



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS CAMPECHE

POSTGRADO EN BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL  
TRÓPICO

**INTERACCIÓN FORÓFITO- ORQUÍDEA: UN ESTUDIO DE LOS  
FACTORES FÍSICOS DEL FORÓFITO Y SU INFLUENCIA EN  
EL DESARROLLO RADICAL ORQUIDAL**

**ÁNGEL MANUEL ZÁRATE GARCÍA**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

SIHOCHAC, CHAMPOTÓN, CAMPECHE

2019

## **CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Ángel Manuel Zárate García**, Alumno de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **Fulgencio Alatorre Cobos**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **“Interacción forófito- orquídea: un estudio de los factores físicos del forófito y su influencia en el desarrollo radical orquidal”** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos que se pueden derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y El que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

Sihochac, Champotón, Campeche a 2 de abril de 2019.

---

**Ing. Ángel Manuel Zárate García**

**Firma**

---

**Vo.Bo.**  
**Dr. Fulgencio Alatorre Cobos**  
**Profesor Consejero**

La presente tesis, titulada: **Interacción forófito- orquídea: un estudio de los factores físicos del forófito y su influencia en el desarrollo radical orquidal**, realizada por el alumno: **Ángel Manuel Zárate García**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
BIOPROSPECCIÓN Y SUSTENTABILIDAD AGRÍCOLA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: \_\_\_\_\_  
DR. FULGENCIO ALATORRE COBOS

ASESORA: \_\_\_\_\_  
DRA. ELIANA JOSEFINA NOGUERA SAVELLI

ASESORA: \_\_\_\_\_  
DRA. HILDA ARACELI ZA VALETA MANCERA

# INTERACCIÓN FORÓFITO- ORQUÍDEA: UN ESTUDIO DE LOS FACTORES FÍSICOS DEL FORÓFITO Y SU INFLUENCIA EN EL DESARROLLO RADICAL ORQUIDAL

Ángel Manuel Zárate García, M.C.

Colegio de postgraduados, 2019

## RESUMEN

A pesar del gran interés de la investigación en la biología y conservación de las orquídeas, los trabajos sobre los factores que afectan la preferencia con sus árboles hospederos son aún debatidas. Por esto, el propósito de la presente investigación fue contribuir en el estudio de la especificidad forófitos, abordando el tema desde el papel que tiene la corteza sobre la preferencia de los árboles hospederos. El estudio comprendió el análisis de dos transectos establecidos de forma simultánea en dos áreas diferentes del estado, en los que se describió la composición real de los forófitos de una comunidad de orquídeas epifitas. Se evaluó la de exfoliación de la corteza, índice de fisuración con un enfoque combinado apoyado de la microscopia de luz y softwares de imagen para explicar la preferencia de las epifitas por los forófitos. Los resultados muestran que las orquídeas presentan mayor preferencia por forófitos que tienen mayor porosidad en la corteza y por ello retienen más cantidades de agua. La segunda parte de este trabajo describió la dinámica de diferenciación morfológica, del velamen de las raíces de *Encyclia alata* (Bateman) Schltr. en diferentes etapas de desarrollo. Los resultados obtenidos con el apoyo de microscopía de barrido, el uso de técnicas histoquímicas y microscopía confocal, sugieren que los cambios en la morfología conjuntamente con la relación del grosor de las paredes celulares de las células del velamen, están relacionados de forma íntima con la acumulación de lignina en la pared.

**Palabras claves:** corteza, raíz, velamen.

EPIPHYTE-PHOROPHYTE INTERACTION: FOROPHYTES PHYSICAL FACTORS  
AND ORQUIDAL RADICAL DEVELOPMENT INFLUENCE

Ángel Manuel Zárate García, M.C.

Colegio de postgraduados, 2019

**ABSTRACT**

Despite the great research interest in orchid's biology and conservation, the factors that affect the host trees preference are still debated. Therefore, the research purpose was to contribute to phorophytes specificity by studying the role of the bark on host trees preference. This thesis comprised two sites analysed in two simultaneous studies, we described an actual phorophytes composition of epiphytic orchids community along of 2 transects. Bark stability and fissured index were evaluated with a combined approach supported by light microscopy and image software to explain epiphytes- phorophytes preference. Results show orchids preferred phorophytes with high bark porosity as it retains more water volume. The second part of work described the velamen root morphological differentiation of *Encyclia alata* (Bateman) Schltr at different development stages. Scanning electronic microscopy, histochemical techniques and confocal microscopy results showed morphology changes and cell walls thickness in velamen cells which are related with lignin accumulation on the cell wall.

**Keywords:** phorophytes, bark, orchid, root velamen

## DEDICATORIA

En la vida de un hombre, siempre se necesitará personas que le inspiren a ser mejor cada día, personas importantes, personas valiosas, personas amadas.

Dedico esta Tesis a mi Madre María de los Ángeles García Pérez, la primera persona que me abrazo al nacer, y que me abraza en cualquier circunstancia. Que me abraza en la distancia y siempre está presente en mis logros más importantes. Su amor incondicional y su infinito apoyo, la convierte en la persona más importante en mi vida. Ella me ha dado toda una vida de felicidad.

A mi Padre Ángel Manuel Zárate García, de quien he aprendido a ser integro, decidir con firmeza y ser perseverante. Le agradezco por apoyarme constantemente, en lo económico y en lo moral. *“Es un hombre sabio el que conoce a su propio hijo”* William Shakespeare.

A mi hermana Vianey del Rosario Zárate García, ella es la pincelada de energía y ocurrencias, que le dan a las pinturas de esta vida esa alegría. Sin duda alguna su juventud siempre trae los mejores recuerdos de la mía día a día, pero por sobre todo su buen ánimo es mi razón diaria, para dar a los obstáculos buena cara sin darme por vencido.

A mi tío el Ing. Alfonso Pérez Morales, quien me ha enseñado que por más difícil y duro que sea un viaje, nuestro coraje y dedicación nos harán llegar a nuestro destino porque es lo que realmente importa.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los millones de mexicanos (as) que con el pago de sus impuestos, mediante el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), hacen posible la fluctuación de los recursos financieros necesarios. Haciendo posible la producción de nuevo conocimiento científico.

A mi familia por haberme acompañado de manera continua, en las buenas y en las malas hasta el día de hoy, a pesar de la distancia.

Al Colegio de Postgraduados el cual ha financiado parte de mi formación. Además de brindarme sus instalaciones, en las cuales realice la mayor parte de este trabajo.

Consejero Dr. Fulgencio Alatorre Cobos, quien me brindó su apoyo en diversos aspectos y presento una entera disposición para atender mis inquietudes. Gracias a su valiosa guía, ha sido posible concluir de forma exitosa este trabajo.

Asesora Dra. Eliana Josefina Nogueras Savelli, por su buena disposición, apoyo a la solución de mis dudas y por aportarme las bases necesarias para este trabajo.

Asesora Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera, por su apoyo y paciencia, por aclarar mis dudas puntualmente y por brindarme los conocimientos básicos de anatomía vegetal para efectuar este trabajo.

Agradecimiento a la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados (UME-CP) por las facilidades de equipos otorgadas y al Biol. Simón Morales Rodríguez por su asistencia técnica en la obtención de imágenes.

Al Laboratorio de Anatomía e Histoquímica del Posgrado en Botánica y la Ing. Esthela Torres Torres, técnico de este laboratorio, por darme parte de su tiempo, por estar conmigo enseñándome nuevas técnicas y principios útiles.

A los diferentes profesores que me orientaron durante mi formación, me han provisto de las herramientas necesarias y han dedicado parte de su valioso tiempo. Además de contestar de forma adecuada mis interrogantes.

A mis amigos y compañeros que han hecho de mi estancia en la institución, divertida, agradable y amena.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	III
<b>ABSTRACT</b> .....	IV
<b>LISTADO DE CUADROS</b> .....	XI
<b>LISTADO DE FIGURAS</b> .....	XII
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
<b>2.1. Las orquídeas epífitas</b> .....	4
<b>2.2. Especificidad de forófitos</b> .....	5
<b>2.3. La corteza: definición</b> .....	10
<b>2.4. Propiedades físicas de la corteza que influyen en la preferencia del forófito</b> .....	13
<b>2.4.1. Rugosidad</b> .....	13
<b>2.3.2. Estabilidad de la corteza</b> .....	18
<b>2.3.3. Capacidad de absorción de agua y retención de humedad</b> .....	19
<b>2.4. Las raíces de las orquídeas</b> .....	20
<b>2.4.1. Anatomía general de la raíz en las orquídeas</b> .....	22
<b>2.5. Microscopía electrónica de barrido: una herramienta para estudiar la microestructura</b> .....	25
<b>2.6. Lignificación de las paredes celulares</b> .....	26
<b>2.5.1. Identificación de lignina mediante fluoroglucinol-HCL y luz ultravioleta</b> .....	27
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	30
<b>3.1 Objetivo general</b> .....	30
<b>3.2 Objetivos particulares</b> .....	30
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	30

<b>4.1 Hipótesis general .....</b>	<b>30</b>
<b>V. MATERIAES Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1 Área de estudio .....</b>	<b>31</b>
<b>5.2 Muestreo en campo .....</b>	<b>34</b>
<b>5.2.1 Distribución espacial y selección de la orientación cardinal en orquídeas epífitas .....</b>	<b>35</b>
<b>5.3 Topografía y clasificación de la corteza de forófitos.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1.1 Rugosidad .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1.2 Estabilidad de la corteza .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1.3 Capacidad de retención de humedad .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1.4 Análisis de porosidad de la corteza.....</b>	<b>41</b>
<b>5.4. Interacción raíz- corteza .....</b>	<b>42</b>
<b>5.4.1. Visualización de la morfología de la raíz mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) .....</b>	<b>44</b>
<b>5.4.2 Análisis histológicos .....</b>	<b>45</b>
<b>5.4.2.1 Tinción de azul de Toluidina.....</b>	<b>46</b>
<b>5.4.2.2. Tinción de lignina .....</b>	<b>47</b>
<b>5.4.2.3. Microscopía Laser de Barrido Confocal (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM) .....</b>	<b>48</b>
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>50</b>
<b>6.1. Composición vegetal de forófitos y orquídeas epífitas.....</b>	<b>50</b>
<b>6.1.1 Similitud de especies .....</b>	<b>55</b>
<b>6.1.1 Especificidad de forófitos en la zona de estudio.....</b>	<b>56</b>
<b>6.2. Distribución circular de orquídeas.....</b>	<b>59</b>
<b>6.3. Morfometría de hospederos y punto de colonización inicial de orquídeas ..</b>	<b>61</b>
<b>6.4. Propiedades físicas de la corteza de los forófitos.....</b>	<b>63</b>

6.4.1. Tasa de exfoliación de la corteza .....	63
6.4.2. Rugosidad .....	65
6.4.3 Capacidad de absorción y retención de agua.....	69
6.5 Dinámica de adhesión de la raíz a la corteza .....	75
6.5.1 Morfología y anatomía de la raíz durante el crecimiento .....	75
6.5.2 Crecimiento secundario de la raíz durante el proceso de adhesión .....	78
6.5.3 Acumulación ectópica de lignina en la zona de interacción raíz-corteza. .....	79
6.5.4 Cambios de las paredes celulares próximas a la zona de adhesión .....	84
6.5.5 Morfología de la zona de contacto .....	87
VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	89
7.1 Conclusiones .....	89
7.2 Perspectivas.....	90
VIII. LITERATURA CITADA .....	91

## LISTADO DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Trabajos que sustentan la especificidad hacia forófitos en particular. ....	7
<b>Cuadro 2.</b> Trabajos publicados sobre la rugosidad de la corteza y su influencia en preferencia sobre los forófitos. ....	15
<b>Cuadro 3.</b> Metodología para el procesamiento de la corteza para MEB. ....	37
<b>Cuadro 4.</b> Procesamiento de tejido fresco de raíces para su observación en MEB. ....	44
<b>Cuadro 5.</b> Procedimiento para la observación de cortes histológicos en microscopio compuesto y microestereoscopio. ....	45
<b>Cuadro 6.</b> Metodología para la observación de muestras mediante la tinción de Azul de Toluidina O. ....	47
<b>Cuadro 7.</b> Metodología para la observación de lignina en muestras de raíz mediante la tinción de floroglucinol -HCl. ....	48
<b>Cuadro 8.</b> Epifitas presente por tipo de vegetación estudiado y los principales forófitos en las cuales se encuentran establecidas. ....	53

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Segmento transversal de un tallo del árbol .....	12
<b>Figura 2.</b> Clasificación de la rugosidad de la corteza de acuerdo a la textura propuesta por Coder .....	17
<b>Figura 3.</b> Las raíces en orquídeas epifitas.....	21
<b>Figura 4.</b> Anatomía transversal de una raíz de orquídea.....	24
<b>Figura 5.</b> Principales constituyentes de la pared celular.....	26
<b>Figura 6.</b> Tinción con fluoroglucinol en corte transversal de entrenudos basales de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. ....	28
<b>Figura 7.</b> Zona de estudio.....	33
<b>Figura 8.</b> Parcelas muestreadas en las dos diferentes regiones de estudio.....	34
<b>Figura 9.</b> Protocolo para el cálculo del Índice de fisuración (IF) en cortezas usando microscopía de luz y manejo de imágenes mediante software de acceso gratuito. ....	39
<b>Figura 10.</b> Desarrollo radical de <i>Encyclia alata</i> (Bateman) Schltr.....	43
<b>Figura 11.</b> Caracterización las poblaciones de orquídeas y forófitos en selvas tropicales del sureste mexicano .....	52
<b>Figura 12.</b> Apariencia floral de siete especies de orquídeas presentes en la selva mediana subperenifolia (BRDC) y la selva baja inundable (RDBP) de Campeche.....	54
<b>Figura 13.</b> Distribución de las especies de orquídeas sobre los forófitos.....	58
<b>Figura 14.</b> Distribución cardinal de las orquídeas sobre el tronco de los forófitos en ambas regiones.....	60

<b>Figura 15.</b> Morfometría de los forófitos.....	62
<b>Figura 16.</b> Tasa corteza no exfoliada (estabilidad de la corteza) en forófitos presentes de la selva mediana subperenifolia (BRDC) y la selva baja inundable (RDBP) de Campeche.....	64
<b>Figura 17.</b> Rugosidad de la corteza del forófito con Microscopía Electrónica de Barrido y clasificación de acuerdo a la topología propuesta por Coder (2014).....	66
<b>Figura 18.</b> Frecuencia orquidal en los forófitos analizados.....	67
<b>Figura 19.</b> Índice de fisuras.....	69
<b>Figura 20.</b> Micro relieve de la corteza y la humedad en la corteza.....	72
<b>Figura 21.</b> Porosidad de la corteza y la especificidad hacia los forófitos.....	74
<b>Figura 22.</b> Desarrollo de la raíz de <i>Encyclia alata</i> (Bateman) Schltr y la interacción con la corteza de <i>Gymnopodium floribundum</i> Rolfe.....	77
<b>Figura 23.</b> Tinción con azul de Toluidina de las secciones transversales de raíz de <i>Encyclia alata</i> (Bateman) Schltr.....	78
<b>Figura 24.</b> Histoquímica de lignina con floroglucinol-HCl en cortes transversales de raíz de <i>Encyclia alata</i> (Bateman) Schltr.....	81
<b>Figura 25.</b> Autofluorescencia de lignina en cortes transversales de <i>Encyclia alata</i> (Bateman) Schltr.....	83
<b>Figura 26.</b> Engrosamiento de las paredes del velamen en raíz de <i>Encyclia alata</i> (Bateman) Schltr.....	85
<b>Figura 27.</b> Revestimiento de las paredes y las estrías en las células próximas a la zona de contacto.....	86

**Figura 28.** Estructura de la zona de contacto entre *Encyclia alata* (Bateman) Schltr y  
*Gymnopodium floribundum* Rolfe ..... 88

## I. INTRODUCCIÓN

Las interacciones planta-planta son importantes para comprender ampliamente, la forma en que se mantiene la diversidad biológica en los ecosistemas (López-Villalobos *et al.*, 2008). Se sabe que cerca del 9 % del total de especies de plantas vasculares (aproximadamente 30,000 especies), mantienen interacciones mecánicamente-dependientes con otras especies. En este grupo de plantas encontramos a las orquídeas epifitas, que además de establecer relaciones con sus árboles hospederos, también se asocian con otros organismos como algas, cianobacterias y líquenes y hongos micorrízicos. Esto permite considerarlas como organismos del reino vegetal ampliamente avanzados en términos de evolución (Wagner *et al.*, 2015).

