tasa de crecimiento y capacidad competitiva.

Tabla A1. Datos obtenidos del test de tetrazolium para probar la viabilidad del lote semillas de *Bipinnula fimbriata* utilizadas en los experimentos de germinación simbiótica.

Tabla A2. Mediciones del área de crecimiento que se utilizaron para estimar las tasas de crecimiento de los hongos.

Tabla A3. Promedio, desviación estándar, varianza, error estándar de la tasa de crecimiento de los hongos.

Tabla A4. Promedio, desviación estándar, varianza, error estándar de la germinación individual de los hongos.

Índice de Figuras

Figura 1. Fotografías de *Bipinnula fimbriata*. A) y B) Individuos en floración, C) Fruto y semillas, D) Semillas vista en microscopio.

Figura 2. Test de Tetrazolium para el lote de semillas utilizadas en los experimentos. Las flechas rojas indican una semilla viable cuyo embrión fue teñido por el tetrazolium y la flecha negra muestra una semilla no viable sin coloración. El porcentaje de semillas viables fue de 81.1%

Figura 3. Placas cultivadas con hongos seleccionados para realizar los experimentos A) *Ceratobasidium sp1*. B) *Ceratobasidium sp2*. C) *Ceratobasidium sp3*, D) *Ceratobasidium sp4*, E) *Ceratobasidium sp5*, F) *Ceratobasidium sp6*.

Figura 4. Fotografías de las placas co-cultivadas con medio OMA para la realización de experimentos con la marca del área de crecimiento al tercer día después del cultivo.

Figura 5. Semillas en diferentes etapas de germinación según Mitchel, 1988 (Etapa 0 = semilla intacta, etapa 1 = ruptura de testa, etapa 2 = formación de rizoides). Las flechas indican diferentes estadios, negra = 0; roja = 1; azul = 2.

Figura 6. Caracterización de los hongos micorrícicos a partir de los rasgos a evaluar. Los boxplots representan el resultado de la prueba de Kruskal-Wallis donde se muestran las diferencias entre las medias de cada hongo para: A) Porcentaje de formación de rizoides B) Tasa de crecimiento y C) Capacidad competitiva. Las letras indican el resultado del Test de Duun con un nivel de significancia de 0.05.

Figura 7. Relación entre los rasgos evaluados A) Relación negativa entre la capacidad germinadora (porcentaje de formación de rizoides) vs la tasa de crecimiento ($R^2=0.411$; $p=9.993e^{-8}$). B) Relación positiva entre la tasa de crecimiento y la capacidad competitiva

de los hongos ($R^2 = 0.934$; $p < 2.2e^{-16}$); al ser valores promedios se graficaron junto con las barras de error para ambas variables. C) Relación entre capacidad germinadora y capacidad competitiva ajustado a un modelo cuadrático ($R^2 = 0.6874105$; AIC = 466.2857; p -valor = $4.14e^{-14}$).

Resumen

La formación de micorrizas está influenciada por factores abióticos, así como también por factores bióticos como la competencia entre hongos micorrícicos. El resultado de estas interacciones podría estar relacionado con las diferencias en los patrones de asignación de recursos por parte de los hongos a actividades como la competencia, crecimiento o colonización de la planta. Un buen modelo de estudio son las micorrizas de orquídeas, ya que su formación depende de la asociación simbiótica obligada entre un hongo micorrícico compatible y la semilla, fenómeno conocido como germinación simbiótica. Los hongos micorrícicos de orquídeas del género *Ceratobasidium* tienen preferencias nutricionales por lo que la capacidad para competir por los recursos podría implicar un compromiso con la capacidad para germinar semillas. En este estudio se evaluó la existencia de una relación entre la capacidad germinadora y la capacidad competitiva de seis hongos del género *Ceratobasidium* aislados de poblaciones de *Bipinnula fimbriata* y *Bipinnula plumosa*, así como también el efecto de la competencia sobre la germinación simbiótica de *B. fimbriata*. Los resultados revelaron que aquellos hongos con capacidad competitiva media se asociaron a mayores porcentajes de germinación y aquellos hongos con valores altos en la capacidad competitiva se asociaron a bajos porcentajes de germinación. Por otra parte, el efecto de la competencia sobre la germinación se asoció a la identidad del hongo germinador, competidor y al avance de la competencia. Esto indica que los hongos pueden ser a la vez buenos germinadores y malos competidores, sin embargo, la presencia de otro hongo puede modular el resultado de esta interacción. Lo cual podría estar relacionado con la existencia de nichos duales y una diversidad funcional de hongos micorrícicos de orquídeas que ha sido poco explorada. Este estudio aporta por primera vez, desde un

enfoque experimental, información sobre los factores bióticos que afectan la formación de micorrizas de orquídeas, siendo útil para la incorporación a los programas de conservación de orquídeas.

Abstract

Mycorrhizal associations are influenced by abiotic factors, as well as biotic factors such as competition among mycorrhizal fungi. The outcome of these interactions could be related to differences among fungi in resource allocation patterns to activities such as competition, growth or plant colonization. An appropriate model of study are orchid mycorrhiza, since their formation depends on an obligate symbiotic interaction between a compatible mycorrhizal fungi with the seed, a phenomenon known as symbiotic germination. Orchid mycorrhizal fungi of the genus *Ceratobasidium* have different nutritional preferences, hence the ability to compete for resources could imply a trade-off with the ability to germinate seeds. This study examined the existence of a relationship between the germinating ability and the competitive ability of six fungi of the genus *Ceratobasidium* isolated from populations of *Bipinnula fimbriata* and *Bipinnula plumosa*, as well as the effect of competition on the symbiotic germination of *B. fimbriata*. Results show that those fungi with medium values of competitive ability were associated with higher germination percentages and those fungi with high values of competitive ability were associated with low germination percentages. On the other hand, the effect of competition on germination was associated with the identity of the germinating and competitor fungi and the advance of competition. This indicates that fungi can be both good germinators and poor competitors; however, the presence of another fungi can modulate the outcome of this interaction. This could be related to the existence of dual niches and a functional diversity of orchid mycorrhizal fungi that has been little explored. This study provides for the first time, from an experimental approach, information on the biotic factors that influence the formation of orchid mycorrhiza, being useful for the incorporation into orchid conservation programs.

Introducción

El conocimiento sobre la Ecología de micorrizas ha permitido dilucidar la importancia de las interacciones entre hongos y plantas, ayudando a entender procesos ecológicos y evolutivos (van Der Heijden *et al.*, 2015), como la influencia que tienen en la productividad y diversidad de comunidades (Tedersoo *et al.*, 2020), así como también en el ciclado de nutrientes (Wurzburger & Clemmensen, 2018). En este sentido, diversos estudios se han dedicado a analizar las interacciones entre hongos micorrícicos y plantas con el fin de obtener una mirada más global en los patrones de estructuración de comunidades y mejorar las predicciones sobre los impactos del cambio global (van Der Heijden *et al.*, 2015; McCormick *et al.*, 2018; Tedersoo *et al.*, 2020). Estos estudios han contribuido con información útil que ha permitido mejorar la toma de decisiones en torno a la conservación biológica y restauración de ecosistemas degradados (Li *et al.*, 2015; Silva-Flores *et al.*, 2022) para así atender muchos de los principales desafíos que enfrenta la sociedad humana hoy en día, como el manejo de recursos naturales y la mitigación del cambio climático (Prosser *et al.*, 2007; Heilmann-Clausen *et al.*, 2014).

Las micorrizas son interacciones simbióticas entre hongos del suelo y raíces de plantas (Brundrett, 2002; Smith & Read, 2008), donde al ser ésta exitosa, se forma un órgano compuesto de dos individuos en el que ocurre un intercambio de carbono y nutrientes, estableciéndose la simbiosis (Frank & Trappe, 2005; Brundrett, 2002). Los hongos micorrícicos pueden colonizar el cortex, la superficie o alrededor de las células epidérmicas de la raíz, y extienden el micelio hacia el suelo permitiendo la absorción de nutrientes que limitan el crecimiento de las plantas, especialmente nitratos y fosfatos. Estos nutrientes, así como otros beneficios, se entregan a su hospedero a

cambio de carbohidratos, teniendo como consecuencia una fuerte influencia en el crecimiento y fitness de las plantas (Smith & Read 2008; van Der Heijden *et al.*, 2015). Alrededor del 92% de especies de plantas forman estas interacciones y es posible encontrarlas en casi todos los ecosistemas (Read, 1991; Brundrett, 2009; van Der Heijden *et al.*, 2015). Gracias al avance de la tecnología y al uso de herramientas de secuenciación masiva en la actualidad se estima que la riqueza de hongos micorrícicos es entre 40.000-50.000 de los 5-10 millones de especies de hongos descritos (Blackwell 2011; Taylor *et al.*, 2014). Varios estudios han logrado determinar la diversidad de hongos involucrados en la simbiosis lo que ha permitido clasificar a las micorrizas en cuatro tipos: Micorrizas Arbusculares (AM), Ectomicorrizas (EM), Micorrizas de Orquídeas (OM) y Micorrizas Ericoidales (ER), donde las principales diferencias entre ellas son la estructura, función y especificidad por la planta hospedera (Smith & Read, 2008; van Der Heijden *et al.*, 2015).

Se ha documentado que la formación de micorrizas está fuertemente influenciada por la variación de los factores abióticos, como las condiciones climáticas, edáficas y disponibilidad de nutrientes (Johnson *et al.*, 2003; Tedersoo *et al.*, 2012; Bunch *et al.*, 2013; Mujica *et al.*, 2016); así como también por factores bióticos como la identidad del hongo (Mujica *et al.*, 2020), estadio de vida de la planta hospedera (McCormick *et al.*, 2018) y algunos autores proponen que las interacciones entre hongos micorrícicos, como la competencia, también podrían tener un efecto importante, sin embargo, esto aún ha sido relativamente poco estudiado (Hoeksema & Bruna, 2000).

En la naturaleza, las comunidades de hongos micorrícicos difieren en su composición, riqueza y abundancia (Bever *et al.*, 2001; Öpik *et al.*, 2006; Tedersoo *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2014; Mujica *et al.*, 2016; Claro *et al.*, 2020), donde algunos hongos micorrícicos

pueden tener ventajas competitivas sobre otros en términos de eficiencia de captación de carbono, absorción nutrientes, o colonización de las raíces de las plantas. Al igual que las plantas, los hongos pueden asignar sus recursos a muchas actividades diferentes, como producir esporas, competir con otros hongos por las fuentes de carbono, buscar nutrientes para el hospedero y ellos mismos, y defenderse de ataque de fungivoros (Bennet & Bever, 2009; Mehra *et al.*, 2017; Maynard *et al.*, 2019). Los patrones de asignación de recursos de los hongos influyen tanto en la habilidad competitiva como en la habilidad para colonizar a las plantas hospederas (Bennet y Bever, 2009; Hoeksama & Bruna, 2000). En este sentido, algunos hongos podrían ser colonizadores eficientes y a la vez malos competidores, al priorizar la colonización del hospedero por sobre la proliferación de hifas (Johnson *et al.*, 1997; Hart y Reader 2002, 2005; Hoeksama & Bruna, 2000). Si las estrategias de historia de vida de las especies de hongos micorrícicos son diferentes esto puede dar lugar a una asignación desigual de recursos entre los organismos presentes en la comunidad, lo que podría permitir la coexistencia de hongos micorrícicos y esto a su vez, modularía la formación la simbiosis micorrícica (Hoeksema & Bruna, 2000).