La abundancia en las orquídeas del neotrópico, comprende un número reducido y mensurable de individuos (Pérez *et al.*, 2017). Esta distribución ecológica es notoria en las epifitas, debido a que se asocian formando parches o por lo general mantienen una distribución continua. Las orquídeas epifitas dependen del árbol hospedero en el cual se establecen. Esta interacción ha generado interés por conocer los factores que influyen en la especificidad hacia forófitos en particular. Comprender las características del forófito podría explicar más a fondo las asociaciones mutualistas; además brindaría información útil para los programas de conservación y restauración ecológica. (Gowland *et al.*, 2011; Rasmussen, *et al.*, 2015).

Las características físicas o químicas del forófito pueden ser inherentes y constituyen marcas distintivas entre las diferentes especies de árboles. Estas características pueden determinar la asociación árbol-epífita y repercuten en los patrones de distribución de dichas especies vegetales (Timisina *et al.*, 2016; Mujica *et al.*, 2010).

Los elementos físicos de la corteza del forófito como rugosidad, densidad y capacidad de retención de agua son considerados los principales factores que pueden limitar el establecimiento y la distribución de las especies epífitas. Sin embargo, no es completamente conocido cómo estos factores influyen sobre la preferencia o identidad del árbol como forófito, ni sus efectos sobre la estructura y dinámica de los conjuntos de epífitas. (Wagner *et al.*, 2015; Adhiraki y Fischer, 2012; Einzman *et al.*, 2015).

Las orquídeas crecen en una matriz tridimensional en la corteza, por ello la composición de la corteza o ritidoma es un elemento importante y ha sido objeto de diversos estudios. Las raíces de las epífitas interactúan directamente con el forófito mediante la relación que ocurre entre el velamen y la corteza (García- González *et al.*, 2016). El velamen puede contener suberina y engrosamientos lignificados en las paredes celulares. Estos engrosamientos ocurren como una respuesta a condiciones ambientales adversas como temperatura y disponibilidad de agua. Otras de las funciones del velamen están relacionadas con la protección mecánica de los tejidos internos al reducir la transpiración y evitar la radiación infrarroja directa. Singularmente, el velamen también constituye una reserva de agua que evita el colapso celular durante la deshidratación y participa en el intercambio de oxígeno y CO<sub>2</sub>. (Benzing, 1987; Olivera y Sajo, 1999; Tsutsumi y Kato, 2006).

En este trabajo se buscó contribuir al entendimiento de cómo las orquídeas seleccionan a sus árboles hospederos, de acuerdo con la corriente vigente más ampliamente aceptada sobre especificidad de forófitos. Además, se estudiaron las características físicas de la corteza de los forófitos mediante metodologías más robustas, y por primera vez se analizó la relación entre estos parámetros para determinar la preferencia de las

orquídeas hacia ciertas especies de árboles hospederos. Durante este proceso desarrollamos un nuevo método para determinar el grado de fisuración de la corteza, el cual usa herramientas de microscopía de luz y softwares de acceso gratuito.

La segunda parte, de esta investigación consistió en describir la dinámica de diferenciación morfológica que ocurre en el velamen de las raíces de Orchidaceae, usando como modelo *Encyclia alata* (Bateman) Schltr. Con el apoyo de la microscopía electrónica de barrido e histología se caracterizó morfológica y celularmente el desarrollo de la raíz durante su establecimiento sobre la corteza del forófito *Gymnopodium floribundum* Rolfe. Los resultados muestran que ocurre un engrosamiento progresivo de las paredes celulares del velamen conforme ocurre el crecimiento de la raíz sobre la corteza. Este engrosamiento está asociado con la acumulación de lignina en la pared celular.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

Las orquídeas han capturado la imaginación del mundo durante cientos de años (Albert y Carretero-Paulet, 2014). Estas plantas pertenecen a una de las familias botánicas más grande del reino vegetal: Orchidaceae, la cual agrupa aproximadamente 600 géneros e incluye en su totalidad cerca de 35,000 especies distribuidas en el mundo y representan aproximadamente el 10% de todas las angiospermas (Hadi *et al.*, 2015). Las orquídeas se distribuyen en todos los continentes con vegetación, inclusive en islas subantárticas. Esta familia prospera en intervalos latitudinales que son más amplios en comparación con aquellos reportados para el resto de las plantas, ocupando una amplia gama de formas crecimiento: epífitas, terrestres e incluso subterráneas (Gaskett y Gallagher, 2018).

### **2.1. Las orquídeas epífitas**

La mayoría de las especies tropicales y subtropicales de orquídeas presentan formas de vida epífita vascular, existiendo una mayor diversidad en la zona del Neotrópico en comparación con cualquier otra región tropical del mundo (Arditti, 1996). Aproximadamente del 9% de las plantas vasculares (cerca de 30,000 especies) son dependientes mecánicamente de otras plantas, mientras que el 91 % restante son independientes; en la familia Orchidaceae al menos el 69 % de las plantas que la componen son epífitas, siendo elementos importantes de los ecosistemas (Zotz, 2013).

Las distribuciones de orquídeas y sus características propias se ven influenciadas por las diversas relaciones existentes con otras especies, ocasionalmente éstas pueden ser íntimas y algunas otras veces son obligadas. Por ejemplo, las orquídeas dependen de

los hongos micorrízicos para obtener diferentes nutrientes, especialmente en etapa de plántulas (Rasmussen y Rasmussen, 2009). Otro caso destacado lo representan los árboles hospederos o “forófitos” en los cuales crecen las epifitas. Sus hendiduras o huecos ofrecen a éstas sitios de fácil colonización, favoreciendo su establecimiento sobre ellos. Por esto, la identidad del forófito es un factor biótico importante que afecta el establecimiento de las comunidades de epifitas. La corteza es uno de los rasgos que definen a un forófito. Durante mucho tiempo se ha propuesto que las propiedades mecánicas, topología, arquitectura y decoraciones de la corteza de los forófitos pueden regir el grado de preferencia de la epífita por el huésped (Einzmann *et al.*, 2015; Barretta-dos-Santos *et al.*, 2015) y que esto tiene implicaciones en los patrones de distribución de las orquídeas (Davis *et al.*, 2015; Jacquemyn *et al.*, 2015).

## **2.2. Especificidad de forófitos**

Las orquídeas epifitas utilizan árboles hospederos de naturaleza leñosa (forófito) para crecer sobre él sin provocarles daños físicos. El forófito es utilizado como medio de anclaje del cual obtienen humedad y nutrientes que son arrastrados por el agua pluvial y el polvo principalmente (Tremblay, 1998).

Los conjuntos epifitas-forófito proporcionan un sistema extraordinario para estudiar a detalle las interacciones específicas que existen entre las especies vegetales y sus respectivos forófitos. El sistema proporciona información valiosa sobre cómo es facilitado o es limitado el asentamiento y la reproducción de las especies de orquídeas epifitas. A pesar de que la sobrevivencia de la epífita no depende del sistema vascular del árbol hospedero, pues existe separación en las vasculaturas de ambas especies, se ha reportado que las orquídeas epífitas pueden mostrar cierta preferencia durante la

selección de sus forófitos (Wagner *et al.*, 2015). El Cuadro 1 resume una serie de estudios realizados en diferentes ecosistemas donde la distribución de orquídeas y la frecuencia de forófitos fueron determinadas. Los resultados muestran que la especificidad o preferencia estricta es un evento poco común, pues usualmente una orquídea puede utilizar más de una especie como árbol hospedero. Sin embargo, la limitación de los forófitos existe y se entiende como una concentración de epífitas sobre una pequeña cantidad de forófitos, resultado de los factores limitantes en las comunidades (Benzing, 1990; Vergara-Torres *et al.*, 2010).

**Cuadro 1.** Trabajos que sustentan la especificidad hacia forófitos en particular.

Autor	Ecosistema	Principales orquídeas de estudio	Principales forófitos
Díaz, 2000	Bosque lluvioso tropical	<i>Scaphyglottis behrii</i> Hemsl. <i>Dichaea panamensis</i> Lindley <i>Maxillaria neglecta</i> (Schltr.) L.O. Wms. <i>Sobralia fragans</i> Lindl	<i>Pentaclethra</i> spp. <i>Apeiba</i> spp. <i>Carapa</i> spp. <i>Tetragastris</i> spp
Bergstrom y Carter, 2008	Bosque perenne	<i>Epidendrum magnoliae</i> Muhl.	<i>Magnolia grandiflora</i> L. <i>Quercus virginiana</i> Mill. <i>Liquidambar styraciflua</i> L.
Santa-Jiménez et al., 2009	Bosque húmedo premontano	<i>Cattleya quadricolor</i> Lindl. <i>Scaphyglottis longicaulis</i> S. Watson <i>Maxillaria acuminata</i> Lindl. <i>Stelis argentata</i> Lindl.	<i>Guarea gigantea</i> Triana & Planch <i>Clarisia biflora</i> Ruiz & Pav. <i>Pseudolmedia rigida</i> (Klotzsch & H. Karst.) Cuatrec. <i>Sorocea trophoides</i> W.C. Burger <i>Anacardium excelsum</i> (Bertero & Balb. ex Kunth) Skeels
Mujica et al., 2010	Bosque semideciduo	<i>Dendrophylax lindenii</i> (Lindl.) Benth. ex Rolfe	<i>Comocladia dentata</i> Jacq. <i>Diospyros crassinervis</i> (Krug & Urb.) Standl. <i>Cedrela odorata</i> L.
García-González y Damon, 2013	Cafetal	<i>Telipogon helleri</i> (L.O. Williams) N.H. Williams & Dressler	<i>Inga micheliana</i> Harms <i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd. <i>Trema micrantha</i> Blume <i>Citrus</i> sp.

			<i>Vernonia deppeana</i> Less.
Orta y López, 2013	Bosque mesófilo semideciduo	<i>Epidendrum rigidum</i> Jacq. <i>Epidendrum nocturnum</i> Jacq. <i>Prosthechea boothiana</i> (Lindl.) W.E. Higgins <i>Polystachya concreta</i> (Jacq.) Garay & H.R. Sweet <i>Prosthechea cochleata</i> (L.) W.E. Higgins <i>Leochilus labiatus</i> (Sw.) Kuntze <i>Encyclia fucata</i> (Lindl.) Britton & Millsp.	<i>Roystonea regia</i> (Kunth) O.F Cook <i>Samanea saman</i> Jacq. Merrill.
Morales- Hernández <i>et al.</i> , 2016	Bosque de coníferas	<i>Pollardia linkiana</i> (Klotzsch) Withner & P.A. Harding <i>Dichaea squarrosa</i> Lindl. <i>Stanhopea hernandezii</i> (Kunth) Schltr. <i>Trichocentrum pachyphyllum</i> (Hook.) R. Jiménez & Carnevali <i>E. adenocaula</i>	<i>Quercus</i> spp. <i>Myrcianthes fragrans</i> (Sw.) McVaugh <i>Fraxinus uhdei</i> (Wenz.) Lingelsh. <i>Acacia farnesiana</i> Wall.

Timsina <i>et al.</i> , 2016	Bosque tropical	<i>Eria paniculata</i> Lindl. <i>C. prolifera</i> <i>Aerides multiflora</i> Roxb. <i>Vanda tessellata</i> Hook.G. <i>inconspicuus</i> <i>Bulbophyllum</i> <i>careyanum</i> Spreng. <i>Oberonia emarginata</i> King & Pantl.O. <i>Thunia alba</i> (Lindl.) Rchb. f.	<i>Quercus incana</i> W. Bartram <i>Quercus glauca</i> Thunb. <i>Lyonia ovalifolia</i> (Wall.) Drude <i>Q. glauca</i> <i>Engelhardia spicata</i> Lesch. ex Blume <i>E. spicata</i>
Adhikari <i>et al.</i> , 2017	Bosque subtropical	<i>Coelogyne nitida</i> (Wall. ex D. Don) Lindl. <i>Asplenium</i> <i>scandicinum</i> Kaulf. <i>Bulbophyllum</i> <i>leopardinum</i> (Wall.) Lindl. <i>Vittaria elongata</i> Sw. <i>V. elongata</i>	<i>Quercus lanata</i> Sm. <i>Schima wallichii</i> Choisy
Hernández-Pérez <i>et al.</i> , 2018	Bosque de niebla de montaña	<i>Rhynchosstele</i> <i>maculata</i> (Lex.) Soto Arenas & Salazar <i>Artorima erubescens</i> (Lindl.) Dressler & G.E. Pollard <i>Maxillaria rhombea</i> Lindl. <i>Prosthechea hastata</i> (Lindl.) W.E. Higgins	<i>Arbutus xalapensis</i> Kunth <i>Chiranthodendron</i> <i>pentadactylon</i> Larreat. <i>Quercus laurina</i> Bonpl.