Un buen modelo de estudio son las micorrizas de orquídeas. Una de las características más peculiares de las orquídeas son sus semillas numerosas, consideradas “semillas polvo” debido a que son extremadamente pequeñas (0,05 – 6 mm), no poseen endosperma por lo que se encuentran desprovistas de reservas nutricionales (Arditti & Ganhi, 2000). Por esto, su germinación depende de la formación de la interacción entre el hongo y la semilla, donde de ser éste exitoso, se forma una estructura aclorófila llamada protocormo la cual obtiene nutrientes y carbono del hongo simbiote (Rasmussen, 1995). Este fenómeno se conoce como germinación simbiótica (Rasmussen & Whigham, 1993), y las orquídeas se convierten en plantas maduras

gracias a la micoheterotrofia (Leake 1994), donde en sus primeros estadíos de vida dependen nutricionalmente de los hongos que puedan formar la simbiosis, generándose una interacción mutualista obligada entre orquídeas y hongos simbioses compatibles (Leake, 1994).

Los hongos micorrícicos de orquídeas corresponde al grupo polifilético Rhizoctonia el cual incluye basidiomicetes en las familias Ceratobasidiaceae, Tulasnellaceae y Serendipitaceae (Dearnaley *et al.*, 2012; Selosse *et al.*, 2022). La evidencia indica que la mayoría de los hongos micorrícicos de orquídeas también pueden ser saprotróficos, es decir, adquieren carbono degradando la materia orgánica circundante en el hábitat natural de la orquídea (Curtis 1939; Bidartondo *et al.*, 2004; Rasmussen and Rasmussen 2007; Sommer *et al.*, 2012). Así como también, estudios recientes revelaron que existen diferencias intraespecíficas en la adquisición de nutrientes en el género *Ceratobasidium* lo que podría estar relacionado con la existencia de una diversidad funcional entre hongos micorrícicos de orquídeas (Mujica *et al.*, 2020; Freestone 2022). Por lo que la habilidad de estos hongos micorrícicos para competir por los recursos disponibles y la habilidad para formar la interacción micorrícica podría depender de la identidad del hongo y los patrones de asignación de recursos a estas actividades (Bennet & Bever, 2009). Esto además podría tener un efecto en el establecimiento de plantas influyendo en la distribución y abundancia de orquídeas, debido a la estrecha relación entre éstas y sus hongos micorrícicos (Mehra *et al.*, 2017).

En esta tesis se buscó evaluar si existe un compromiso entre la capacidad germinadora y capacidad competitiva de seis hongos micorrícicos del género *Ceratobasidium* encontrados en raíces de orquídeas provenientes de poblaciones de *Bipinnula plumosa*

y *Bipinnula fimbriata*; así como también el efecto de la competencia entre estos hongos micorrícicos sobre la germinación simbiótica de *Bipinnula fimbriata*.

Hipótesis

Si la asociación simbiótica entre hongos micorrícicos del género *Ceratobasidium* y orquídeas impone para el hongo un compromiso entre la obtención de recursos (expresado como capacidad competitiva) y capacidad germinadora, entonces:

1. Los hongos con mayor capacidad competitiva tendrán una menor capacidad germinadora.
2. La competencia entre diferentes especies de *Ceratobasidium* por recursos tendrá un efecto negativo en el resultado de la germinación simbiótica, especialmente en aquellas especies que privilegian la obtención de recursos por sobre la asociación.

Objetivo General

El objetivo general de este estudio fue evaluar el efecto de las interacciones bióticas de hongos micorrícicos de orquídeas sobre la germinación simbiótica de *Bipinnula fimbriata*.

Objetivos Específicos

Objetivo 1. Cuantificar y evaluar las diferencias de tasa de crecimiento, capacidad competitiva y capacidad germinadora de hongos micorrícicos de orquídeas.

Objetivo 2. Analizar si existen diferencias en la capacidad germinadora de los hongos micorrícicos en competencia y en ausencia de ésta.

Metodología

Organismos de estudio

Orquídea

Bipinnula fimbriata es una especie de orquídea terrestre endémica del centro de Chile (Fig. 1), se distribuye en zonas costera (<500 m) de 29 a 35°S, florece de Julio a Noviembre y su estado de conservación aun no ha sido evaluado (Novoa *et al.*, 2015). En la V Región, su hábitat corresponde a zonas dunarias y lomajes costeros los cuales están siendo fuertemente intervenido por proyectos inmobiliarios y viales (Novoa *et al.*, 2020). Con el objetivo de llevar a cabo los experimentos de germinación simbiótica, se probó la viabilidad de semillas de individuos muestreados en concón el año 2018 facilitadas por el jardín botánico de Viña del Mar. Para ello se realizó la prueba de Tetrazolium propuesto por Vujanovic, (2020), donde el porcentaje de semillas viables fue de 81.1% (Tabla A1; Figura 2)-

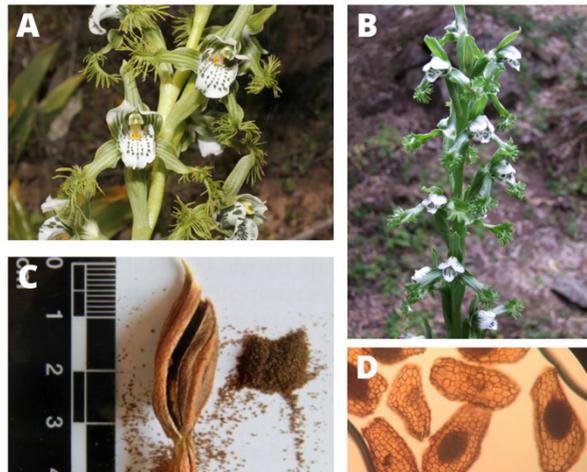


Figura 1. Fotografías de *Bipinnula fimbriata*. A) y B) Individuos en floración, C) Fruto y semillas, D) Semillas vista en microscopio.

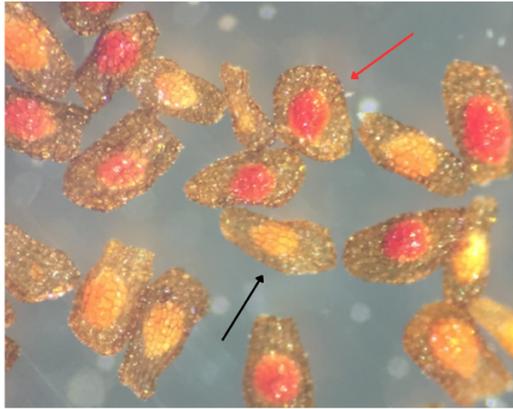


Figura 2. Test de Tetrazolium para el lote de semillas utilizadas en los experimentos. Las flechas rojas indican una semilla viable cuyo embrión fue teñido por el tetrazolium y la flecha negra muestra una semilla no viable sin coloración. El porcentaje de semillas viables fue de 81.1% (Tabla A1).

Hongos micorrícicos.

Se escogieron hongos de la familia *Ceratobasidiaceae* previamente aislados e identificados (Mujica *et al.*, 2016). Se seleccionaron tres hongos encontrados en las raíces de individuos de poblaciones de *Bipinnula plumosa* y tres hongos de poblaciones de *Bipinnula fimbriata* para ser usados en la germinación simbiótica (Tabla 1). Para mantener las condiciones estériles que requiere el cultivo de hongos, a partir de este momento todos los experimentos se realizaron bajo una cámara de flujo laminar. Los hongos fueron primero cultivados en placas Petri con medio PDA (Fig 3) con el fin de obtener suficiente micelio para la realización de los experimentos, las placas fueron guardadas a $25 \pm 2^\circ$ C en oscuridad (Steinfort *et al.*, 2010).

Tabla 1. Hongos escogidos para realizar los experimentos con el código respectivo, lugar donde fueron colectados y la orquídea de donde fueron aislados.

Población origen	Hongo	Código aislado	Lugar colección
<i>B. plumosa</i>	<i>Ceratobasidium sp1</i> (C1)	BPRC711	Río clarillo
<i>B. plumosa</i>	<i>Ceratobasidium sp2</i> (C2)	BPEM333	El manzano
<i>B. plumosa</i>	<i>Ceratobasidium sp3</i> (C3)	BPAPO321	Apoquindo
<i>B. fimbriata</i>	<i>Ceratobasidium sp4</i> (C4)	BFLV121	Los Vilos
<i>B. fimbriata</i>	<i>Ceratobasidium sp5</i> (C5)	BFLV122	Los Vilos
<i>B. fimbriata</i>	<i>Ceratobasidium sp6</i> (C6)	BFLV919	Los Vilos

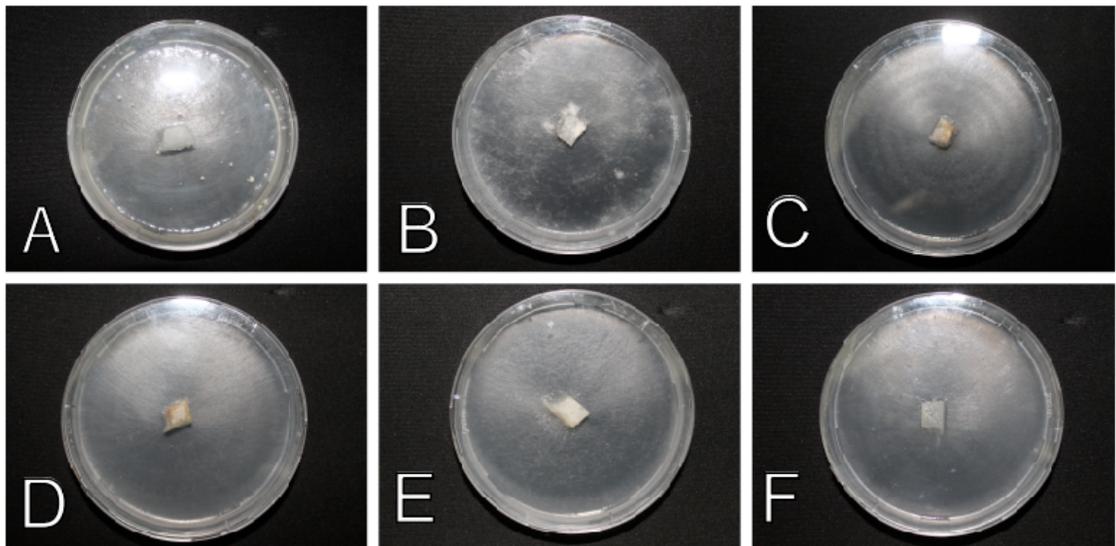


Figura 3. Hongos seleccionados para realizar los experimentos creciendo en el medio de cultivo OMA. A) *Ceratobasidium sp1*. B) *Ceratobasidium sp2*. C) *Ceratobasidium sp3*, D) *Ceratobasidium sp4*, E) *Ceratobasidium sp5*, F) *Ceratobasidium sp6*.