---

Los rasgos de los forófitos desempeñan un papel crucial sobre la distribución de las epífitas en ambientes determinados y sobre la especificidad por forófitos en particular. Debido a la combinación de diferentes patrones fenológicos, rasgos arquitectónicos y características de la corteza que ofrece cada árbol hospedero puede extender los límites de hábitats para las epífitas (Zotz y Schultz, 2008; Benavides *et al.*, 2011).

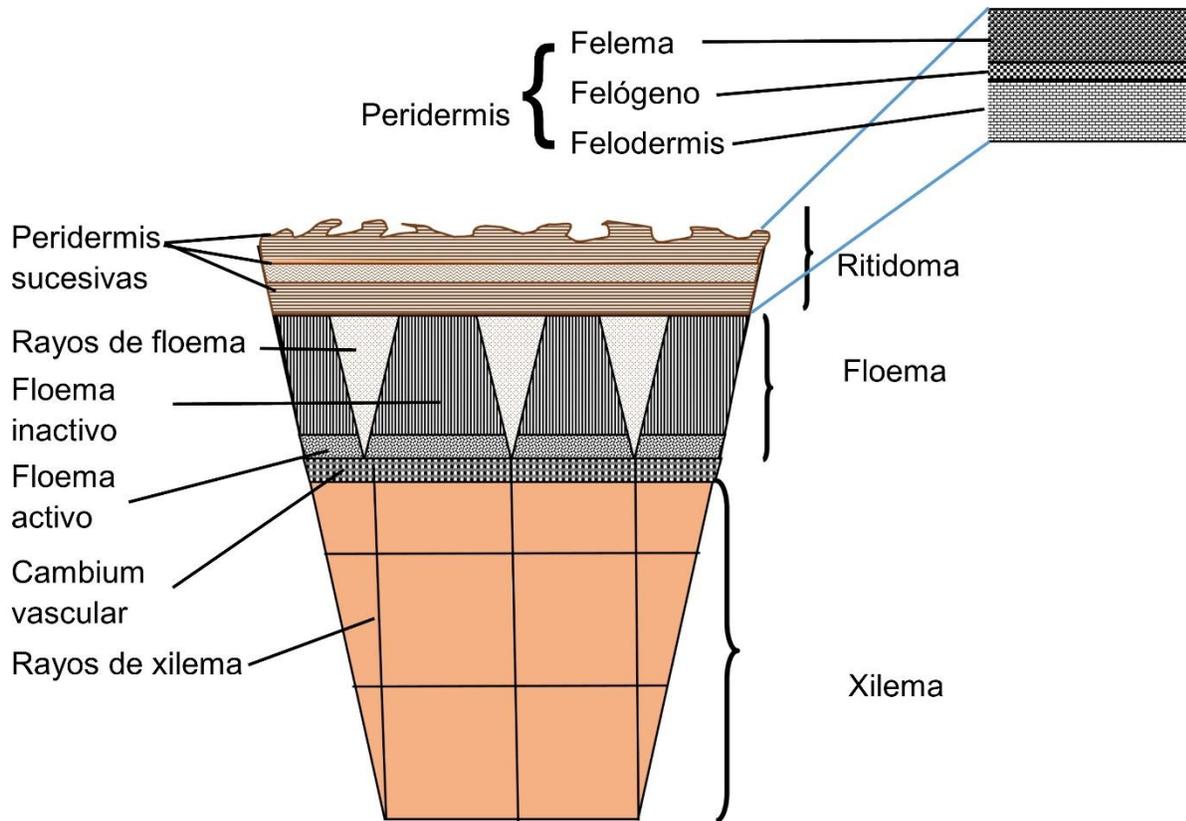
Los factores ambientales también son responsables de provocar cambios en las características físicas de los hospederos; por ejemplo, en la corteza externa del árbol por estar expuesta a los efectos de la intemperie se puede producir fisuras, exfoliación de la corteza, cambios en su textura y color de su superficie (Withmore, 1962).

### **2.3. La corteza: definición**

La corteza primaria se deriva directamente del meristemo apical del vástago y rodea al tejido vascular joven, puede componerse de parénquima, colénquima y, eventualmente, también de esclerénquima. Por otro lado, la corteza secundaria se origina a partir del meristemo secundario llamado cambium vascular y comprende el tejido que forma el cambium vascular hacia afuera (floema secundario) (Esau, 1959).

La corteza externa se compone de varios estratos de tejidos (como son xilema, floema, por mencionar algunos); uno de estos estratos se conoce colectivamente como peridermis y los otros son estratos de células muertas hacia el exterior (ritidoma) (Corder, 2014). El peridermis comprende el felema y felodermis y ambos derivan del meristemo secundario de una sola capa denominado felógeno. En la mayoría de las especies arbóreas, el felógeno tiene una vida útil corta de unos pocos años y se renueva

periódicamente en las regiones internas del floema (Beck, 2005; Lev- Yadun, 2011; Kalil *et al.*, 2017). El ritidoma por su parte está constituido por estratos de peridermis sucesivas entremezcladas con estratos de floema muerto (Figura 1). Estos estratos externos aíslan al árbol para evitar su desecación y protegen la corteza interior de la infestación por insectos y patógenos que desean acceder al tejido vivo (Cardoso *et al.*, 2007; Coder, 2009; Sen *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Segmento transversal de un tallo del árbol. Se muestran los estratos de los diferentes tejidos que lo componen del exterior hasta el interior (Coder, 2014).

La observación detallada de la corteza de los árboles hospederos muestra la existencia de un microrrelieve particularmente diferente en cada especie, o incluso entre individuos. La corteza posee una micro-topografía, composición y textura variable, y puede funcionar como hábitat para micro y macroorganismos durante todo su ciclo de vida o solamente durante algunas de sus fases (MacFarlane y Luo, 2009).

## **2.4. Propiedades físicas de la corteza que influyen en la preferencia del forófito**

### **2.4.1. Rugosidad**

La rugosidad es uno de los rasgos micro-topográficos de la corteza que pueden afectar la distribución espacial de las epífitas que habitan en los troncos de los forófitos en bosques tropicales (MacFarlane y Luo, 2009).

La rugosidad ha sido considerada como un elemento importante en la protección de semillas de epífitas durante su germinación. Los árboles de corteza rugosa tienen la capacidad de soportar mayores cantidades de epífitas sobre los troncos y sus ramas (Laube y Zotz, 2006; Benavides *et al.*, 2011; Wyse y Burn, 2011). A diferencia de los árboles de corteza lisa, éstos presentan una mejor "superficie de sujeción", disponible para las raíces de las epífitas. Además, la presencia de grandes cantidades de fisuras en la corteza permite la acumulación de mayores estratos de "suelo de dosel" que la disponibilidad de nutrientes en la superficie del tronco. También la rugosidad mejora el flujo del agua pluvial que llega a las raíces, considerándose un factor influyente en la preferencia epífita-forófito (Callaway *et al.*, 2002; Cascante-Marín *et al.*, 2009; Wagner *et al.*, 2015).

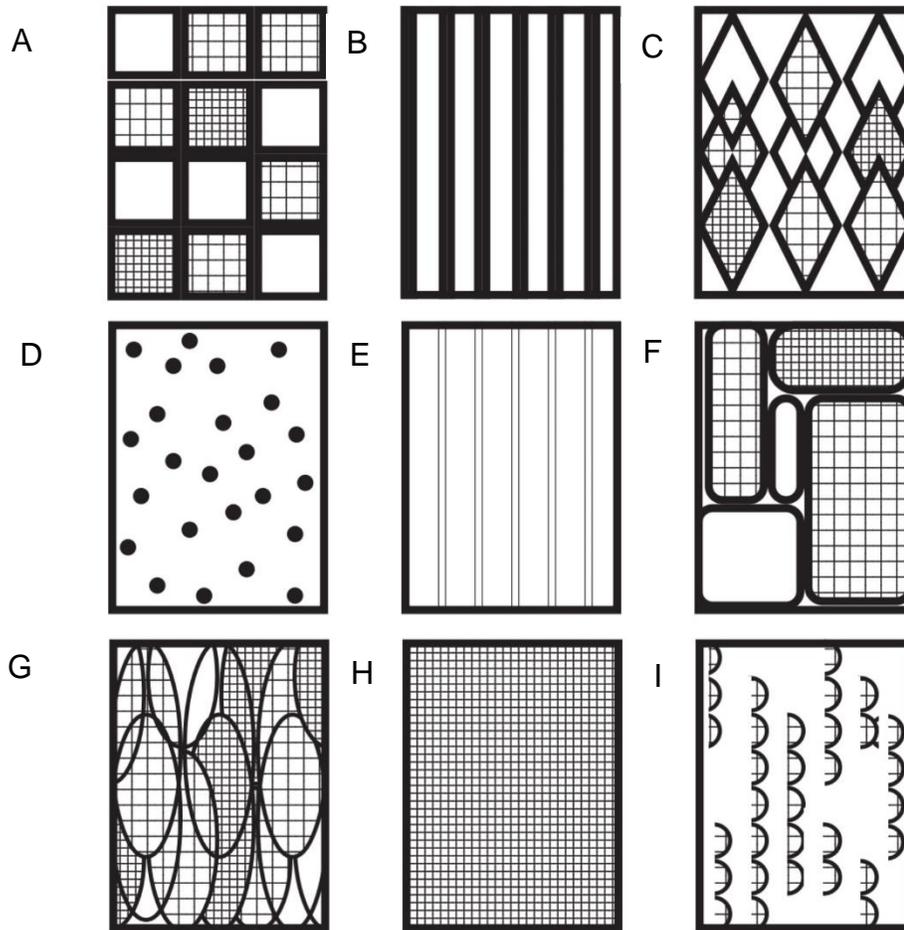
Los términos rugosidad y área fisurada aún son empleados de manera indistinta en la mayoría de las publicaciones, además de describir frecuentemente la corteza de forma cualitativa ej.: “escamosa”, “en bloques”, “fisurada” o simplemente “lisa” (Cuadro 2). Por otro lado los métodos cuantitativos reportados carecen de precisión debido a la subjetividad de las técnicas empleadas para la toma de datos (Zitynska, *et al.*, 2011; Adhiraki y Fischer, 2012; Einzman *et al.*, 2015; Davis *et al.*, 2015). (MacFarlane y Luo, 2009). El método más común para calcular el índice de rugosidad consiste en: insertar un hilo de algodón de longitud conocida en un área determinada de la corteza. La longitud insertada entre la cantidad de hilo total resulta en un índice con baja precisión (Callaway, 2002).

Sioma *et al.*, (2018) reportó una metodología para calcular el área rugosa de la corteza en los troncos completos del árbol, usando un software que transforma imágenes digitales 2D obtenidas por escaneo laser en imágenes con estructura 3D. Los mapas 3D se cuantifican mediante algoritmos (Othmani *et al.*, 2013) resultando en un índice con mayor exactitud para las características macromorfológicas de la corteza. Sin embargo, este método no ofrece la posibilidad de analizar detalles finos en la micro-arquitectura de la corteza.

**Cuadro 2.** Trabajos publicados sobre la rugosidad de la corteza y su influencia en preferencia sobre los forófitos.

Autor	Plantas de estudio	Cortezas seleccionadas	Método de descripción empleado
Callaway, 2002	Bromelia	<i>Celtis laevigata</i> (Kunth) Spreng <i>Quercus virginiana</i> Mill. <i>Liquidambar styraciflua</i> L.	Índice hilo de algodón
Kersten <i>et al.</i> , 2009	Orquídeas	<i>Ocotea pulchella</i> Mart. <i>Tapirira guianensis</i> Aubl.	Descripción cualitativa
MacFarlane y Luo, 2009	No aplica	<i>Ostrya virginiana</i> (Mill.) K. Kochand <i>Carpinus caroliniana</i> Walter	Propuesta de índice mediante amplitud y profundidad de la corteza
Martins y Marcelli, 2011	Líquenes	<i>Dodonaea viscosa</i> L.	Descripción cualitativa
Orta y López, 2013	Orquídeas	<i>Roystonea regia</i> (Kunth) O.F Cook <i>Samanea saman</i> Jacq. Merrill.	Descripción cualitativa
Zhao <i>et al.</i> , 2015	Orquídeas	<i>Cinnamomum javanicum</i> Blume Bijdr. <i>Castanopsis mekongensis</i> A. Camus <i>Schima wallichii</i> (Candolle) Korthals <i>Betula alnoides</i> Buchanan-Hamilton ex D. Don	Apertura de la fisura
Hernández-Pérez <i>et al.</i> , 2018	Orquídeas	<i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larreat. <i>Quercus laurina</i> Bonpl. <i>Parathesis melanosticta</i> Hemsl. <i>Quercus glabrescens</i> Benth.	Descripción cualitativa

El desarrollo de metodologías robustas para calcular un índice de rugosidad sería una solución para cuantificar la estructura de la corteza. Adicionalmente, es necesario homogeneizar criterios cuando se describe la topología del ritidoma, la cual puede presentar patrones distintivos y variedad de texturas y apariencias. Coder (2014) ofrece una opción para clasificar la textura de la corteza de acuerdo a su apariencia (figura 2). Esta clasificación describe nueve diferentes patrones lo que representa una alternativa para realizar una descripción más precisa de la corteza que la tradicional, que solo menciona fisurada o no fisurada.



**Figura 2.** Clasificación de la rugosidad de la corteza de acuerdo a la textura propuesta por Coder: A) Bloques, B) Fisurado, C) Adiamantado, D) Perforado, E) Lineal, F) En placas, G) Escamoso, H) Liso, I) Exfoliante. (Coder 2014).

### 2.3.2. Estabilidad de la corteza

La estabilidad de la corteza (permanencia de las capas viejas del ritidoma durante un lapso de tiempo en específico) está relacionada con la tasa de exfoliación, que es la velocidad del árbol para eliminar las partes más viejas del ritidoma. La estabilidad de la corteza está también relacionada con la edad, el tamaño y grosor de los árboles (Romberger y Mikola, 1964; William *et al.*, 2007).