Diseño experimental

Una vez obtenido suficiente micelio en PDA, estos fueron co-cultivados en medio OMA (agar de avena). OMA es un medio sólido que se utiliza con frecuencia para la germinación simbiótica de orquídeas (Janes, 2009) y se ha utilizado con éxito en la germinación de *Bipinnula fimbriata* (Steinfort *et al.*, 2010; Herrera *et al.*, 2017). Para ello se inoculó 1cm² de micelio en el centro de las placas Petri y fueron guardadas a 25±2°C en oscuridad (Steinfort *et al.*, 2010), cada tratamiento se replicó diez veces y todos tenían el mismo medio de cultivo. Se realizaron mediciones del crecimiento radial todos los días hasta que los hongos ocuparan toda la placa (90 cm). Para ello se marcó por debajo de las placas petri el área que abarcaba el micelio y se tomaron fotografías (Fig. 4). Las imágenes se analizaron con el programa "Image J" donde se obtuvo el área de crecimiento radial.

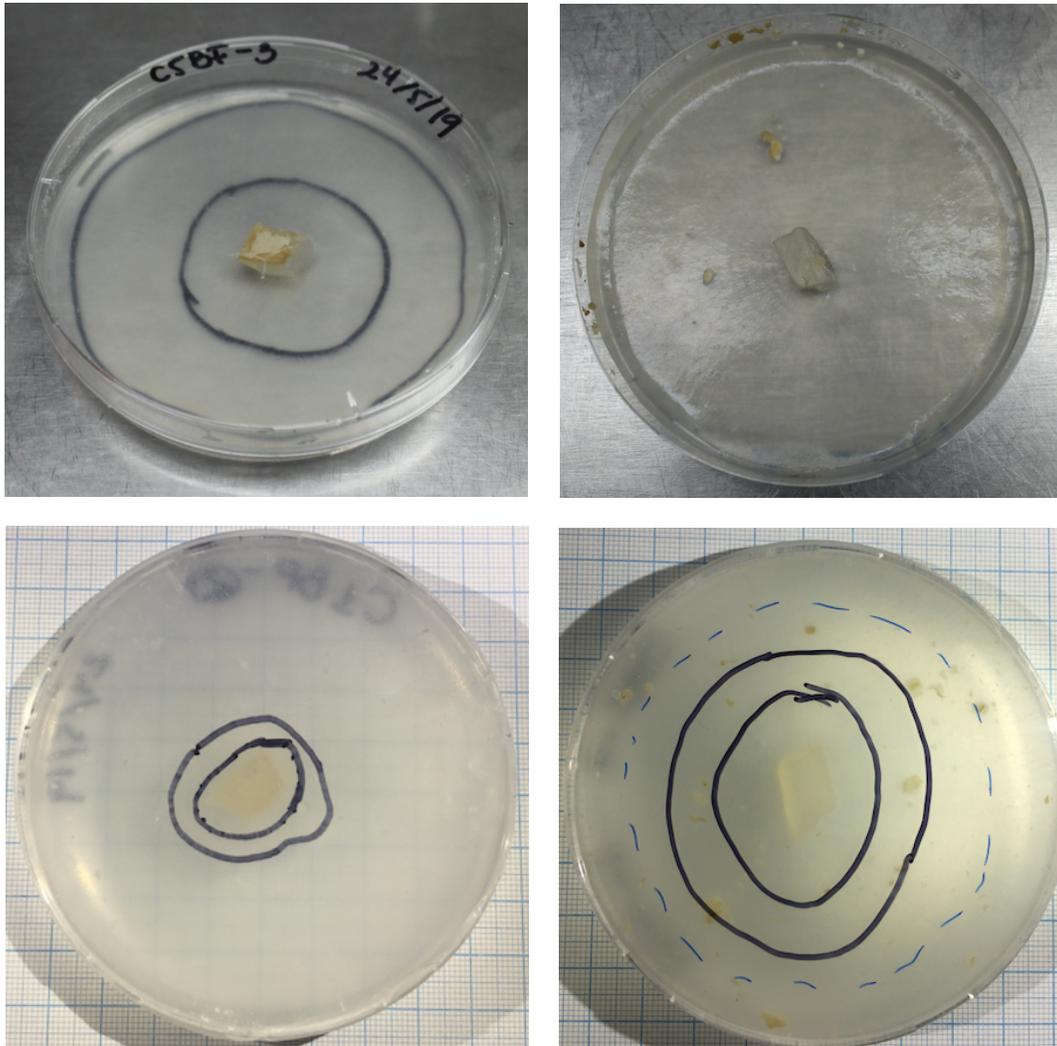


Figura 4. Fotografías de las placas co-cultivadas con medio OMA para la realización de experimentos con la marca del área de crecimiento al tercer día después del cultivo.

Posteriormente, se sembraron las semillas de *Bipinnula fimbriata* con los hongos en seis tratamientos diferentes en placas Petri con medio OMA. En cada tratamiento se agregaron 0.16 mg/L de estreptomicina y 0.16 mg/L de penicilina, y el pH se ajustó a 5.0-5.5 antes de autoclavar, para reflejar el pH del suelo de las poblaciones de orquídeas de las que se aislaron los hongos micorrícicos.

Germinación Simbiótica: Ensayo Individual

Antes de la siembra, las semillas se desinfectaron en tubos Eppendorf con 1,5 mL de solución de hipoclorito de sodio al 1% y cinco gotas de tween 20. Los tubos se agitaron durante 3 minutos, luego la solución se retiró con una jeringa estéril de 5 ml. Las semillas se lavaron 3 veces con agua destilada en autoclave, eliminando el agua con una jeringa estéril cada vez. Las semillas esterilizadas se resuspendieron en 1,5 ml de agua destilada estéril y se agitaron para obtener una suspensión homogénea. Las semillas se distribuyeron en placas petri y luego se transfirió un inóculo de micelio al centro de cada placa. Cada tratamiento incluyó el control sin hongo micorrízico se repitió diez veces (Fig 5). Las placas petri se almacenaron en una habitación oscura a 22°C. La germinación se evaluó 30 días después de la siembra, registrando el porcentaje de semillas en cada etapa de germinación como: 0, semillas intactas; 1, ruptura de testa; 2, formación de rizoides (Mitchel, 1988).

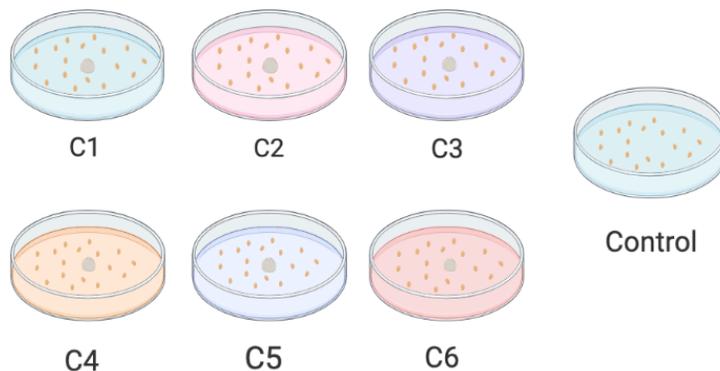


Figura 5. Representación gráfica del diseño experimental para el ensayo de germinación simbiótica individual. La figura del centro de las placas representa el inóculo del hongo y las figuras de alrededor representan las semillas de *Bipinnula fimbriata*.

Germinación simbiótica: Ensayo de Competencia

De la misma manera se procedió para evaluar la competencia entre hongos sobre la germinación, donde se establecieron 15 tratamientos con las combinaciones de a pares de los hongos incluidos los controles, las placas se dividieron por la mitad y los inóculos se transfirieron a su lado correspondiente luego del sembrado de las semillas (Fig 6). La germinación se registró para cada hongo de manera individual y se evaluó 30 días después de la siembra, registrando el porcentaje de semillas en cada etapa de germinación como: 0, semillas intactas; 1, ruptura de testa; 2, formación de rizoides (Mitchel, 1988). El área que abarcó cada hongo fue marcada por debajo de las placas y se tomaron fotografías, posteriormente las imágenes se analizaron con el programa "Image J".

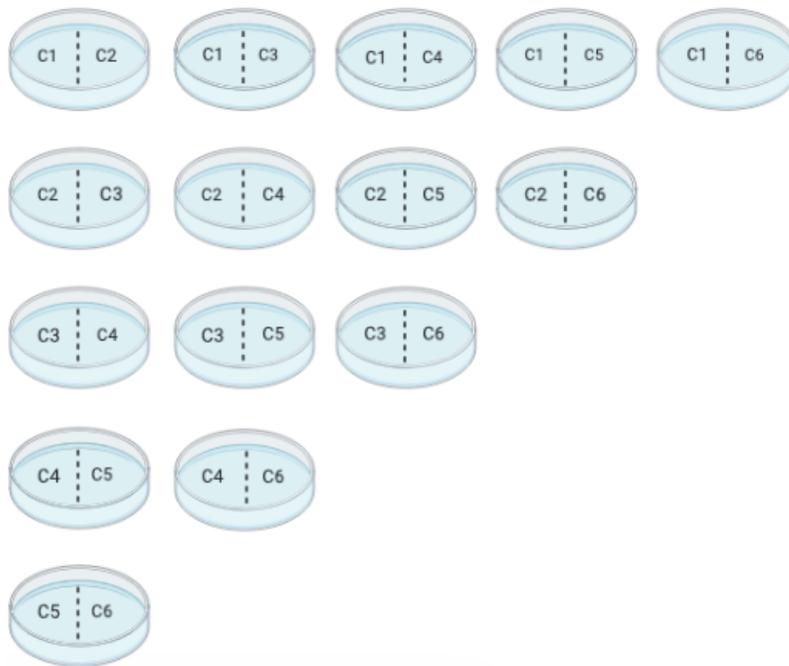


Figura 6. Representación gráfica del diseño experimental para el ensayo de germinación simbiótica de los hongos en competencia con todas las combinaciones de a pares posible. Cada combinación fue replicada 10 veces.

Obtención de variables

Con los datos obtenidos en los ensayos individuales y de competencia se realizó una caracterización de los hongos a partir de la capacidad germinadora, tasa de crecimiento y capacidad competitiva, así como también, se obtuvieron variables para la explicación del efecto de la competencia sobre la germinación donde se calculó el delta de germinación y el resultado de la competencia.

Capacidad germinadora individual

La capacidad germinadora individual de los hongos fue evaluada a partir del porcentaje de formación de rizoides (etapa 2) en los ensayos individuales de germinación simbiótica individual. Se utilizó esta etapa de la germinación ya que a partir de la formación de rizoides la semilla puede seguir su desarrollo hasta convertirse en plántula (Mitchel, 1989).

$$\text{Capacidad germinadora individual} = \frac{N^{\circ} \text{ de Semillas en Etapa 2}}{N^{\circ} \text{ de Semillas totales}} * 100$$

Tasa de crecimiento

El crecimiento de los hongos estuvo limitado al espacio disponible en la placa Petri, por ello los datos se ajustaron a modelos logísticos, donde se obtuvo el valor de la pendiente de la curva en la fase de crecimiento promediando el área en el tiempo (Tabla A2).

$$\text{Tasa crecimiento} = \frac{\text{Área}_{t_1} + \text{Área}_{t_2} + \dots + \text{Área}_{t_n}}{t_1 + t_2 + \dots + t_n}$$

Capacidad competitiva

La capacidad competitiva se obtuvo a partir de la diferencia entre el área ocupada por el hongo y el área ocupada por su competidor, de esta manera, valores negativos indican que perdió y positivos que ganó en el enfrentamiento. Luego se calculó el promedio, desviación estándar y error estándar en las diferencias incluyendo todos los enfrentamientos.

$$\text{Capacidad Competitiva Hongo A} = \text{Área hongo A} - \text{Área hongo B}$$

Delta de germinación

El delta de germinación se obtuvo a partir de la diferencia entre la germinación del hongo en competencia y el promedio de la capacidad germinadora individual del hongo. De esta manera, valores positivos indican que los hongos aumentaron la germinación en competencia y valores negativos indican que la germinación en competencia disminuyó.

$$\Delta \text{Germinación} = \% \text{Germ. en competencia} - \% \text{Germ. promedio individual}$$

Análisis estadístico

Relación entre variables

Las diferencias entre los hongos para cada variable se evaluó a partir del test de Kruskal-Wallis, ya que los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas. Luego se realizó una prueba posthoc mediante el test de Dunn para conocer las diferencias entre los grupos.

Las relaciones entre variables se evaluaron a través de regresiones lineales, donde se relacionó la capacidad germinadora y la capacidad competitiva con la tasa de crecimiento. Dado que se detectó una parábola en la visualización de los datos, la capacidad germinadora con la capacidad competitiva se ajustó a un modelo cuadrático.

Efecto competencia sobre germinación

Se probó el efecto de la identidad del hongo germinador, la presencia del hongo competidor y la capacidad competitiva sobre la capacidad germinadora individual. Los datos se ajustaron a modelos lineales donde primero se probó el efecto de cada variable por separado y luego todas juntas. El modelo se seleccionó de acuerdo con los valores más bajos de los criterios de información de Akaike (AIC).

Resultados

Al pasar los 30 días de cultivo se observaron tres estadios de desarrollo en las semillas, donde se encontraron semillas en etapa 0 (semillas intactas), etapa 1 (ruptura de testa), y etapa 2 (formación de rizoides) (Fig. 4).

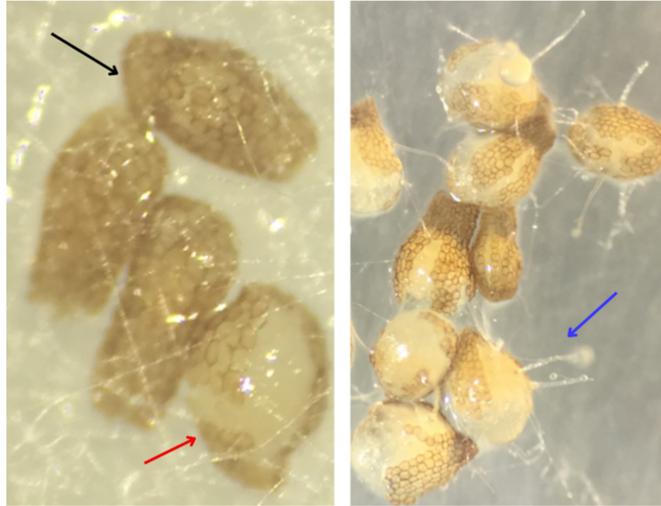


Figura 5. Semillas en diferentes etapas de germinación según Mitchel, 1988 (Etapa 0 = semilla intacta, etapa 1 = ruptura de testa, etapa 2 = formación de rizoides). Las flechas indican diferentes estadios, negra = 0; roja = 1; azul = 2.

Relación entre capacidad competitiva y capacidad germinadora.

Se observaron semillas en etapa 2 (rizoides) en todos los tratamientos, sin embargo, la capacidad germinadora individual difiere significativamente entre los seis hongos (Kruskal-Wallis: Chi-cuadrado = 42.715, gl = 5, p-valor=4.221e⁻⁸; Tabla 2); ésta fue mayor en *Ceratobasidium sp.6* (66%), seguido por *Ceratobasidium sp.3* (51%), *Ceratobasidium sp.2* (48%) y *Ceratobasidium sp.1* (41%); mientras que los menores

valores fueron con *Ceratobasidium sp.4* (12%)y *Ceratobasidium sp.5* (0.8%) (Fig 5A, Tabla A3).

La tasa de crecimiento también fue significativamente diferente entre los seis hongos (Kruskal-Wallis: Chi-cuadrado = 50.999, gl = 5, p-valor = $8.654e^{-10}$; Tabla 2); el hongo que creció más rápido fue *Ceratobasidium sp.5* (17.56 cm²/día), seguido de *Ceratobasidium sp.4* (15.66 cm²/día), *Ceratobasidium sp.3* (10.49 cm²/día), *Ceratobasidium sp.6* (9.55 cm²/día); mientras que *Ceratobasidium sp.2* (3.54 cm²/día) y *Ceratobasidium sp.1* (3.18 cm²/día) presentaron bajas tasas de crecimiento (Fig 5B; Tabla A4). Por último, la capacidad competitiva muestra un patrón similar a la tasa de crecimiento con diferencias significativas entre las medias de cada hongo (Kruskal-Wallis: Chi-cuadrado = 42.715, gl = 5, p-valor = $4.221e^{-8}$; Tabla 2), donde *Ceratobasidium sp.4* presentó una mayor capacidad competitiva seguida de *Ceratobasidium sp.5* y *Ceratobasidium sp.3*; por otra parte *Ceratobasidium sp.6* y *Ceratobasidium sp.1* no difieren significativamente en su capacidad competitiva presentado valores medios, y finalmente *Ceratobasidium sp.2* fue quien presentó el menor valor en la capacidad competitiva (Fig 5C).

Tabla 2. Prueba de Kruskal-Wallis con los valores de las diferencias entre los hongos explicados por la capacidad germinadora, tasa de crecimiento y capacidad competitiva.

Variable explicatoria	χ^2	gl	p-valor
Capacidad germinadora	42.715	5	$4.221e^{-8}$
Tasa de crecimiento	50.999	5	$8.654e^{-10}$
Capacidad competitiva	42.715	5	$4.221e^{-8}$

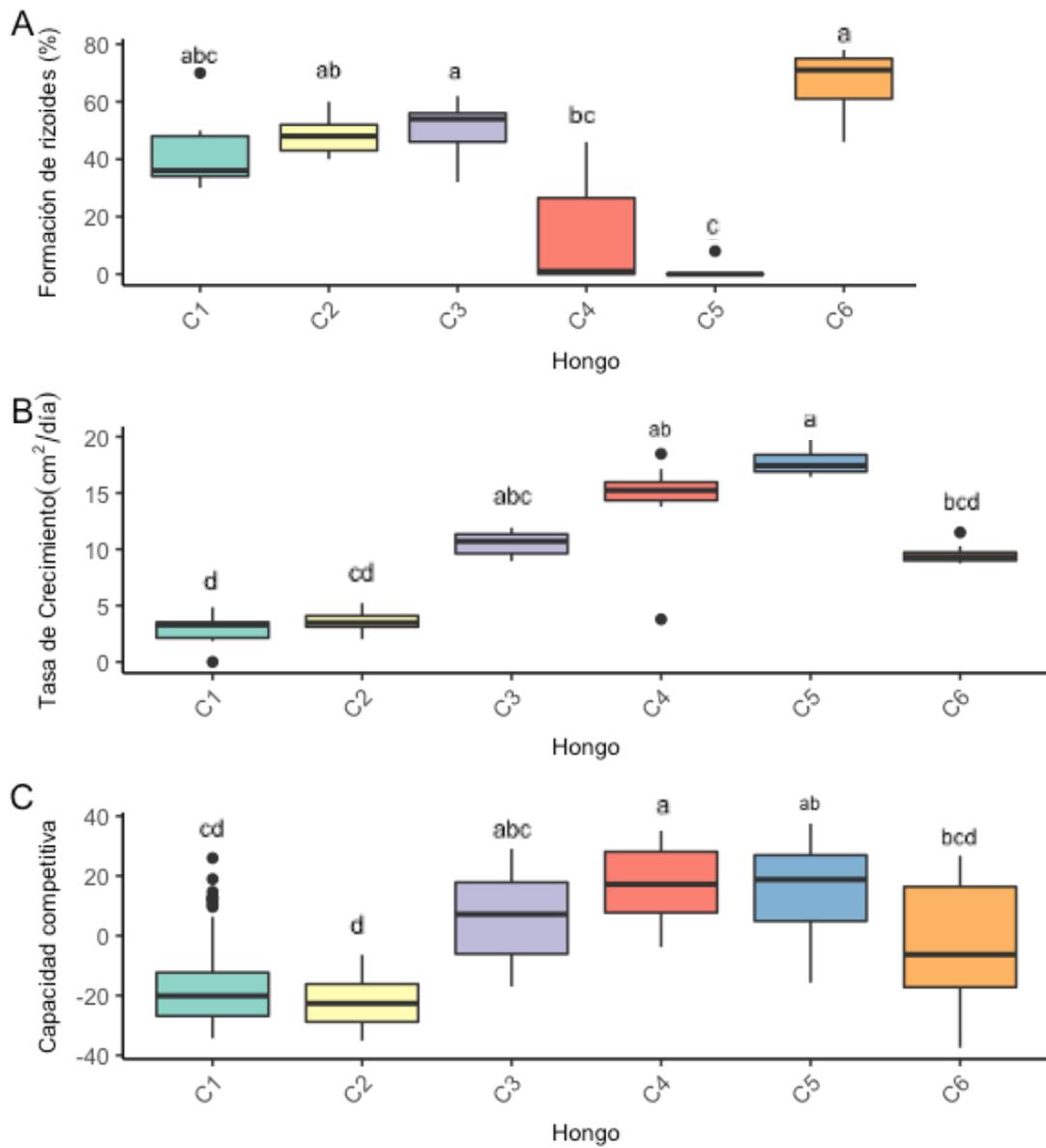


Figura 6. Caracterización de los hongos micorrícicos a partir de los rasgos a evaluar. Los boxplots representan el resultado de la prueba de Kruskal-Wallis donde se muestran las diferencias entre las medias de cada hongo para: A) Porcentaje de formación de rizoides B) Tasa de crecimiento y C) Capacidad competitiva. Las letras indican el resultado del Test de Duun con un nivel de significancia de 0.05.