La tasa de exfoliación es el resultado de la actividad de la peridermis; los nuevos felógenos surgen como capas discontinuas en forma de curvas con la concavidad hacia el interior, por lo que los estratos se superponen a las externas de forma imbricada. Debido a la manera en que se forma el ritidoma, su exfoliación es el resultado final de este proceso. La tasa de exfoliación es una característica secundaria, que deriva del crecimiento de los árboles, y es considerada como un factor que influye en la distribución de epifitas, debido a que en algunos casos los forófitos pueden cambiar su corteza y con ello liberar el exceso de carga epifita (Granados- Sánchez, 2003; Einzmann *et al.*, 2015; Wagner *et al.*, 2015).

A pesar de la idea sobre la descamación de la corteza y su efecto potencial sobre las epifitas, solo existen dos estudios experimentales que analizan este fenómeno. Callaway *et al.* (2002) estudio el proceso de estabilidad de la corteza sobre la distribución de *Tillandsia usneoides* (L.) L. y *Polypodium polypodioides* (L.) Watt, hallando que los patrones de distribución no son totalmente afectados por este factor, existiendo otros factores que, en conjunto con ello, pueden dar características de preferencia hacia las epifitas. El segundo trabajo realizado por López-Villalobos *et al.* (2008) estudiaron los

forófitos de *Tillandsia paucifolia* Baker, explicando los patrones de distribución de esta especie, en correlación con la tasa de exfoliación de la corteza.

### **2.3.3. Capacidad de absorción de agua y retención de humedad**

Durante la época de lluvia, la humedad en la corteza permanece alta; este suceso propicia que las epífitas alcancen su máximo desarrollo y completen su ciclo de vida antes de la época de sequía o del invierno (Tewari y Tewari *et al.*, 2009). Esto muestra que la corteza funciona como un reservorio de agua pluvial al alcance de la zona radical de las epífitas (Paz-Bermúdez *et al.*, 2000; Levia y Herwitz, 2005; Mehltreter *et al.*, 2005; Valova y Bieleszova 2008).

La capacidad de absorción de agua es el mecanismo físico de la corteza para interceptar el agua de lluvia en su superficie y mantenerla durante un corto periodo de tiempo, lo cual contribuye al mantenimiento del estado hídrico de la corteza. (Larsen *et al.*, 2017). Mientras que la capacidad de retención se refiere al agua que se logra contener después de un periodo de desecamiento. Esta particularidad esta atribuida principalmente a la porosidad del sustrato y las fuerzas físicas para adherir el agua en ellos (Owen, 2008). Estas dos propiedades hídricas dependen de las características propias del tejido y del tamaño de la corteza. El área de la corteza participa en la interceptación del agua de lluvia, y puede variar en función del tamaño del árbol hospedero y de la especie. (Anna y Jaroslaw, 2014). Por ejemplo, los árboles con corteza gruesa interceptan mayor cantidad de agua durante la lluvia y poseen una mayor capacidad de absorción y posible

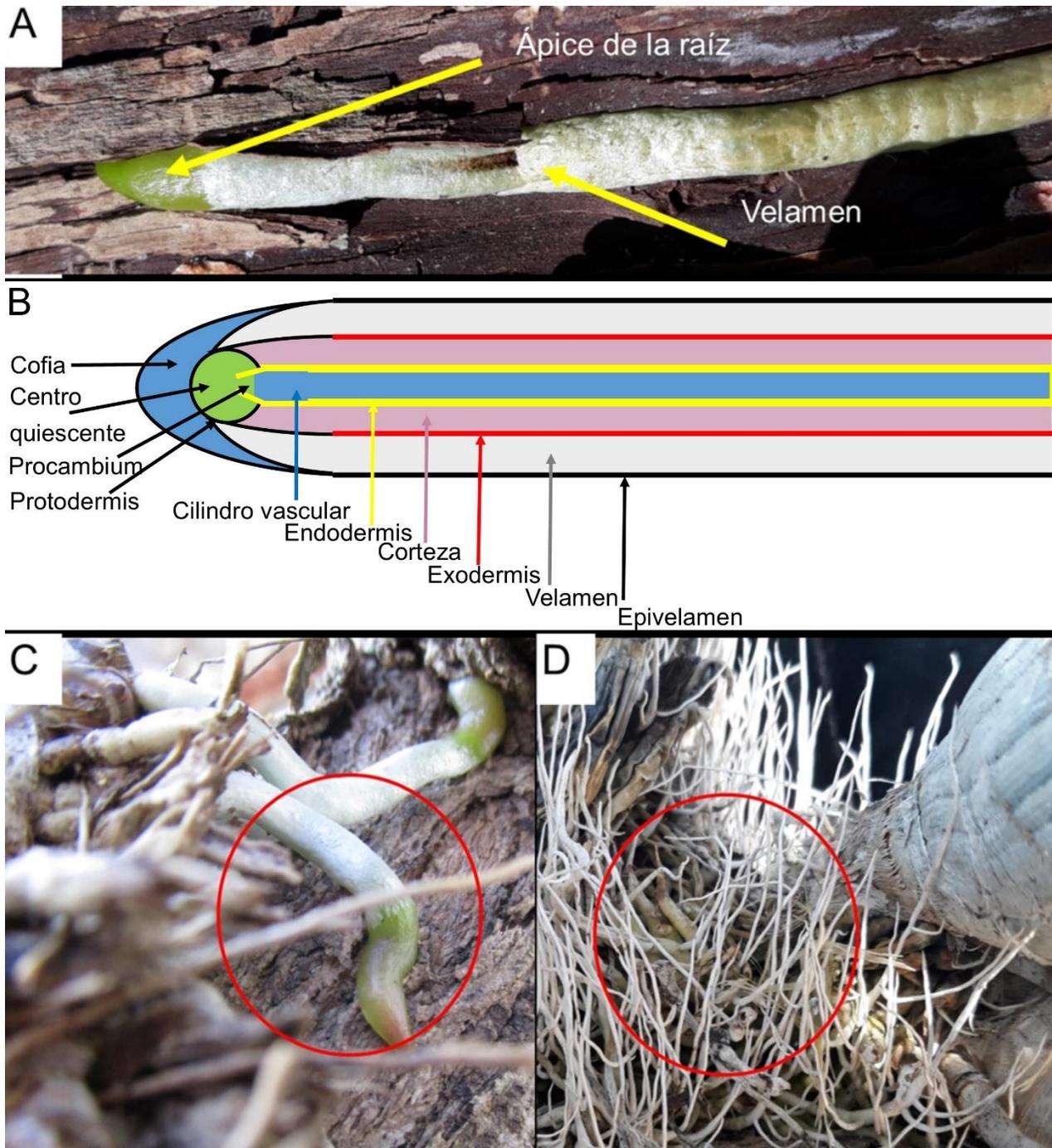
mayor retención de agua en la corteza. Estas diferencias de la hidrología de la corteza afectan la disponibilidad de agua y el transporte de solutos (James *et al.*, 2018).

#### **2.4. Las raíces de las orquídeas**

Las raíces de las plantas son esenciales para proporcionar anclaje, adquirir nutrientes minerales, agua y para sintetizar una gran cantidad de metabolitos. En las orquídeas epífitas, las raíces crecen sobre la superficie de sus forófitos, absorbiendo los nutrimentos disponibles, auxiliados a menudo por hongos micorrízicos (Schmidt, 2014).

Las orquídeas, como la mayoría de las monocotiledóneas, presentan un sistema radical formado por raíces adventicias que se originan en el tallo. En las especies epífitas, las raíces aéreas emergen del rizoma y presentan una coloración gris con un ápice verde y están cubiertos por el velamen (Oliveira y Sajo, 1999) (Figura 3A).

Por su morfología las raíces de orquídeas son clasificadas como fibrosas; su raíz primaria se desarrolla muy poco y rápidamente las raíces secundarias y adventicias la sobrepasan en crecimiento. Esto da origen a un grupo de raíces que tienen aproximadamente las mismas dimensiones (William, 1949). Por su función, las raíces que sirven de anclaje al soporte se denominan raíces adherentes (Figura 3C). En las orquídeas solo unas cuantas raíces tienen la función de adherirse, por lo que el resto son clasificadas como raíces aéreas o adventicias (Figura 3D) (William, 1949).



**Figura 3.** Las raíces en orquídeas epifitas. A) Partes de la raíz, B) Estructura anatómica general de la raíz, C) Raíces adherentes con función de soporte, D) Raíces aéreas o adventicias sin función de soporte.

#### **2.4.1. Anatomía general de la raíz en las orquídeas**

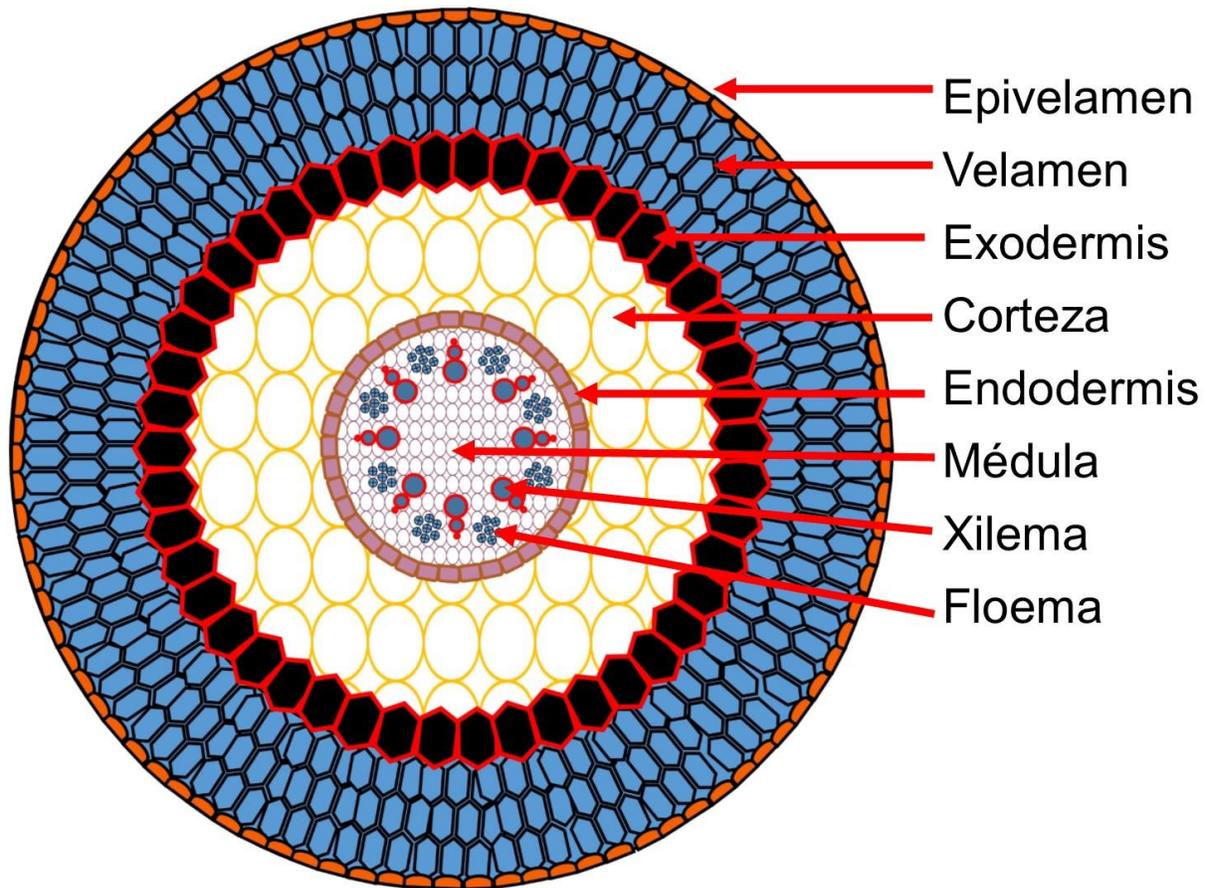
La especialización de las células vegetales ocurre cuando estas adoptan una forma específica y producen tipos de paredes particulares. Esto resulta en una combinación de fuerza, resistencia y plasticidad en las partes en crecimiento de una planta (Alberts *et al.*, 2002).

En las orquídeas el velamen, también referido como velamen radicum, es una estructura morfológica especializada definida como: epidermis múltiple o pluriestratificada que cubre toda la raíz con excepto del ápice, donde se encuentra la zona del meristemo (Engard, 1944). La función del velamen es absorber rápidamente la humedad de las cercanías de la rizosfera, cediéndola a otros tejidos a través del flujo del vástago, durante los períodos de sequía. (Barretta-Dos-Santos *et al.*, 2015). También absorbe los nutrientes de la atmósfera húmeda circundante (Benzing, 1990; Went, 1940; Zotz y Winkler, 2013). Además de la función de absorción de agua, ha sido reportado que el velamen cumple el papel de reducir la pérdida de agua en momentos de baja disponibilidad de ésta y confiere protección mecánica para la raíz (Zotz y Winkler, 2013).

Las orquídeas que crecen en hábitats más secos suelen presentar una velamina (estratos celulares que componen al velamen) más gruesa (Sanford y Adanlawo, 2008). El aumento del tamaño del velamen radicum también aumenta el volumen de retención de agua (Luttge, 1989). La mayoría de las orquídeas son capaces de retener agua durante más de 1 h en el velamen radicum, cuando su radio es más grueso y los conductos de xilema tienen mayor diámetro (Zotz y Winkler, 2013). Gracias a esto las orquídeas epífitas tienen una mayor capacidad para conservar agua y evitar los efectos negativos de la sequía en el funcionamiento de su raíz (Li *et al.*, 2018; Zhang, 2018).

Esto propicia una mejor adaptación a un entorno con radiación solar intensa y un déficit de agua probable mayor (Muthukumar y Shenbagam, 2018).

Anatómicamente, el velamen se ubica externamente a la exodermis (Figura 4) y es un tejido higroscópico formado por estratos de células muertas que constituyen una epidermis múltiple (o pluriestrata) (Oliveira y Sajo, 1999). Estas células se encuentran llenas de aire y constituye la mayor parte de las raíces aéreas de las epífitas. (Zotz y Heitz, 2001). Internamente el velamen está formado por células de parénquima, que pueden presentar diferentes tipos de engrosamientos parietales como son reticuladas, uniformes o phi (paredes celulares radiales) (Waisel *et al.*, 1991; Stern y Judd, 2001; Moreira *et al.*, 2013). La exodermis y la endodermis, la capa más externa e interna de la corteza respectivamente, delimitan el parénquima cortical en las raíces y la existencia de una endodermis. Ambos tejidos funcionan como un límite entre la corteza y el cilindro vascular (Figura 4).



**Figura 4.** Anatomía transversal de una raíz de orquídea. Posiciones de los diversos tejidos que la componen (redibujado de Porembski y Barthlott, 1988).

La exodermis y la endodermis se conforman por células que pueden presentar Banda de Caspary, las cuales se encuentran altamente lignificadas. En la mayoría de los casos estas células se encuentran muertas en la madurez, en otros casos estas células se alternan con células que permanecen vivas (células transportadoras) y que permiten el transporte (Trépanier *et al.*, 2008). La Banda de Caspary actúa como una barrera que controlan el movimiento de iones y otras sustancias a través del apoplasto (Ma y Peterson, 2003). Las células transportadoras poseen la capacidad del movimiento simplástico permiten la absorción de agua y nutrientes y son responsables por tanto de la selectividad de los solutos para ser transportados al cilindro vascular (Trépanier *et al.*, 2008; Joca *et al.*, 2017).

## **2.5. Microscopía electrónica de barrido: una herramienta para estudiar la microestructura**

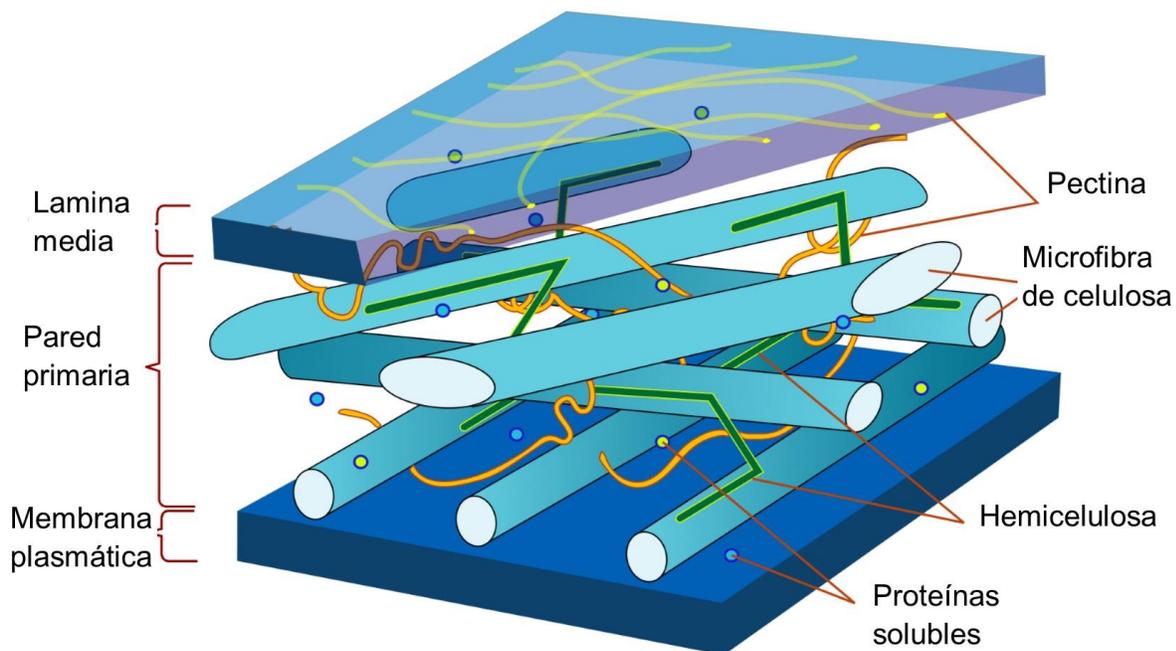
La microscopía electrónica de barrido (MEB) por su elevado poder de resolución (0.3 nm) ha sido una importante herramienta para estudiar la morfología externa de los tejidos de nuestro interés en orquídeas (Renau- Piqueras y Faura, 1994; Pathan, 2008). Además, proporciona información de detalles finos, que no son posibles de obtener mediante el microscopio de luz (Fowke, 1995). A partir del MEB se obtienen imágenes y datos físico-químicos de la superficie de los cuerpos en observación, mediante los electrones proyectados desde un cátodo de tungsteno que atraviesan una columna de alto vacío (Pathan, 2008).

Las muestras orgánicas presentan una elevada constante dieléctrica (aíslan las corrientes eléctricas), por ello es necesario recubrir la muestra con un algún material conductor. Generalmente se utiliza una capa delgada de metal, para prevenir la carga de

la superficie observada y para promover la emisión de electrones secundarios. La forma más común de hacer esto es adherir una fina capa de oro o una aleación de oro-paladio a la muestra mediante evaporación al vacío o recubrimiento por pulverización catódica. De esta forma la muestra se conduce de manera uniforme y proporciona una superficie homogénea para su análisis e imagen (Stephen y John, 2007).

## 2.6. Lignificación de las paredes celulares

Las paredes celulares de las plantas se conforman por fibras de celulosa, éstas refuerzan una matriz de hemicelulosa, lignina y pectina en uno o más estratos (Figura 5). La lignina es el segundo biopolímero más abundante después de la celulosa; al interactuar con otros polisacáridos de la pared aumenta la integridad estructural de la pared celular, y dada su naturaleza química la lignina es responsable que ciertas células sean hidrofóbicas (Boerjan *et al.*, 2003).



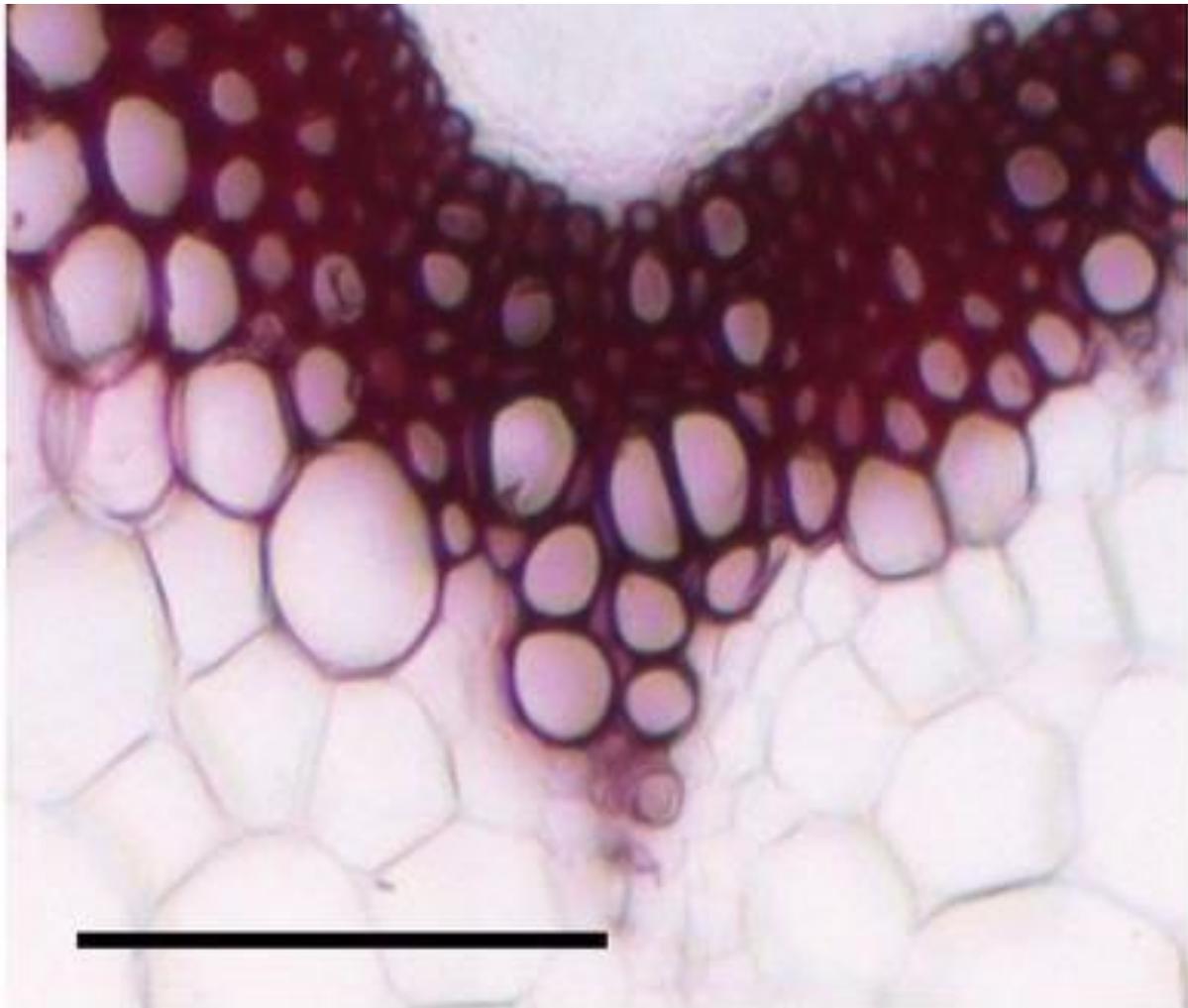
**Figura 5.** Principales constituyentes de la pared celular (Sticklen, 2008).

La lignificación forma parte del proceso de diferenciación celular normal e influye en las funciones de algunos tipos celulares específicos. Sin embargo, los diversos factores bióticos y abióticos pueden desencadenar este proceso, provocando la acumulación de lignina en paredes celulares que comúnmente no presentan esta actividad, a este suceso se le conoce como lignificación ectópica (Barros *et al.*, 2015). Mecánicamente a pesar de que la lignina es más débil que la celulosa, está aporta un refuerzo significativo a cualquier pared celular, generando mayor resistencia a la tracción adicional de 25–75 MPa y 2.5–3.7 GPa en módulo de Young's. (Gibson, 2012).

### **2.5.1. Identificación de lignina mediante fluoroglucinol-HCL y luz ultravioleta**

La lignina se compone principalmente de tres bloques de construcción, los monolignoles: alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol p- coumarílico. La tinción con fluoroglucinol puede proporcionar pistas sobre el grado de cinamaldehídos presentes en los tejidos del xilema, las fibras y las traqueidas. La lignina al ser un polímero carbonado impermeable al agua, permite que este compuesto se mantenga presente en los cortes de parafina, lo cual ayuda a su visualización mediante el microscopio de campo claro.

Una de las técnicas más comunes y sencillas para su detección es la tinción con fluoroglucinol o tinción de Weisner, (Barros *et al.*, 2015), esta produce un color rosa cereza o fucsia característico en el xilema y en las fibras interfasciculares (Figura 6). En estos tejidos están presentes los grupos aldehídos mencionados previamente (Adler, 1997).



**Figura 6.** Tinción con fluoroglucinol en corte transversal de entrenudos basales de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Coloración provocada por la presencia de cinamaldehídos (Barros *et al.*, 2015). Barra= 100 $\mu$ m.

El fluoroglucinol tiñe solo los grupos terminales de cinamaldehído, debido a la interacción del compuesto con los grupos terminales coniferaldehído y sinapaldehído. Por ello es utilizada frecuentemente para teñir las paredes celulares lignificadas, permitiendo diferenciar entre cinnamaldehídos y otros aromáticos (Pradhan y Loqué, 2014; Anderson *et al.*, 2015).

En algunas especies vegetales las paredes celulares de la mayor parte de las plantas emiten fluorescencia como resultado de la excitación con luz. Por lo tanto, el método más simple para visualizar la lignina y otros compuestos aromáticos es emplear la luz ultravioleta (UV) en longitudes de onda que van desde 240 a 320 nm con espectros de emisión de fluorescencia cercanos a 360 nm (Donaldson y Radotic, 2013). La fluorescencia de la lignina bajo la luz UV se ha atribuido a la transferencia de energía no radiactiva existente desde los cromóforos de lignina (Albinson *et al.*, 1999).

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Evaluar los factores físicos de los árboles hospederos de orquídeas y su influencia en el desarrollo radical temprano orquidal que determina el éxito de la asociación árbol-epífita.

#### **3.2 Objetivos particulares**

Identificar los principales forófitos de orquídeas del Estado de Campeche en un zonas naturales poco impactadas por la actividad humana.

Caracterizar los elementos físicos de la corteza de los forófitos identificados que pudiesen tener un papel importante sobre la asociación forófito-orquídea.

Caracterizar la morfología y estructura celular de la raíz de alguna de las orquídeas identificadas en las áreas de estudio, durante los eventos tempranos que conducen al establecimiento sobre el forófito.

### **IV. HIPÓTESIS**

#### **4.1 Hipótesis general**

La distribución de orquídeas en regiones ecológicas del Estado de Campeche está regulada por el grado de preferencia hacia forófitos en específico, lo cual puede estar dado por propiedades intrínsecas del forófito y el desarrollo de la raíz durante etapas iniciales de la asociación orquídea-forófito.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Área de estudio

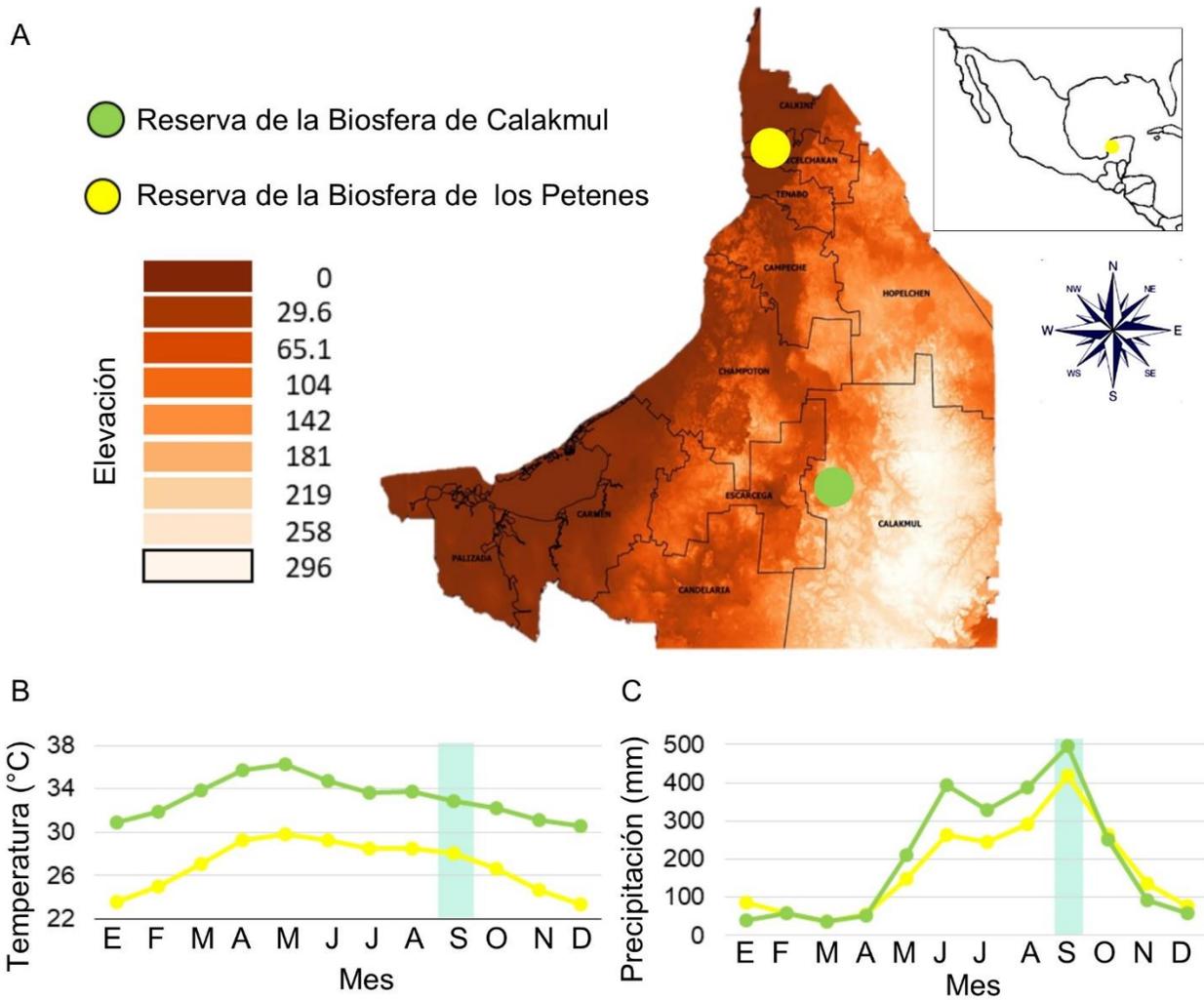
El presente estudio se llevó a cabo en dos diferentes localidades en México: regiones de los Petenes y Calakmul, ubicadas en el estado de Campeche (Figura 7).