Al relacionar las variables de tasa de crecimiento, capacidad competitiva y capacidad germinadora, se observó una relación directa entre la tasa de crecimiento con la capacidad competitiva (Fig. 7B; $R^2= 0.934$; $p < 2.2e-16$), donde los hongos que presentaron menores tasas de crecimiento fueron *Ceratobasidium sp.1* y *Ceratobasidium sp.2*, se asociaron a valores negativos de capacidad competitiva, indicando que estos hongos perdieron en la mayoría de los enfrentamientos y por lo tanto son malos competidores. En el caso de *Ceratobasidium sp.6* y *Ceratobasidium sp.3*, ambos presentaron tasas de crecimiento medias y capacidad competitiva media siendo C6 peor competidor que C3. Finalmente, los hongos que presentaron mayores tasas de crecimiento, *Ceratobasidium sp.4* y *Ceratobasidium sp.5*, presentaron valores positivos en la capacidad competitiva, indicando que estos hongos fueron los mejores competidores. En cuanto a la relación entre la capacidad germinadora y la capacidad competitiva de los hongos, el modelo que mejor se ajustó fue el cuadrático (Fig. 7C; $R^2 = 0.6874105$; AIC = 466.2857; p-valor = $4.14e^{-14}$) versus el modelo lineal negativo ($R^2=0.3431058$; AIC= 505.8731; p-valor = 0.00000211); el modelo explica que los hongos que tienen valores negativos en la capacidad competitiva y que por lo tanto son malos competidores, presentan valores medios en la capacidad germinadora (*Ceratobasidium sp.1* y *Ceratobasidium sp.2*); *Ceratobasidium sp.6*, quien presentó un valor negativo en la capacidad competitiva pero cercana a cero, fue un mal competidor pero no tanto, se asoció al mayor valor en la capacidad germinadora; luego, C3 quien tuvo valores positivos de capacidad competitiva pero cercana a cero, fue un buen competidor pero no tanto presentó valores medios en la capacidad germinadora; finalmente quienes tuvieron valores positivos en la capacidad competitiva y fueron los mejores competidores, presentaron los menores valores de capacidad germinadora (*Ceratobasidium sp.4* y *Ceratobasidium sp.5*). Finalmente, debido a que la tasa de

crecimiento está altamente relacionada con la capacidad germinadora individual ($R^2=0.934$), se observó una tendencia negativa entre la tasa de crecimiento y la capacidad germinadora individual ($R^2=0.411$; $p=9.993e^{-8}$; $AIC=500$); donde C1 y C2 quienes crecieron lento presentaron una capacidad germinadora intermedia, luego C3 y C6 quienes presentaron tasas de crecimiento similar (Fig 6C.) presentaron las mayores capacidades germinadora. Por último, C5 y C4 quienes tuvieron mayores tasas de crecimiento presentaron una muy baja capacidad germinadora.

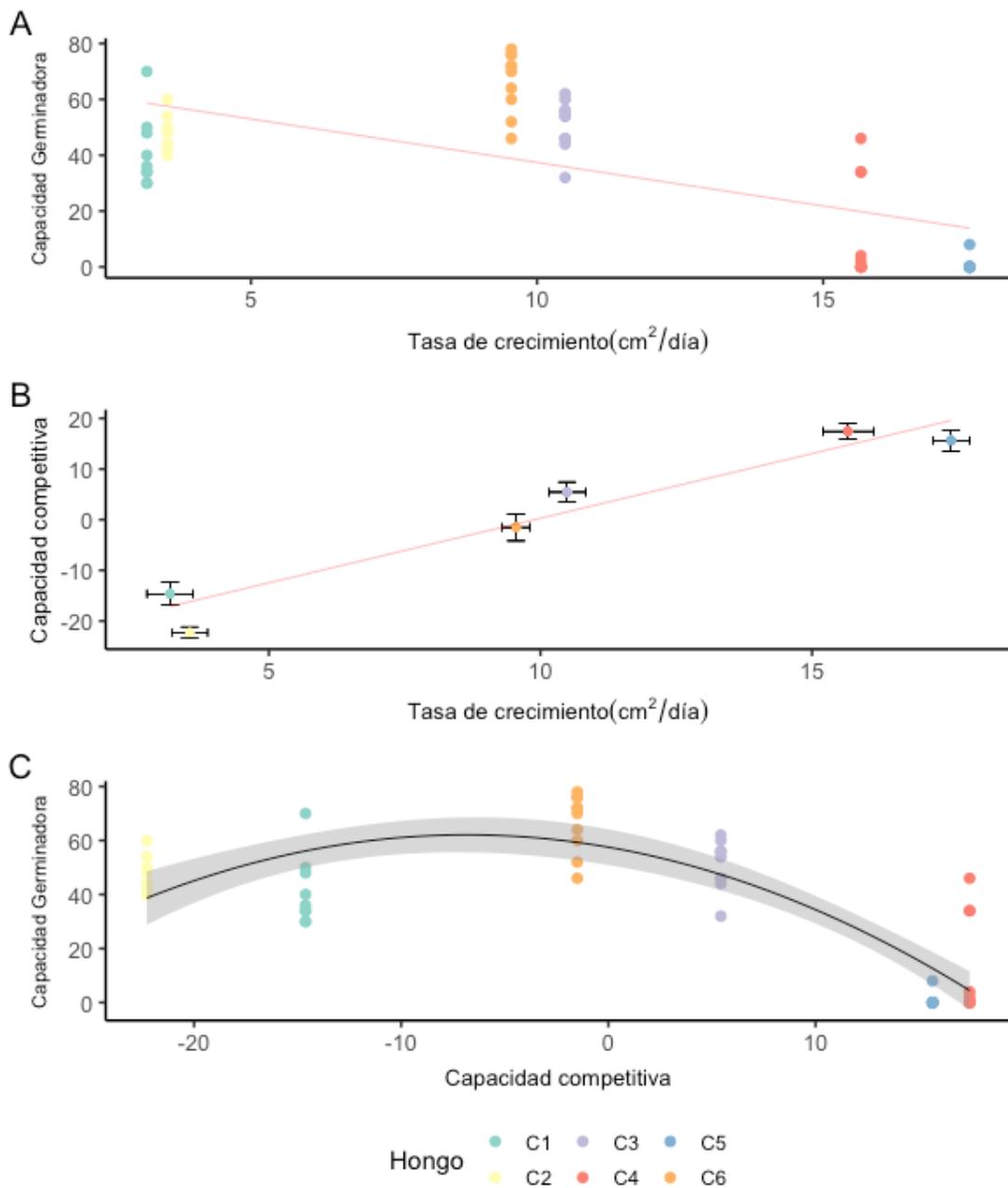


Figura 7. Relación entre los rasgos evaluados A) Relación negativa entre la capacidad germinadora (porcentaje de formación de rizoides) vs la tasa de crecimiento ($R^2=0.411$; $p= 9.993e^{-8}$); B) Relación positiva entre la tasa de crecimiento y la capacidad competitiva de los hongos ($R^2= 0.934$; $p < 2.2e^{-16}$); al ser valores promedios se graficaron junto con

las barras de error para ambas variables. C) Relación entre capacidad germinadora y capacidad competitiva ajustado a un modelo cuadrático ($R^2 = 0.6874105$; AIC = 466.2857; p-valor = $4.14e^{-14}$).

Efecto de la Competencia sobre la germinación.

El modelo que mejor explicó el delta de germinación fue el que incluyó la identidad del hongo germinador, identidad del hongo competidor y el resultado de la competencia (Fig. 8; $R^2 = 0.4309824$; AIC = 2555.281). En términos generales, se observó que el patrón de germinación de semillas en los ensayos de competencia fue el mismo que en los ensayos individuales, es decir, *Ceratobasidium sp.6* en competencia sigue siendo el mejor germinador; *Ceratobasidium sp.1*, *Ceratobasidium sp.2* y *Ceratobasidium sp.3* medios germinadores; *Ceratobasidium sp.4* y *Ceratobasidium sp.5* malos germinadores (Fig. 7). Sin embargo, este patrón de germinación tuvo variaciones dependiendo tanto de la identidad del hongo germinador como la del hongo competidor; en el caso de *Ceratobasidium sp.1* al competir con *Ceratobasidium sp.2* y *Ceratobasidium sp.3* no se encontraron diferencias en la germinación, sin embargo al competir con *Ceratobasidium sp.4* y *Ceratobasidium sp.5* la germinación disminuye considerablemente, al contrario de lo que ocurre al competir con *Ceratobasidium sp.6* donde su germinación aumentó (Fig. 7A); en el caso de *Ceratobasidium sp.2*, éste disminuyó su capacidad germinadora con todos los hongos excepto cuando se enfrentó a *Ceratobasidium sp.6*, con quien aumenta la germinación (Fig 7B); en el caso de *Ceratobasidium sp.3*, presentó porcentajes similares al competir con *Ceratobasidium sp.1* y *Ceratobasidium sp.2*, al competir con *Ceratobasidium sp.4* disminuye; con *Ceratobasidium sp.5* y *Ceratobasidium sp.6* aumenta (Fig 7C); la germinación de *Ceratobasidium sp.4* se mantuvo sin mayores diferencias excepto por un aumento que se observó cuando se

enfrentó a *Ceratobasidium sp.6* (Fig 7D); para *Ceratobasidium sp.5*, este solo aumentó su germinación compitiendo con *Ceratobasidium sp.3* y con *Ceratobasidium sp.6* (Fig. 7E); finalmente *Ceratobasidium sp.6* mantuvo un porcentaje de germinación similar compitiendo con *Ceratobasidium sp.1* y *Ceratobasidium sp.3*, aumenta levemente compitiendo con *Ceratobasidium sp.2* y por último con *Ceratobasidium sp.4* y *Ceratobasidium sp.5* disminuyó su capacidad germinadora (Fig. 7F); estos resultados indican que la identidad de las parejas de hongos en competencia tienen un efecto en la germinación de semillas. Al evaluar el resultado de la competencia (Fig. 8), se observa que C1 ganó los encuentros al competir con C2, perdió todos los encuentros con los otros hongos y se observa un delta de germinación negativo con C4 y positivo con C6. En el caso de C2, tuvo un resultado de competencia negativo en todos los encuentros y su delta de germinación fue negativo mayoritariamente, excepto cuando estaba con C6 y en algunos encuentros con C3 y C4. En cuanto a C3, tuvo resultado de competencia positiva con C1, C2 y C6; y negativa con C4 y C5, el delta de germinación aumenta notoriamente con C5 y disminuye con C4. Por otra parte C4 ganó todos los encuentros y aumenta el delta de germinación cuando está compitiendo con C2, C5 y C6. En el caso de C5, presentó resultado de competencia positivo con todos los hongos excepto con C4, y aumenta su germinación al competir con C3 y C6. Finalmente, C6 presentó resultados negativos de competencia y en el delta de germinación con C4 y C5; y valores positivos C1, C2 y C3 en ambas variables.

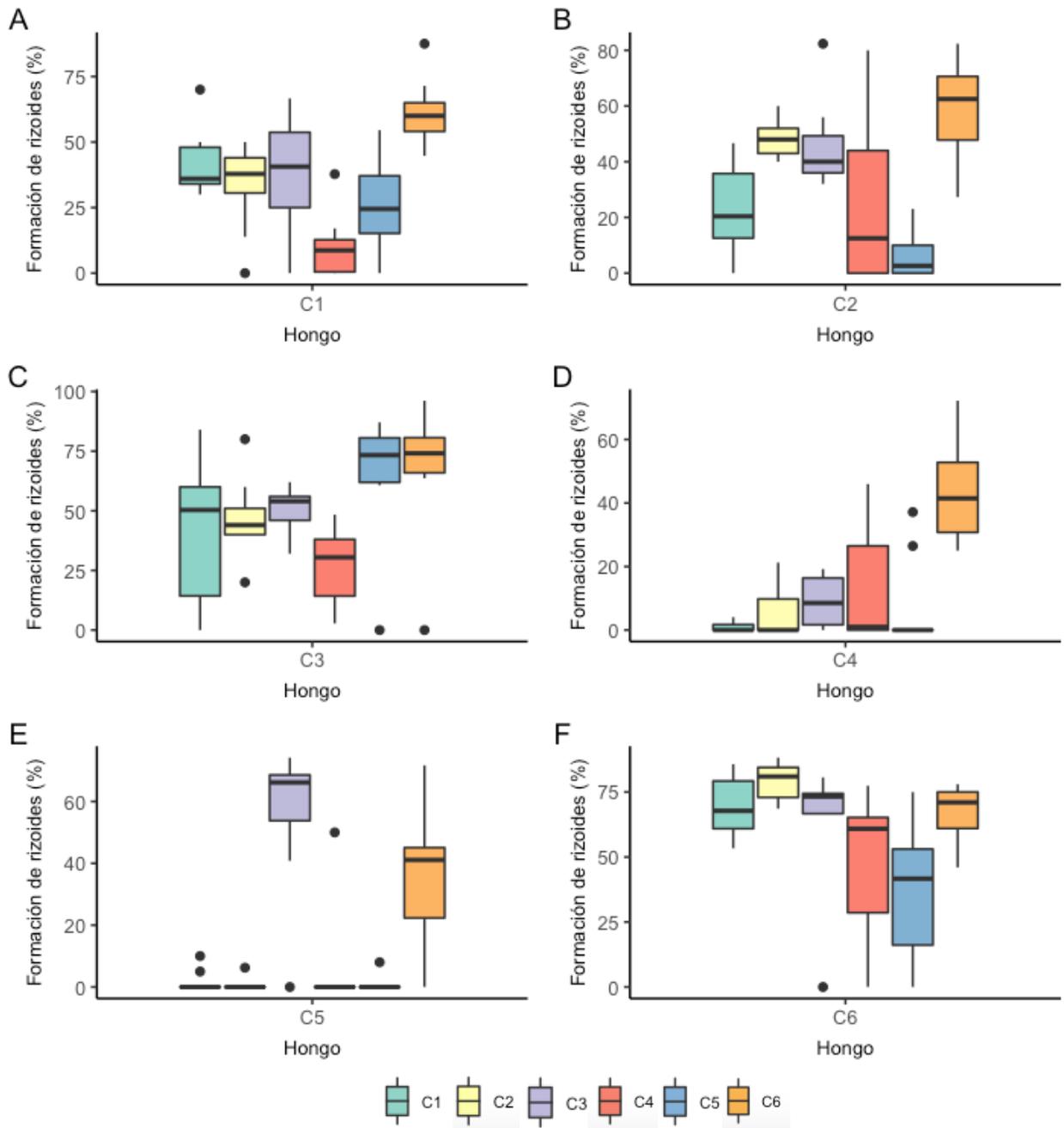


Figura 7. Boxplot con las diferencias en el porcentaje de germinación de las semillas en el ensayo de competencia, la línea negra representa la mediana de los datos y los límites superiores e inferiores desde los bigotes a las cajas, los percentiles 75% y 25%

respectivamente. El nivel de significación según la prueba de Kruskal Wallis fue $p\text{-value} = 1.553e^{-13}$.

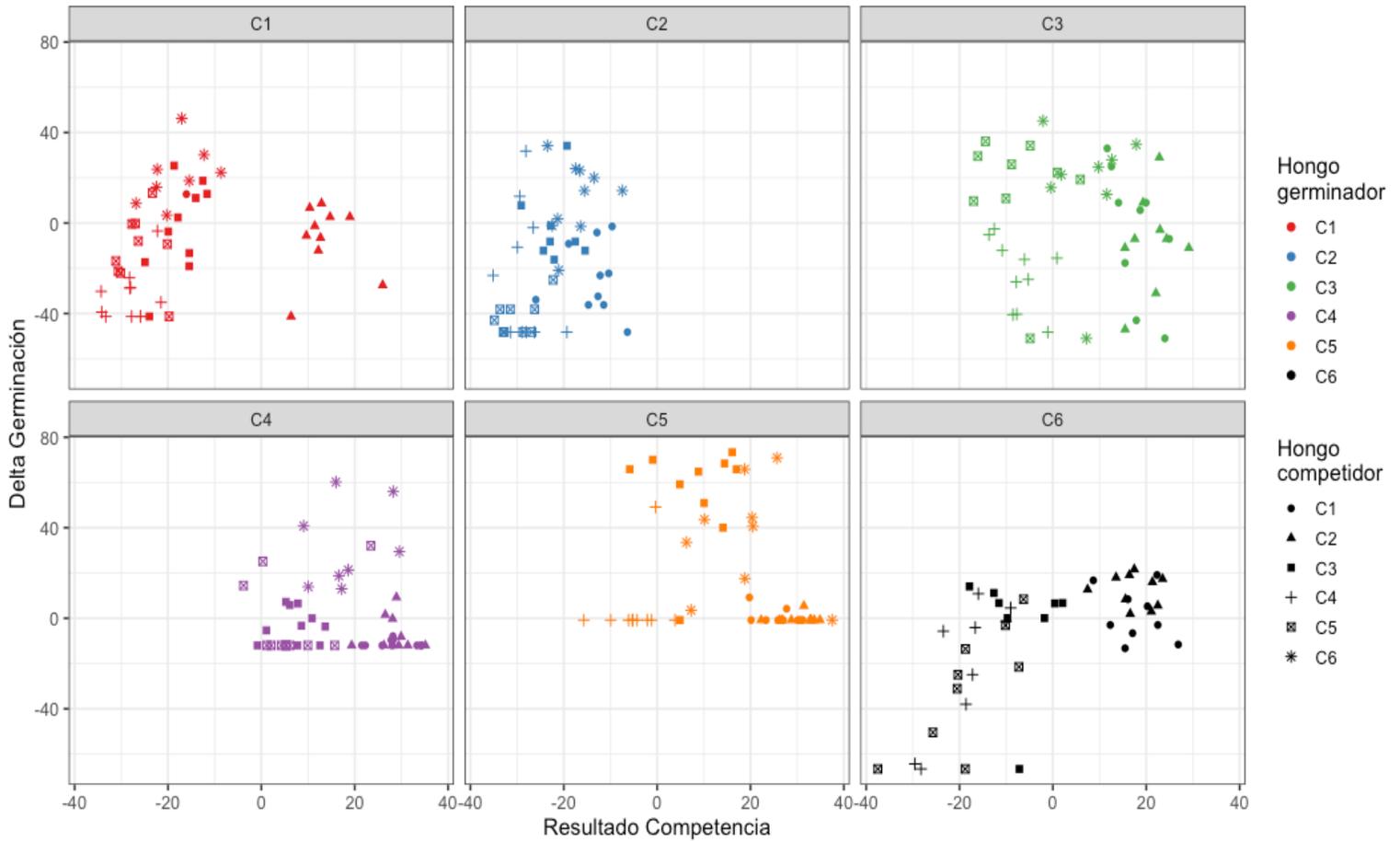


Figura 8. Modelo explicativo del efecto de la competencia en la germinación con valores del delta de germinación y el resultado de la competencia. Los colores muestran al hongo germinador y las figuras al hongo con quien se enfrentó en la competencia. Los valores positivos del delta de germinación indican que en el ensayo de competencia la presencia del hongo competidor aumentó la germinación y valores negativos indica que disminuyó. Valores positivos del resultado de la competencia indican que ganó en el enfrentamiento y los negativos que perdió.

Discusión

A partir de los resultados obtenidos, se encontró que existe una relación cuadrática entre la capacidad germinadora y capacidad competitiva de hongos micorrícicos de orquídeas, donde aquellos hongos con capacidades competitivas medias tienen las mayores tasas de germinación. Además la capacidad competitiva se relacionó positivamente con la tasa de crecimiento, es decir, los hongos que crecieron más rápido fueron los más competitivos y presentaron una baja capacidad germinadora. Por otra parte, se encontró una variación en el efecto de la competencia sobre la germinación simbiótica relacionada con la identidad del hongo germinador, el hongo competidor y el avance en la competencia. Sin embargo, se necesita más información para comprender el mecanismo subyacente.

Compromiso entre capacidad germinadora y capacidad competitiva

La capacidad germinadora de los seis hongos micorrícicos fue significativamente diferente, *Bipinnula fimbriata* presentó mayor porcentaje de germinación con *Ceratobasidium sp. 6* (C6), quien fue aislado de una población de la misma orquídea. Sin embargo, *Ceratobasidium sp. 4* (C4) y *Ceratobasidium sp. 5* (C5), que también fueron aislados de poblaciones de *Bipinnula fimbriata*, presentaron los menores porcentajes de germinación. Numerosos estudios han demostrado que las especies individuales de hongos micorrícicos difieren en su capacidad para promover el crecimiento de plantas (Bever *et al.*, 2001). Esto indica por una parte que algunos hongos micorrícicos pueden asociarse a plantas adultas, y por otra, que no todos tienen la capacidad para germinar semillas. Siendo concordante con estudios previos donde encontraron que la especificidad de la interacción entre hongos micorrícicos con

orquídeas no es inmutable, esta puede variar dependiendo de las condiciones ambientales y estadio de vida del individuo (McCormick *et al.*, 2006). Por otra parte *Ceratobasidium sp.1* (C1), *Ceratobasidium sp2* (C2) y *Ceratobasidium sp3* (C3), quienes fueron aislados de poblaciones de *B.plumosa* presentaron una capacidad germinadora intermedia, lo que indicaría una baja especificidad micorrícica por parte de *Bipinnula fimbriata*. Esto concuerda con estudios previos donde también encontraron una baja especificidad en la interacción (Steinfort *et al.*, 2010; Herrera *et al.*, 2017; Mujica *et al.*, 2020), lo cual podría ser una ventaja y podría explicar la gran abundancia de *Bipinnula fimbriata* comparada con otras poblaciones de orquídeas mas raras y que tiene distribuciones limitadas (Novoa *et al.*, 2015; Claro *et al.*, 2020). Sin embargo esto tiene que ser explorado en estudios futuros.

Por otra parte, la tasa de crecimiento también fue significativamente diferente para los seis hongos donde además se relacionó positivamente con la capacidad competitiva. Los hongos aislados de poblaciones de *Bipinnula plumosa* presentaron las menores valores de tasa de crecimiento y capacidad competitiva (*Ceratobasidium sp.1*, *Ceratobasidium sp.2* y *Ceratobasidium sp.3*), al contrario de los hongos aislados de *Bipinnula fimbriata* que presentaron los mayores valores (*Ceratobasidium sp4*, *Ceratobasidium sp5* y *Ceratobasidium sp6*). Estudios previos sugieren que la habilidad competitiva de hongos micorrícicos de orquídeas está relacionada con la tasa de crecimiento o producción de biomasa más que en el metabolismo intrínseco, de esta manera los hongos más competitivos podrían tomar mayor cantidad de carbono disponible y parte de éste entregarlo a la planta aumentando las probabilidades de supervivencia, lo que tendría como consecuencia el establecimiento de poblaciones de orquídeas más abundantes en la naturaleza (Nurfadilah *et al.*, 2013; Mehra *et al.*, 2017).