La Reserva de la Biosfera de los Petenes (RBLP) cuyo nombre fue adquirido en 1999, cuenta con una extensión de 282,857 ha y posee 12 millas de mar patrimonial. Se distribuye sobre la costa occidente de la península de Yucatán y sobre la costa noroeste Campeche, limitando al norte con la Reserva de la Biosfera de Celestún y al oeste con el Golfo de México, abarcando los estados de Campeche y Yucatán (Rojas-Soto y Bocanegra, 2002).

La RBLP comprende parte de los municipios de Calkiní, Hecelchakan, Tenabo y Campeche. La parte marina está ubicada en la zona costera suroriental del Golfo de México. La RBLP se ubica entre los 20° y 21° N y los 90° 20' y 90° 30' O, con una altitud de 0 a 0.4 msnm. Presenta una precipitación anual de 1,100 mm y una temperatura media de 27 °C (Figura 7B y 7C). La vegetación presente en el área de muestreo para la RBLP, fue selva baja inundable (Villalobos–Zapata y Mendoza, 2010).

La Reserva de la Biosfera Calakmul (RBDC) comprende una superficie total de 723,185 ha, cuenta además con dos zonas núcleo, que en conjunto comprenden un área total de 248,260 ha, y una zona de amortiguamiento de 474,924 ha. La RBDC se localiza al sureste del estado de Campeche, dentro del municipio de Calakmul, limitando al este con el estado de Quintana Roo y al sur con la República de Guatemala. Se ubica entre los 19°15' y 17°45' N y 90°10' y 89°15', con una altitud de 300 msnm. Presenta una

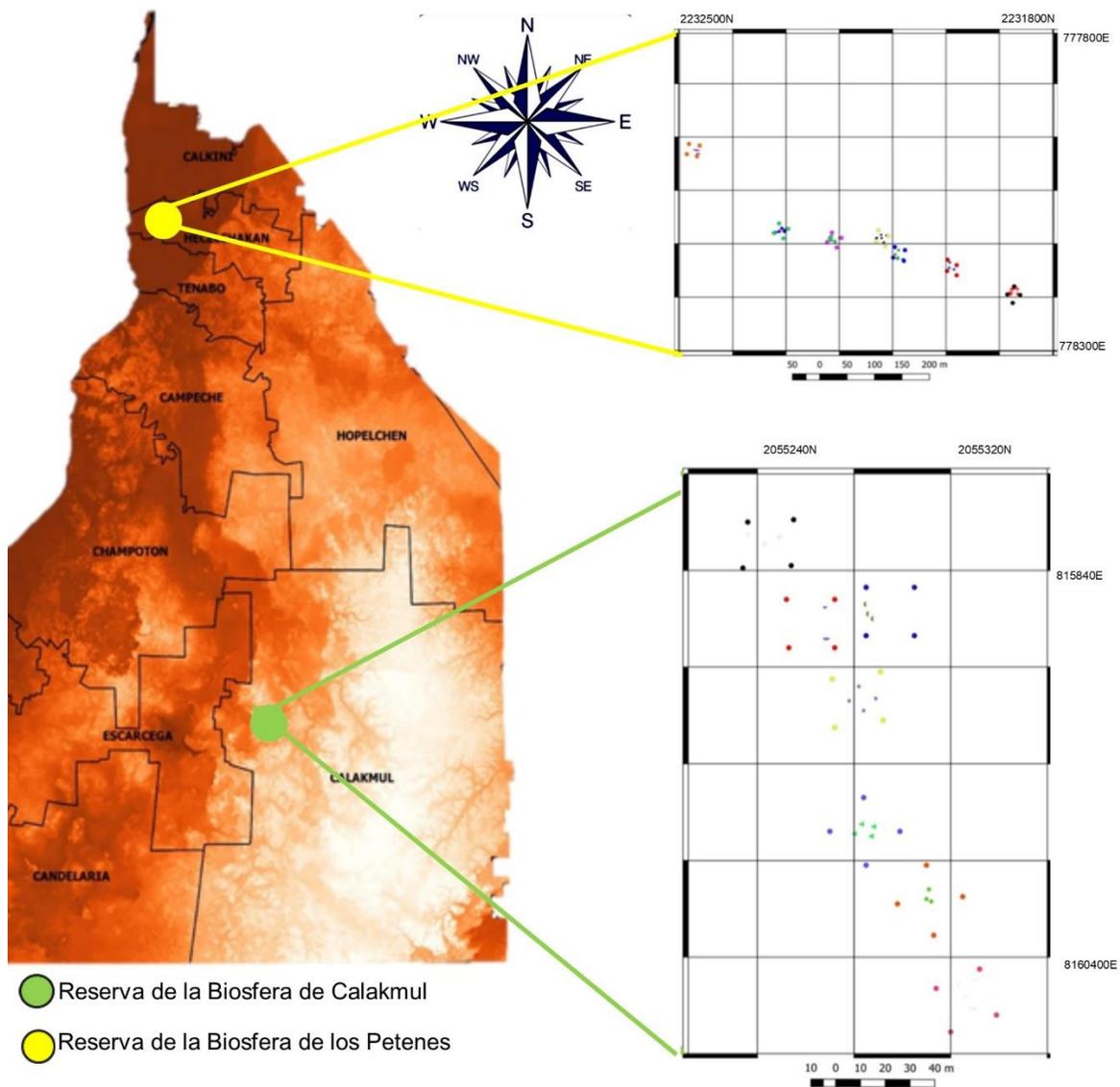
precipitación anual de 1076 mm y una temperatura media de 31°C (Figura 7B y 7C). La RBDC presenta vegetación mediana subperenifolia en la región muestreada (Martínez y Galindo- Leal, 2017).



**Figura 7.** Zona de estudio. A) Altitud de las regiones de estudio, B) Temperatura mensual promedio, C) Precipitación mensual promedio.

## 5.2 Muestreo en campo

Se realizó un muestreo al azar atravesando por diferentes zonas, mediante transectos que varían de acuerdo a la disposición estructural del bosque. El inventario de la vegetación orquidal y sus respectivos forófitos se llevó a cabo en un área de 5,600 m<sup>2</sup> para ambas zonas de estudio (2800 m<sup>2</sup> RBLP y 2800 m<sup>2</sup> RBDC). Se muestrearon 7 parcelas de 20 x 20 m<sup>2</sup>, diferentes para cada región (Figura 8).



**Figura 8.** Parcelas muestreadas en las dos diferentes regiones de estudio.

La información registrada en el diario de campo durante este estudio fue: puntos de georreferenciación (de la parcela, los forófitos y las orquídeas), nombre científico del forófito, diámetro a la altura del pecho (DAP) de los forófitos, cantidad de árboles por parcela, cantidad de forófitos por parcela, nombre científico de las orquídeas, cantidad y especies de orquídeas que se encuentran en cada forófito registrado y altura de la primera orquídea sobre el nivel del suelo. Todos los datos obtenidos fueron vaciados en una base de datos de Excel, con el fin de realizar los estudios pertinentes posteriores.

La identificación taxonómica se llevó a cabo mediante la colecta de muestras vegetales en prensas botánicas. Estas muestras fueron comparadas con el registro fotográfico de las colecciones digitales del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY) y la consulta y revisión de material herborizado con especialistas del herbario (CICY).

Para estimar el nivel de similitud de la composición de especies en ambas regiones selváticas se utilizó el índice de Jaccard ( $J(A, B) = |A \cap B| / |A \cup B|$ ). Donde A son las especies del sitio 1 y B representa a las especies encontradas en el sitio 2 (Chao *et al.*, 2005; Legendre, 2014).

### **5.2.1 Distribución espacial y selección de la orientación cardinal en orquídeas epifitas**

La orientación cardinal o también conocida como distribución circular en epifitas, es uno de los factores ecológicos o demográficos menos conocidos y comprendidos que rigen la dinámica de las poblaciones de orquídeas epifitas (Tremblay y Velázquez, 2009; García-González *et al.*, 2016). Para este análisis empleamos una brújula lensática, la

cual nos permito fijar un eje (en este caso el tronco del forófito) y visualizar el objetivo (la epífita) desde una posición versátil. Cabe mencionar que mediante esta técnica es posible obtener los grados de apertura en los cuales la epífita se establece. Sin embargo, en este estudio sólo se determinó si la epífita estaba establecida en: N, S, E, O NE, NO, SE o SO. La preferencia por cierta orientación cardinal sobre los forófitos se analizó posteriormente mediante una comparación de frecuencias. La altura de la primera epífita se obtuvo midiendo la distancia del suelo a la base de la orquídea con la ayuda de un flexómetro.

### **5.3 Topografía y clasificación de la corteza de forófitos**

Con el fin de obtener una visualización a alta resolución de la microtopografía de la corteza que permitiera la comparación de forma adecuada con las clasificaciones existentes (Callaway, 2002; Gonzalez *et al.*, 2007; Coder, 2014; Zhao *et al.*, 2015) nosotros utilizamos MEB en las instalaciones del CICY, Yucatán. Varias muestras del ritidoma de los distintos forófitos encontrados en ambas regiones fueron tomadas y procesadas (Cuadro 3) para su observación en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) JEOL JSM 6360 LV.

**Cuadro 3.** Metodología para el procesamiento de la corteza para MEB.

Proceso	Equipo o material	Condiciones
Limpieza de la corteza	Etanol 70%	Temperatura ambiente
Secado de la corteza	Estufa de secado ECOSHEL 9025H.	24h, 60°C
Montaje de la muestra	Cinta adhesiva conductora cobre	Temperatura ambiente
Recubrimiento de la muestra	Dento Vacuum modelo DESK II	10 <sup>-2</sup> mbar, 5 minutos

Durante la visualización (20 KV, spotsize 43 y apertura 1) se emplearon varias resoluciones para observar la arquitectura de la corteza (14X y 30X) y para observar la microestructura de la corteza (200X). Las micrografías de las cortezas obtenidas fueron comparadas de acuerdo con la clasificación de Coder (2014) para la apariencia del ritidoma.

### 5.1.1 Rugosidad

En esta parte del trabajo se tomó una serie de micrografías de las diferentes cortezas de los forófitos con ayuda de un estereoscopio Nikon SMZ800 (cámara Moticom 5), las cuales fueron las imágenes de entrada (input data) para el desarrollo de un protocolo para el cálculo de Índice de Fisuración (IF) de la corteza. El protocolo se resume en la figura 9. Las imágenes de entrada fueron procesadas mediante el software Motic Image Plus 2.0 (2013), para delimitar áreas de 1 cm<sup>2</sup> sobre ellas. Las micrografías con áreas homogéneas fueron transformadas, en archivos a escalas de grises mediante el software GIMP 2.8.22 (2017). Posteriormente las imágenes se procesaron en el software UTHSCSA Image tool 1.25 CMEIAS (1996), aplicando un reconocimiento de los diferentes estratos de grises, transformado la imagen en un archivo a blanco y negro,

donde los pixeles negros comprenden las fisuras de la corteza. CMEIAS tiene la capacidad de cuantificar la cantidad de pixeles blancos y negros, expresándolos en porcentaje debido a que cada micrografía tiene un área total de 100 mm<sup>2</sup> y el porcentaje total del área es de 100 %. Es sencillo extrapolar el porcentaje final, con la cantidad de mm<sup>2</sup> cuantificados por el software.

Muestra de la corteza	Todas las muestras son limpiadas con EtOH 70%.
Micrografías por estereoscopia	Con la ayuda de un estereoscopio con una cámara adaptada, se toman fotos de la muestra de forma que las fisuras en la corteza se aprecien completamente.
Procesamiento digital con Motic	Las micrografías se delimitan a un área conocida 1 x 1 cm.
Procesamiento digital con GIMP	Se transforman las imágenes a escala de grises.
Procesamiento digital con el software CMEIAS	Se transforman las imágenes a blanco y negro, el porcentaje obtenido de pixeles negros y blancos es cuantificado.
ANOVA	Los datos resultantes se someten a un ANOVA, con el apoyo de una comparación medias de Tukey se observan las diferencias entre los datos.
Índice de fisuración	El área de las fisuras es extrapolada mediante el área conocida de la imagen, a superficie fisurada por $\text{cm}^2$ .

**Figura 9.** Protocolo para el cálculo del Índice de fisuración (IF) en cortezas usando microscopía de luz y manejo de imágenes mediante software de acceso gratuito.