Esto podría explicar las diferencias en las tasas de crecimiento y capacidad competitiva al considerar el origen de los hongos utilizados en los experimentos, donde los hongos aislados de poblaciones de *B. plumosa*, que es menos abundante y poco frecuente comparada con *B. fimbriata*, son menos competitivos y esto se vería reflejado en el establecimiento de plantas.

En cuanto a la relación entre la capacidad germinadora y capacidad competitiva, ésta fue cuadrática y negativa, los hongos con mayor capacidad competitiva (*Ceratobasidium sp4* y *Ceratobasidium sp5*) presentaron los menores porcentajes de germinación, mientras que los hongos que presentaron una capacidad competitiva intermedia se asociaron a los mayores valores (*Ceratobasidium sp3* y *Ceratobasidium sp6*). Por último, *Ceratobasidium sp1* y *Ceratobasidium sp2*, presentaron una baja capacidad competitiva y una capacidad germinadora de intermedia a baja. Por lo tanto, la hipótesis 1 se cumpliría parcialmente. Esto se podría explicar por los compromisos en la expresión de rasgos, tal como propone Maynard *et al.*, (2019), donde encontraron que hongos descomponedores con amplios nichos térmicos y de humedad exhibieron una menor capacidad de desplazamiento. Cuando las especies compiten por el espacio, las diferencias en la capacidad competitiva teóricamente deberían promover el agrupamiento filogenético y de rasgos siempre que las diferencias de nicho sean mínimas (Maynard *et al.*, 2019). Estas relaciones iniciales de rasgos por pares sugieren claras diferencias en las estrategias de historia de vida, con hongos que tienen tasas de extensión lentas que también tienen densidades más altas, anchos de nicho más amplios y habilidades competitivas más bajas. Por el contrario, los hongos de crecimiento rápido son más competitivos, aunque pueden sobrevivir en una gama más pequeña de condiciones ambientales. Este compromiso entre rasgos es similar al que se observó

parcialmente en los hongos micorrícicos asociados a *Bipinnula*, donde aquellos hongos altamente competitivos tienen bajas capacidades germinadoras.

Efecto competencia.

El efecto de la competencia en la germinación simbiótica fue significativa y presentó variaciones. El resultado más notorio fue para *Ceratobasidium sp.5*, quien por sí solo presentó muy baja germinación, sin embargo al estar compitiendo con C6 este aumentó considerablemente su capacidad germinadora. Estas diferencias se puede deber a que los hongos pueden tener nichos duales, es decir, frente a ciertas condiciones ambientales estos pueden formar asociaciones o ser saprotróficos (Selosse *et al.*, 2018), evidenciando que existirían diferencias funcionales intraespecíficas dentro del mismo género del hongo, tal como demostró Mujica *et al.* (2020) y Freestone *et al.*, (2022), donde probaron que algunas especies del género *Ceratobasidium* varían en la respuesta de la germinación simbiótica de acuerdo a diferentes medios nutricionales. Algunos individuos pueden, por razones genéticas y/o ambientales, ser más propensos a usar uno u otro aspecto de un nicho, mientras que otros individuos pueden usar todo el nicho dual, como se demuestra en trufas endófitas y ectomicorrícicas (Schneider-Maunoury *et al.*, 2018). Por otra parte, algunos hongos presentaron respuestas similares tanto a la germinación simbiótica como a la capacidad competitiva, lo cual podría estar relacionado con el nivel de parentesco en la filogenia de estos hongos. Mujica *et al.* (2020) encontraron que hongos más emparentados tienen respuestas similares a la germinación simbiótica y al crecimiento con la adición de nutrientes sugiriendo que estas respuestas podrían ser filogenéticamente conservadas. Sin embargo para evaluar este supuesto, futuros estudios tienen que incorporar la filogenia de los hongos involucrados en la asociación, así como también prestar más atención a las capacidades saprotróficas

de hongos micorrícicos (Selosse *et al.*, 2018). De todas formas, la persistencia y establecimiento de orquídeas parece depender de características intrínsecas de los hongos micorrícicos, algunos autores proponen enfocar los esfuerzos en dilucidar los patrones de nicho de los hongos a gran escala en vez de la identidad taxonómica, evaluar la expresión de rasgos funcionales a nivel de individuo podría explicar tanto los patrones biogeográficos de los hongos micorrícicos y esto a su vez daría luces de la dinámica de la interacción al considerar las presiones selectivas impuestas por diferentes filtros ambientales (Maynard *et al.*, 2019).

Implicancias para la Ecología y Conservación de Orquídeas

Las interacciones competitivas entre hongos micorrícicos podrían ser relevantes para la formación de micorrizas al permitir la coexistencia entre especies mutualistas con diferentes estrategias de historia de vida (Tilman, 1994; Hoeksema & Bruna, 2000). Esto sumado a la posibilidad de que un hongo micorrícico tenga la plasticidad fenotípica de usar un aspecto de su nicho u otro (Selosse 2018), tendría consecuencias en el establecimiento de plántulas, sobre todo si esto a su vez, está modulado por las condiciones abióticas como la disponibilidad de nutrientes y condiciones climáticas (Johnson *et al.*, 2003; Tedersoo *et al.*, 2012; Bunch *et al.*, 2013; Mujica *et al.*, 2016). Esto toma especial relevancia para las orquídeas debido a que su nicho de germinación es extremadamente complejo, ya que está definido tanto por los requisitos para la germinación de la semillas y su desarrollo; así como también para la presencia de hongos simbioses compatibles y su sustrato (Rasmussen *et al.*, 2015). Por lo tanto, cualquier esfuerzo para la conservación de orquídeas *in situ* o *ex situ* requiere el estudio de los hongos micorrícicos de la especie en cuestión (Batty *et al.*, 2002; Swarts & Dixon 2010).

En Chile se han descrito 72 especies de orquídeas distribuidas a lo largo del territorio (Novoa et al., 2015), que constituyen 8 géneros: *Chlorea*, *Gavilea*, *Bipinnula*, *Correorchis*, *Brachystele*, *Codonorchis*, *Habenaria*, *Myrosmode*, donde al menos 39 especies son endémicas y de éstas la gran mayoría se encuentra en algún nivel de amenaza (Novoa et al., 2015). Autores ya han reportado la urgencia de evaluar el estado de conservación de las orquídeas chilenas debido a su constante disminución en la distribución y de poblaciones observadas en la naturaleza, sin embargo la falta de información ha sido limitante para llevar a cabo la evaluación (Herrera et al., 2019). Por ello es de suma importancia conocer los aspectos esenciales que determinan la distribución de orquídeas, y los hongos micorrícicos tienen un papel más complejo que ser simples germinadores de semillas (Rasmussen et al., 2015; Fochi et al., 2017; McCormick et al., 2018).

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos y posterior análisis, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los hongos micorrícicos del género *Ceratobasidium* tienen diferencias intraespecíficas en la capacidad germinadora así como también en la capacidad competitiva. Comprender la dimensión intraespecífica de variación de nicho de hongos micorrícicos podría ser prometedor para dilucidar aspectos asociados a la ecología de micorrizas y las posibles diferencias funcionales entre hongos micorrícicos.
2. De la hipótesis planteada, se encontró evidencia de un compromiso entre la obtención de recursos y la capacidad germinadora para *Ceratobasidium sp4* y *Ceratobasidium sp5*. Por otra parte el efecto de la competencia sobre el resultado de la germinación simbiótica tuvo respuestas positivas y negativas dependiendo de la identidad del hongo competidor, lo cual podría estar relacionado con el parentesco de las especies involucradas en el enfrentamiento. Incorporar la filogenia podría dar luces del mecanismo subyacente en las interacciones competitivas entre hongos micorrícicos.
3. La incorporación de la información sobre la ecología de micorrizas a las estrategias de conservación de orquídeas es importante para un buen manejo de poblaciones en riesgo o amenazadas, ya que podría permitir el éxito del establecimiento de plantas en ecosistemas degradados al conocer los requerimientos tanto bióticos como abióticos de hongos micorrícicos.
4. En este estudio se evaluó por primera vez el efecto de las interacciones competitivas entre hongos micorrícicos sobre la germinación simbiótica de

orquídeas. La posibilidad de evaluar experimentalmente los factores que afectan la formación de micorrizas es una oportunidad para abordar de una perspectiva ecológica y evolutiva la distribución y abundancia de hongos micorrícicos, lo que además, podría ayudar a comprender los aspectos asociados a la constante disminución de poblaciones naturales de orquídeas nativas.

Referencias

- Arditti J, Ghani AKA (2000). Tansley Review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*. 145, 367-421.
- Batty AL, Dixon KW, Brundrett MC, Sivasithamparam K. (2002). Orchid conservation and Mycorrhizal associations. In: K. Sivasithamparam, K.W. Dixon and R.L. Barrett eds. *Microorganisms in plant conservation and biodiversity.*, the Netherlands: Kluwer academic publishers, Dordrecht, pp 195–226.
- Bennett AE, Bever, JD. (2009). Trade-offs between arbuscular mycorrhizal fungal competitive ability and host growth promotion in *Plantago lanceolate*. *Oecologia*, 160:807-816.
- Bever JD, Schultz PA, Pringle A, Morton JB (2001) Arbuscular mycorrhizal fungi: more diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *Bioscience* 51:923–931
- Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, Bruns TD, Read DJ. (2004). Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *The Royal Society*. 271: 1799-1806.
- Bidartondo MI, Read DJ. (2008). Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology*, 17:3707-3716.
- Blackwell M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3...5.1 million species?. *American Journal of Botany*, 98, 426–438.
- Brundrett, MC. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154(2), 275–304.

Brundrett, MC. (2009). Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil*, 320: 37-77.

Bunch WD, Cowden CC, Wurzburger N, Shefferson RP. (2013). Geography and soil chemistry drive the distribution of fungal associations in lady's slipper orchid, *Cypripedium acaule*. *Botany* 91: 850–856.

Claro A, Mujica MI, Cisternas M, Armesto JJ, Perez F. (2020). Low mycorrhizal diversity in the endangered and rare orchids *Bipinnula volckmannii* and *B. apinnula* of central Chile. *Symbiosis*. 80, 145–154.

Curtis JT (1939) The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. *American Journal of Botany* 26:390–399.

Dearnaley JDW, Martos F, Selosse MA (2012) Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. *Fungal Assoc* 2nd Ed 9:207–230.

Fochi V, Chitarra W, Kohler A, Voyron S, Singan VR, Lindquist EA, Barry KW, Girlanda M, Grigoriev IV, Martin F, Balestrini R, Perotto S (2017). Fungal and plant gene expression in the *Tulasnella calospora*–*Serapias vomeracea* symbiosis provides clues about nitrogen pathways in orchid mycorrhizas. *New Phytol* 213:365–379.

Frank AB, Trappe JM. (2005). On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* 15: 267–275.

Freestone M, Linde C, Swarts N, Reiter N. (2022). *Ceratobasidium* orchid mycorrhizal fungi reveal intraspecific variation and interaction with different nutrient media in symbiotic germination of *Prasophyllum* (Orchidaceae). *Symbiosis* 87:255-268.

Hart MM, Reader RJ. (2002). Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 153: 335–344.

Hart MM, Reader RJ. (2005) The role of the external mycelium in early colonization for three arbuscular mycorrhizal fungal species with different colonization strategies. *Pedobiologia*. 49: 269–279.

Heilmann-Clausen J, Barron ES, Boddy L, Dahlberg A, Griffith GW, Nordén J, Ovaskainen O, Perini C, Senn-Irlet, Halme P. (2014). A fungal perspective on conservation biology. *Conservation Biology* 0, 1-8.

Herrera H, Valadares R, Contreras D, Bashan Y, Arriagada C (2017) Mycorrhizal compatibility and symbiotic seed germination of orchids from the coastal range and Andes in south central Chile. *Mycorrhiza* 27:175–188.

Herrera H, García-Romera I, Meneses C, Pererira G, Arriagada C. (2019). Orchid Mycorrhizal Interactions on the Pacific Side of the Andes from Chile. A Review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*.

Hoeksema JD, Bruna EM (2000) Pursuing the big questions about interspecific mutualism: a review of theoretical approaches. *Oecologia* 125:321–330.

Johnson NC, Graham JH, Smith FA. (1997). Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol*. 135: 575-585.

Johnson NC, Rowland DL, Corkidi L, Egerton-Warburton LM, Allen EB (2003) Nitrogen enrichment alters mycorrhizal allocation at five Mesic to semiarid grasslands. *Ecology* 84:1895–1908.

Johnson D, Martin F, Cairney JWG, Anderson IC. (2012). The importance of individuals: intraspecific diversity of mycorrhizal plants and fungi in ecosystems. *New Phytologist* 194: 614–628.

Kristiansen KA, Rasmussen FN, Rasmussen HN (2001) Seedlings of *Neuwiedia* (Orchidaceae subfamily Apostasioideae) have typical orchidaceous mycotrophic protocorms. *American Journal of Botany*. 88:956–959.

Leake J. (1994). The biology of mycoheterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist*. 127:171–216.

Li S, B, Y, Kong W. et al. (2015). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on ecological restoration in coal mining areas. *Russ J Ecol*. 46, 431–437.

Maynard DS, Bradford MA, Covery KR, Lindner D, Glaeser J, Talbert DA, Tinker PJ, Walker DM, Crowther TW. (2019). Consistent trade-off in fungal trait expression across broad spatial scales. *Nature Microbiology*. 4: 846-853.

McCormick MK, Whigham DF, Sloan D, O'Malley K, Hodkinson B. (2006). Orchid-fungus fidelity: A marriage meant to last?. *Ecology*. 87(4): 903-911.

McCormick MK, Whigham DF, Canchani-Viruet A. (2018). Mycorrhizal fungi affect orchid distribution and population dynamics. *New Phytol*. 219:1207–1215.

Mehra S, Morrison PD, Coates F, Lawrie AC (2017) Differences in carbon source utilisation by orchid mycorrhizal fungi from common and endangered species of *Caladenia* (Orchidaceae). *Mycorrhiza* 27:95–108.

Mitchell, R. (1989). Growing hardy orchids from seeds at Kew. *Plantsman*, 11, 152-169

Mujica MI, Saez N, Cisternas M, Manzano M, Armesto JJ, Pérez F (2016). Relationship between soil nutrients and mycorrhizal associations of two *Bipinnula* species (Orchidaceae) from Central Chile. *Ann Bot* 118:149–158.

Mujica MI., Cisternas M., Claro A., Simunovic M., Pérez MF. (2020). Nutrients and fungal identity affect the outcome of symbiotic germination in *Bipinnula fimbriata* (Orchidaceae). *Symbiosis* 83, 91–101.

Novoa P, Espejo J, Cisternas M, Rubio M, Domínguez E (2015) Guía de campo de las orquídeas chilenas. Segunda edición ampliada. Corporación Chilena de la Madera (CORMA), Santiago, 123p.

Nurfadilah S, Swarts ND, Dixon KW, Lambers H, Merritt DJ (2013) Variation in nutrient acquisition patterns by mycorrhizal fungi of rare and common orchids explains diversification in a global biodiversity hotspot. *Ann Bot.* 111, 1233-1241.

Öpik M. Moora M, Liira J, Zobel M. (2006). Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94: 778–790.

Prosser, J., Bohannan, B., Curtis, T., Ellis, R., Firestone, MK., Freckleton RP., Green LE., Killham K., Lennon JJ., Osborn AM., Solan M., van der Gast, CJ., Young JPW.

(2007). The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 5: 384–392.

Rasmussen H, Whigham D (1993) Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its application in terrestrial orchids. *Am J Bot*:1374–1378.

Rasmussen H. (1995). *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press, Cambridge, UK 444 p

Rasmussen H, Rasmussen FN. (2007). Trophic relationship in orchid mycorrhiza-diversity and implications for conservation. *Lankesteriana*. 7(1-2): 334-341.

Rasmussen HN, Dixon KW, Jerksakova J, Tesitelova T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirement. *Annals of Botany*.

Read, DJ. (1991). Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia*, 47, 376-391.

Schneider-Maunoury L, Leclercq S, Clement C, Coves H, Lambourdiere J, Sauve M, Richard F, Selosse M-A, Taschen E. (2018). Is *Tuber melanosporum* colonizing the roots of herbaceous, non-ectomycorrhizal plants? *Fungal Ecology* 31: 59–68.

Selosse, MA, Schneider-Maunoury, L. and Martos, F. (2018), Time to re-think fungal ecology? Fungal ecological niches are often prejudged. *New Phytol*, 217: 968-972.

Selosse MA, Petrolli R, Mujica MA, Laurent L, Perez-Lamarque B, Figura T, Bourceret A, Jacquemyn H, Li Taiqiang, Gao Jiangyun, Minasiewicz J, Martos F. (2021). The waiting room hypothesis revisited by orchids: were orchid mycorrhizal fungi recruited among root endophytes?. *Annals of Botany*, 20: 1-12.

Silva-Flores P, Neves MA, Weidlich EWA, Fajardo L, Acuña L, Aguilera P, Marín C, Godoy R, Duarte M, Cabrera A, Santelices R. (2022). Mycorrhizas and Ecological Restoration in South America.

Smith, S.E., Read, D. J. (2008). Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn London, UK: Academic Press.

Sommer J, Pausch J, Brundrett MC, Dixon KW, Bidartondo MI, Gebauer G. (2012). Limited carbon and mineral nutrient gain from mycorrhizal fungi by adult Australian orchids. *American Journal of Botany*. 99:1133–1145.

Steinfort U, Verdugo G, Besoain X, Cisternas M. (2010). Mycorrhizal association and symbiotic germination of the terrestrial orchid *Bipinnula fimbriata* (Poepp.) Johnst (Orchidaceae). *Flora* 205: 811–817

Swartz ND, Dixon KW (2010). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Ann Bot* 104:543–556

Taylor DL, Hollingsworth TN, McFarland, JW, Lennon NJ, Nussbaum C. and Ruesch RW. (2014), A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. *Ecological Monographs*, 84: 3-20.

Tedersoo L, Bahram M, Toots M, Diedhiou AG, Hankel TW, Kjøller R, Morris MH, Nara K, Nouhra E, Peay KH et al. (2012). Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology*, 21: 4160-4170.

Tedersoo L, Bahram M, Zobel M. (2020). How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. *Science*, 367 (6480).

Tilman D. (1994). Competition and Biodiversity in spatially structured habitats. *Ecology*. 75(1): 2-16.

van der Heijden MGA., Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998). Different Arbuscular Mycorrhizal Fungal Species are Potential Determinants of Plant Community Structure. *Ecology*, 79(6): 2082-2091.

van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse MA. and Sanders IR. (2015). Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist*, 205: 1406-1423.

Verdugo G, Marchant J, Cisternas M, Calderón X, Peñaloza P. (2007). Caracterización morfológica de la germinación de *Chloraea crispa* (Orchidaceae) usando análisis de imagen. *Gayana Botánica*. 64: 230-236.

Vujanovic V, St-Arnaud M, Barabé D, Thibeault G. (2020). Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany*. 86: 79-86.

Wurzburger N. and Clemmensen KE. (2018), From mycorrhizal fungal traits to ecosystem properties – and back again. *J Ecol*, 106: 463-467

Anexo

Tabla A1. Datos obtenidos del test de tetrazolium para probar la viabilidad del lote semillas de *Bipinnula fimbriata* utilizadas en los experimentos de germinación simbiótica.

Réplica	Viables	No viables	Total	% Viabilidad
BF2018-1	11	6	17	64.7058824
BF2018-2	16	3	19	84.2105263
BF2018-3	17	1	18	94.4444444
	36	13	54	81.1202843

Tabla A2. Mediciones del área de crecimiento que se utilizaron para estimar las tasas de crecimiento de los hongos.

Día	Área C1 (cm ²)	Área C2 (cm ²)	Área C3 (cm ²)	Área C4 (cm ²)	Área C5 (cm ²)	Área C6 (cm ²)
0	1	1	1	1	1	1
3	3.156	1.8726	7.275	16.9262	13.3567	10.4635
5	7.481	6.552	25.532	63.8408	52.7357	29.3203
7	15.87	16.03	49.227	79.5914	83.6862	48.6455
11	90.744	90.744	90.744	90.744	90.744	90.744
13	90.744	90.744	90.744	90.744	90.744	90.744
15	90.744	90.744	90.744	90.744	90.744	90.744
TC (cm ² /día)	3.1785	3.53935	10.488	15.6663	17.582375	9.5455

Tabla A3. Promedio, desviación estándar, varianza y error estándar de la germinación individual de los hongos.

Hongo	Promedio	Desviación estándar	Varianza	Error estándar
C1	41.33333	12.922848	167.00000	4.307616
C2	48.28571	7.064330	49.90476	2.670066
C3	51.00000	9.0066171	81.11111	2.848001
C4	12.00000	18.281746	334.22222	5.781196
C5	0.80000	2.529822	6.40000	0.800000
C6	66.60000	10.875048	118.26667	3.438992

Tabla A4. Promedio, desviación estándar y varianza de la tasa de crecimiento de los hongos.

Hongo	Promedio	Desviación estándar	Varianza
C1	3.1785	1.35146035	1.82644507
C2	3.53935	1.05612909	1.11540865
C3	10.488	1.06171535	1.12723949
C4	15.6663	1.47202163	2.16684769
C5	17.582375	1.08024024	1.16691898
C6	9.5455	0.82907637	0.68736763

Modelos

1. Delta germinación ~ Resultado Competencia

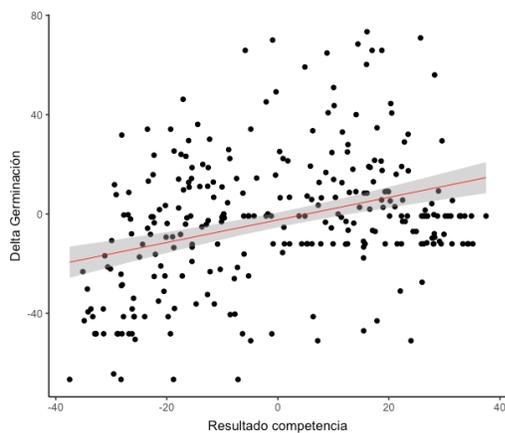


Figura x. Gráfico modelo delta de germinación explicado por el resultado de la competencia ($R^2 = 0.1156154$; AIC = 2660.961)

2. Delta Germinación ~ Resultado competencia + Identidad hongo germinador