### **5.1.2 Estabilidad de la corteza**

Para evaluar la estabilidad de la corteza, conocida también como tasa de exfoliación y descamación de la corteza (López- Villalobos *et al.*, 2008), en ambas regiones (RBLP y RBDC) se seleccionaron 10 árboles de cada especie de forófito. Sobre la corteza de estos árboles, en el área basal y a la altura del pecho (1.30 m) se hicieron de manera aleatoria 20 marcas circulares de 5 cm de diámetro, con pintura de vinilo comercial (en el tronco). Después de un periodo de 10 meses, se midió el área exfoliada (puntos totales después del periodo de evaluación).

Con un análisis de varianza y mediante una prueba de medias de Tukey, se analizó después de 10 meses si el porcentaje de exfoliación fue diferente al del inicio. Para ambas regiones se utilizaron 10 réplicas por especie de forófito (n= 50).

### **5.1.3 Capacidad de retención de humedad**

Se emplearon muestras de la corteza para cada una de los diferentes forófitos utilizando 10 réplicas por cada especie (n= 50), midiendo aproximadamente 1 cm x 1 cm con un grosor de  $2.7 \text{ mm} \pm 1.06 \text{ mm}$ . Las secciones se obtuvieron de la corteza más próxima al sistema radical, en la primera orquídea más cercana al nivel del suelo

El material fue procesado ajustando las metodologías reportadas previamente por Callaway *et al.* (2002) y Einzmann *et al.* (2015) de la siguiente manera: Las muestras se limpiaron con alcohol 70% y fueron secadas a 65°C durante 48 h, con ayuda de un horno de secado (ECOSHEL 9025H). Al término del periodo de secado, se obtuvo el peso seco de cada muestra utilizando una balanza analítica (Precisa XT 220<sup>a</sup>).

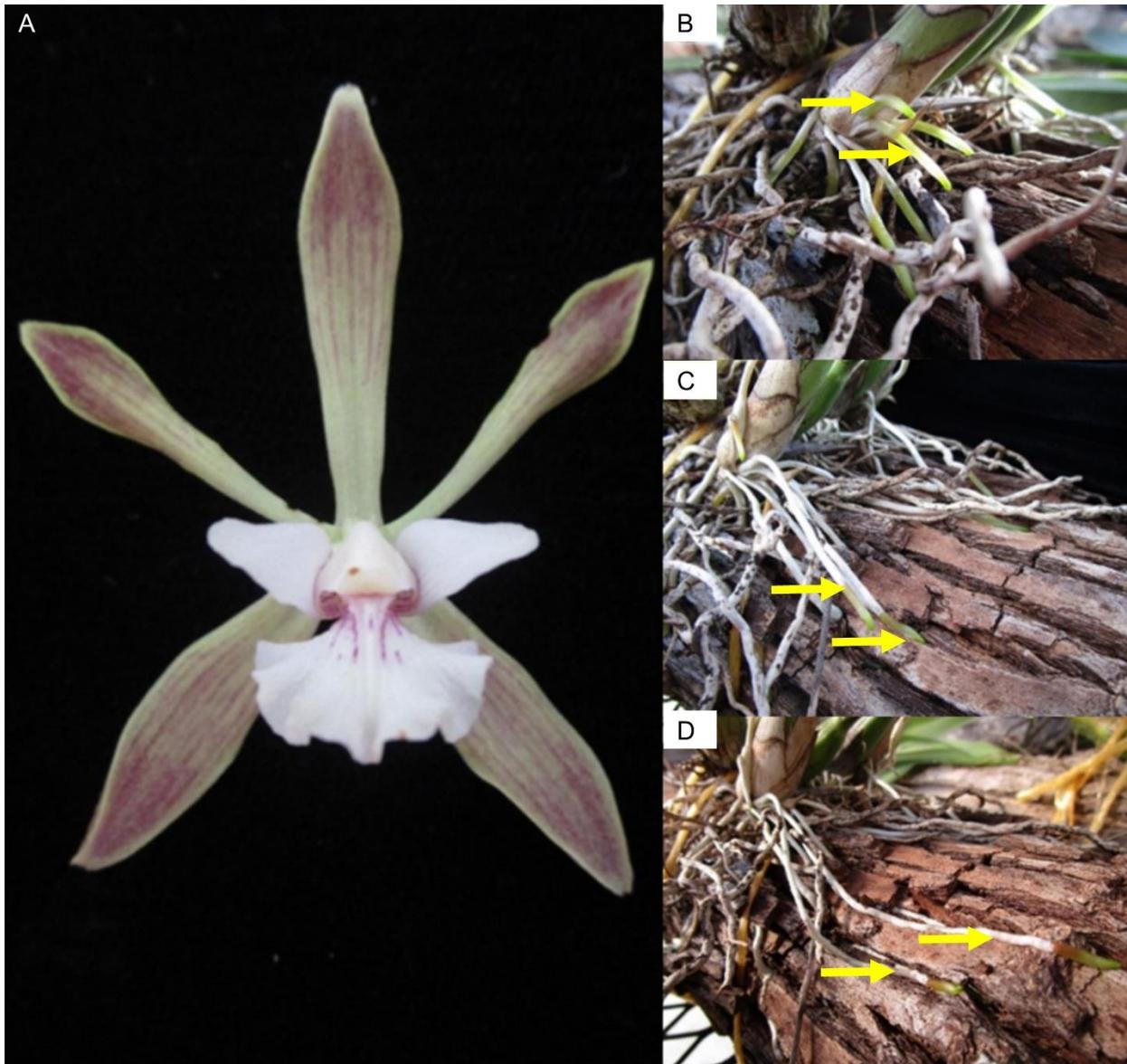
Para determinar las propiedades hídricas de la corteza, las muestras secas se sumergieron en alícuotas de 2 ml de agua ultra pura (Miliporador Elix Progard 2), adicionadas con Tritón X-100 0.05% (Merk Cat. 648462) para eliminar la tensión superficial y dispuestas en microplacas de 24 pozos. La incubación se realizó a 22°C por 30 minutos. Posteriormente las muestras se dejaron escurrir 1 minuto sobre una rejilla de plástico. Después se procedió a realizar la toma de datos; la primera lectura de peso obtenido correspondió a la capacidad de absorción de agua de la corteza (CAA). Para determinar la capacidad de retención de humedad de la corteza, las muestras siguieron un proceso de desecación constante a 22°C. Se registraron los valores de los pesos cada hora, durante un lapso de 8 h. El último peso obtenido al término del periodo de desecación, equivalió a la capacidad de retención de humedad (CRH). Mediante una prueba de medias de Tukey se analizó las diferencias entre ambas capacidades hídricas de la corteza.

#### **5.1.4 Análisis de porosidad de la corteza**

Para el análisis del número de poros en la corteza las micrografías a 200X obtenidas por MEB previamente de cada uno de los forófitos se dividieron en 12 cuadrantes diferentes (n= 60). Cada cuadrante tuvo las mismas medidas de alto por ancho y los poros de cada sector fueron cuantificados. La cantidad de poros fueron extrapolados a poros por cm<sup>2</sup>. Los datos finales fueron ingresados a una base de datos en Excel y posteriormente fueron analizados mediante un ANOVA y se les aplicó la comparación de medias de Tukey, con la ayuda del software InfoStat versión 2018.

#### **5.4. Interacción raíz- corteza**

En esta sección se observaron los cambios en raíces de *Encyclia alata* (Bateman) Schltr. esta especie se eligió porque debido a su presencia en ambas regiones de estudio, la amplia selección por los forófitos encontrados y por el tamaño de sus raíces que permitió una mejor visualización de los tejidos con mayor detalle. Para observar la dinámica del establecimiento de la raíz sobre la corteza se llevó un control fotográfico de las etapas de desarrollo de la raíz (Figura 10). Adicionalmente, usando del microestereoscopio se observaron los cambios visibles en la epidermis de las raíces de *Encyclia alata* (Bateman) Schltr.



**Figura 10.** Desarrollo radical de *Encyclia alata* (Bateman) Schltr. A) Flor de *Encyclia alata* (Bateman) Schltr. B) Raíces a los 3 días de crecimiento, C) Raíces a los 7 días de crecimiento, D) Raíces a los 14 días de desarrollo.

#### 5.4.1. Visualización de la morfología de la raíz mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Esta parte del trabajo fue realizada en la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados Campus Montecillos (UME-CP). Las muestras fueron cortes transversales y longitudinales de raíces de *Encyclia alata* (Bateman) Schltr. en las 3 diferentes etapas de anclaje a la corteza: Etapa 1, correspondiente a raíces de 3 días; Etapa 2, que comprende raíces de 7 días y Etapa 3, presentan raíces de 14 días (Figura 10).

Las muestras colectadas fueron procesadas para su observación en el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) JEOL JSM-6390 como se indica en la Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Procesamiento de tejido fresco de raíces para su observación en MEB.

Actividad	Equipo, material o reactivo.	Condiciones
Fijación del tejido	Glutaraldehido en amortiguador de Sorensen 4 % v/v	Temperatura ambiente
Deshidratación gradual	Solución EtOH- H <sub>2</sub> O: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 y 100 % v/v	Temperatura ambiente, 60 min cada cambio.
Desecación a punto crítico con CO <sub>2</sub>	Samdri-780A	4°C, 40 minutos
Montaje de la muestra	Cinta adhesiva conductora cobre	Temperatura ambiente
Recubrimiento de la muestra	ION SPUTTER JFC-1100	10 <sup>-2</sup> mbar, 5 minutos

### 5.4.2 Análisis histológicos

Para los estudios histológicos se procesaron las raíces de *Encyclia alata* (Bateman) Schltr. en sus 3 etapas diferentes de desarrollo (1, 2 y 3) como se muestra en la Cuadro 5 siguiente:

**Cuadro 5.** Procedimiento para la observación de cortes histológicos en microscopio compuesto y microestereoscopio

Actividad	Equipo, material o reactivo.	Condiciones y especificaciones
Fijación del tejido	Solución EtOH 50, H <sub>2</sub> O Tridestilada 35, Formol 10, Ácido Acético Glacial 5% v/v	4°C, 24h
Deshidratación gradual	Procesador automatizado de tejido al vacilo Leica ASP6025 EtOH 70, 90, 100 y 100% v/v	Temperatura ambiente, Duración de la inmersión 4h, en cada cambio
Remplazo del alcohol a xileno	Procesador automatizado de tejido al vacilo Leica ASP6025 Xileno 100%	Duración de la inmersión 4 horas. Se repitió este paso 3 veces
Embebido de la muestra en diferentes parafina (I, II y III)	Procesador automatizado de tejido al vacilo Leica ASP6025 Paraplast Leica	Duración de cada inmersión 24 h, 60°C.
Formación de los bloques de parafina	Plancha de calentamiento y refrigeración	Placa a 60°C y enfriamiento a 4°C durante toda la noche (16 h)
Cortes histológicos	Micrótopo rotatorio automatizado Leica RM2255.	Cortes a 1 cm después de la punta de la raíz, grosor del corte 10 µm.
Adhesión a portaobjetos	Adhesivo de grenetina + Cr	Temperatura ambiente
Secado de las muestras	Estufa de secado ECOSHEL 9025H	50°C durante 24 h

Las secciones de la raíz en las diferentes tinciones fueron analizadas por microscopía de luz, mediante un microscopio Leica DM2000 con una cámara adaptada Leica DFC290 y un estereoscopio Leica M165C.

#### **5.4.2.1 Tinción de azul de Toluidina**

El reactivo Azul de Toluidina O (Sigma-Aldrich Cat. 198161- 25G) fue utilizado para teñir diferencialmente las paredes celulares primarias y las secundarias. Las paredes celulares primarias se tiñen de color rosado o púrpura, mientras que las paredes celulares secundarias se tiñen de azul o azul verdoso. Con esta técnica también es sencillo distinguir algunos tejidos celulares como xilema en color verde o azul-verde, floema que presenta coloración roja, esclerénquima en azul-verde y en ocasiones solo verde, colénquima rojo-púrpura y parénquima en color rojo-púrpura (Haskins, 1982). Para poder observar estas diferencias, los portaobjetos con los cortes en parafina fueron procesadas como se indica en la Cuadro 6 dado que la tinción es de naturaleza acuosa.

**Cuadro 6.** Metodología para la observación de muestras mediante la tinción de Azul de Toluidina O.

Actividad	Equipo, material o reactivo	Condiciones y especificaciones
Desparafinado en diferentes xilenos (I, II y III)	Xileno 100%	Temperatura ambiente Duración de la inmersión: 3 min para cada xileno
Hidratación gradual	Solución Etanol-H <sub>2</sub> O: 100, 100, 90, 80, 70 y 50% v/v	Temperatura ambiente Duración de la inmersión: 5 min para cada grado
Tinción	Solución Azul de Toluidina O 1:100 p/v	Temperatura ambiente Duración de la inmersión: 1 min Lavado bajo chorro de agua 1 min
Observación de la muestra	Microscopio compuesto y microestereoscopio	Observación inmediata

#### 5.4.2.2. Tinción de lignina

La reacción de floroglucinol-HCl es una tinción específica para la identificación de aldehídos aromáticos, útil para determinar las distribuciones de lignina en la pared celular. El floroglucinol reacciona con los coniferilaldehídos y sinapilaldehídos, en el medio ácido provocado por la adición de HCl (Pradhan y Loqué, 2014). La tinción del tejido produce un pigmento color rosa inestable que se desvanece con el tiempo (Wiesner, 1878; Pomar *et al.*, 2002). Las muestras fueron teñidas con el reactivo floroglucinol (Sigma-Aldrich Cat. B3502-25G) y se observaron inmediatamente bajo el microscopio compuesto y el microestereoscopio. El protocolo se resume en la Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Metodología para la observación de lignina en muestras de raíz mediante la tinción de floroglucinol -HCl.

Actividad	Equipo, material o reactivo.	Condiciones y especificaciones
Desparafinado en diferentes xilenos (I, II y III)	Xileno 100%	Temperatura ambiente Duración de la inmersión 3 min para cada xileno
Hidratación gradual	Solución Etanol-H <sub>2</sub> O: 100, 100, 90, 80, 70 y 50% v/v	Temperatura ambiente Duración de la inmersión 5 min para cada grado
Inmersión en floroglucinol	Solución de floroglucinol - EtOH 1:100 p/v	Aplicar de 1 a 2 gotas de la solución directamente sobre la muestra Temperatura ambiente Duración de la inmersión 1 min
Acidificación del medio	Solución HCL-H <sub>2</sub> O 1:1 v/v	Aplicar de 1 a 2 gotas de la solución directamente sobre la muestra Temperatura ambiente Duración de la inmersión 10 seg
Observación de la muestra	Microscopio compuesto y microestereoscopio	Observación inmediata

#### 5.4.2.3. Microscopía Laser de Barrido Confocal (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM)

En el Campus Campeche se empleó un segundo método para la visualización de la lignificación de la pared celular del velamen, mediante la autofluorescencia de las paredes lignificadas con apoyo de microscopia confocal. Para ello las secciones histológicas de 10 µm obtenidas previamente con un Micrótopo rotatorio automatizado Leica RM2255, fueron analizadas con un haz de excitación de 488 nm de profundidad

de campo, mediante Microscopía Laser de Barrido Confocal con el microscopio ZEISS AXIO Imager.Z2, (ZEISS, Germany) y una cámara AxioCamMRm, sistema de iluminación de fluorescencia X-Cite Series 120PCQ, fuente de alimentación ZEISS EPLAX VP232-2

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Composición vegetal de forófitos y orquídeas epifitas

En el presente estudio cuando se analizó la composición vegetal para región de Calakmul la vegetación correspondiente fue selva mediana subperenifolia (BRDC) y la región de los Petenes presentó vegetación de selva baja inundable (RDBP). Los resultados indicaron una mayor densidad arbórea total para la RBDC en comparación con la RBDP (Figura 11A). El análisis de la composición de forófitos por parcela (400 m<sup>2</sup>) mostró para BRDC un promedio de  $80.2 \pm 2.77$ , mientras que para RDBP la media fue de  $31.75 \pm 4.99$  forófitos por unidad de estudio.

En ambas regiones encontramos 5 especies de forófitos en total, los cuales pertenecen a 3 familias botánicas diferentes como se muestra en la Cuadro 8. El forófito más abundante en RDLP fue *Haematoxylum campechianum* L. (Fabaceae) con una frecuencia de 17.94 % y el forófito menos abundante fue *Gymnopodium floribundum* Rolfe (Polygonaceae) con una frecuencia relativa de 8.9 %. Por otra parte, en la BRDC se encontraron sólo 2 especies de forófitos *G. floribundum* con una frecuencia de 73 % y *Erythroxylum confusum* Britton (Erythroxylaceae) con una frecuencia del 27 % (Figura 11B).

En cuanto a la abundancia de las orquídeas epifitas en ambas zonas de estudio (Cuadro 8, Figura 12), la selva media subperenifolia presentó una menor densidad de orquídeas por m<sup>2</sup> a diferencia de la selva baja inundable (Figura 11C). La cantidad de especies presentes fue de 14 para la selva mediana subperenifolia y de 5 para selva baja inundable (Figura 11D). Se analizó la tasa de presencia de orquídeas por forófito total

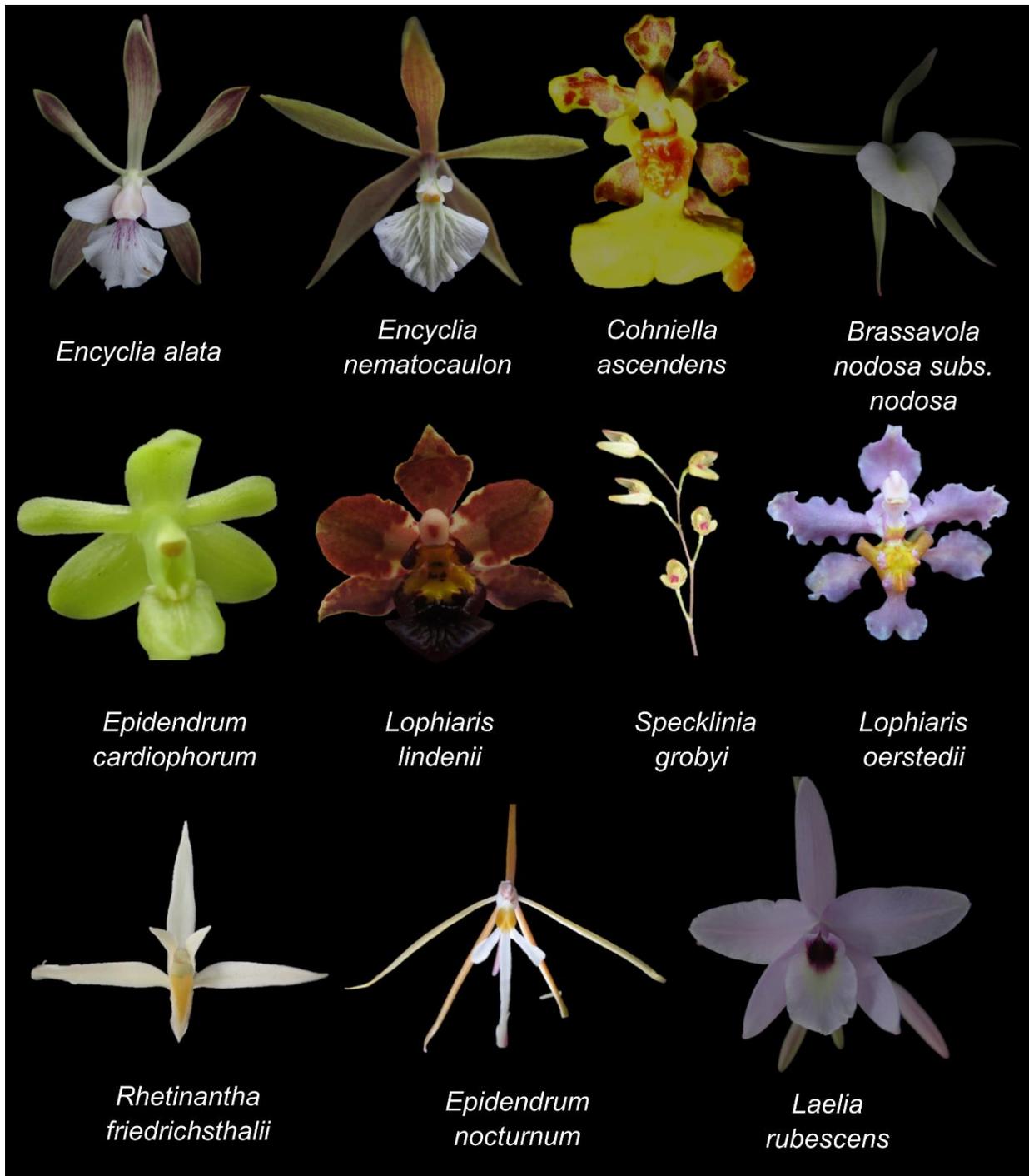
para las dos regiones: la RBLP mostró un 61.27 %, mientras que en RBDC fue de 38.72 %.

El número reducido de especies dominantes de orquídeas epífitas para la RBLP que expresan una mayor frecuencia puede ser resultado de las condiciones climáticas diferentes (Einzmann *et al.*, 2015). También la fenología de las orquídeas puede estar influenciando el patrón de distribución, abundancia y riqueza en los diferentes ambientes (Zhang *et al.*, 2018). Las especies de orquídeas que componen la selva baja inundable pudieran ser especies adaptadas a la carencia de sombra, lo cual se sugiere por las especies de forófitos de hoja caduca hallados en este sitio. Contrariamente, la tolerancia a la luz solar pudiera también estar implicada en la mayor riqueza de especies en la selva media subperenifolia, cuyas características del follaje en los forófitos proporciona mayor cantidad de sombra (San Martín *et al.*, 2008). Los resultados claramente muestran que la diversidad de orquídeas está fuertemente influenciada por el tipo de vegetación y la capacidad de ésta de funcionar como forófitos (Dorset y Hamrick, 2006).



**Cuadro 8.** Epifitas presente por tipo de vegetación estudiado y los principales forófitos en las cuales se encuentran establecidas.

<b>Tipo de vegetación</b>	<b>Forófitos y familia botánica</b>	<b>Especie de orquídea</b>
Selva baja inundable	<i>Caesalpinia gaumeri</i> Greenm. (Fabaceae Lindl.)	<i>Encyclia alata</i> (Bateman) Schltr. <i>Encyclia nematocaulon</i> (A. Rich.) Acuña <i>Brassavola nodosa</i> (L.) Lindl. var. Nodosa
Selva baja inundable	<i>Crescentia alata</i> Kunth (Bignoniaceae Juss.)	<i>Encyclia alata</i> (Bateman) Schltr. <i>Encyclia nematocaulon</i> (A. Rich.) Acuña <i>Laelia rubescens</i> Lindl.
Selva mediana subperenifolia	<i>Erythroxylum confusum</i> Britton (Erythroxylaceae Kunth)	<i>Rhetinantha friedrichsthalii</i> (Rchb. F.) MA Blanco <i>Encyclia alata</i> (Bateman) Schltr. <i>Nemaconia striata</i> (Lindl.) <i>Epidendrum nocturnum</i> Jacq. <i>Specklinia grobyi</i> (Bateman ex Lindl.) F. Barros <i>Rhyncholaelia digbyana</i> (Lindl.) Schltr. <i>Polystachyacarasana</i> Rchb.F.
Selva mediana subperenifolia	<i>Gymnopodium floribundum</i> Rolfe (Polygonaceae Juss.)	<i>Cohniella ascendens</i> (Lindl.) Christenson <i>Lophiaris lindenii</i> (Brongn.) Braem <i>Encyclia nematocaulon</i> (A. Rich.) Acuña <i>Oncidium sphacelatum</i> Lindl. <i>Laelia rubescens</i> Lindl. <i>Myrmecophila christinae</i> Carnevali & Gómez-Juárez <i>Epidendrum cardiophorum</i> Schltr.
Selva baja inundable	<i>Gymnopodium floribundum</i> Rolfe (Polygonaceae Juss.) <i>Haematoxylum campechianum</i> L. (Fabaceae Lindl.)	<i>Catasetum integerrimum</i> Hook. <i>Encyclia nematocaulon</i> (A. Rich.) Acuña <i>Encyclia alata</i> (Bateman) Schltr. <i>Encyclia nematocaulon</i> (A. Rich.) Acuña <i>Brassavola nodosa</i> (L.) Lindl. var. Nodosa



**Figura 12.** Apariencia floral de siete especies de orquídeas presentes en la selva mediana subperenifolia (BRDC) y la selva baja inundable (RDBP) de Campeche.

### 6.1.1 Similitud de especies

Se aplicó el índice de Jaccard para comparar la composición de la vegetación entre RBDP y RBDC. Los resultados indicaron lo siguiente: ambas zonas presentan un 20 % de similitud en los forófitos que la componen, siendo la única especie en común *G. floribundum*. En cuanto a la vegetación orquidal, el índice reveló la existencia de un 18 % de similaridad entre los dos sitios, encontrando a *Encyclia alata* (Bateman) Schltr. y *Encyclia nematocaulon* (A. Rich.) Acuña como las únicas dos especies compartidas en ambas regiones (Figura 12).

Los índices cuantitativos como el del Jaccard son apropiados cuando las especies son similares y las zonas de estudio difieren principalmente en la abundancia de sus especies (composición de especies) (Chao, 2005). Este estudio se analizó comunidades geográficamente alejadas por lo que las formas binarias de los índices del componente de diversidad biológica, tal como lo es Jaccard, producen resultados más robustos en estudios realizados a escalas espaciales más amplias (Legendre, 2014). Aquí *G. floribundum*, *E. alata* y *E. nematocaulon* mostraron tener la capacidad de distribuirse en diferentes regiones con diferentes características ecológicas. Los valores de similitud son bajos debido a las características propias del clima y la geografía de cada región viéndose reflejada en la riqueza de especies (García del Barrio et al., 2014).

### 6.1.1 Especificidad de forófitos en la zona de estudio

El análisis de presencia de especies de orquídeas en particular sobre forófitos determinados reveló que un reducido número de forófitos puede adquirir una gran cantidad de especies de orquídeas tal como se muestra para el caso de *G. floribundum* y *E. Confusum*, dos forófitos quienes albergaron la mayor cantidad de especies (Figura 13).

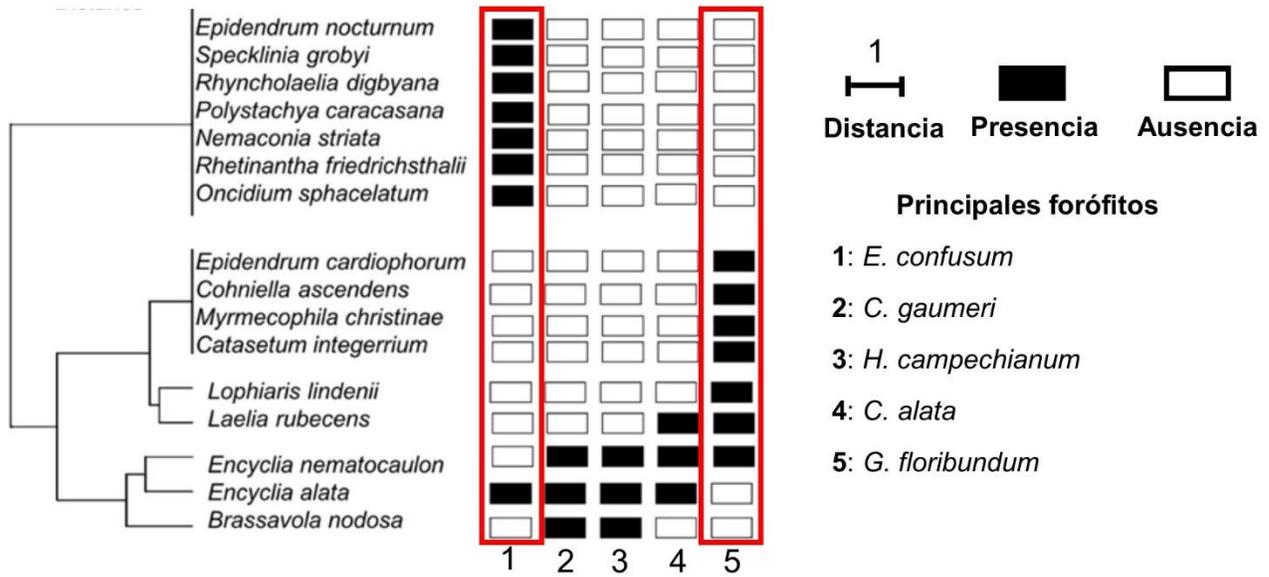
En la RBLP se encontraron tres especies de orquídeas (*E. alata*, *E. Nematocaulon* y *B. nodosa*) sobre cuatro especies de forófitos, (*H. campechianum*, *Crescentia alata* Kunth, *Caesalpinia gaumeri* Greenm. y *G. floribundum*). Estas epifitas presentan similitud en la succulencia de sus hojas e interesantemente sus forófitos presentan hoja caducifolia (De la Rosa, 2014); esto podría sugerir que las orquídeas pueden tener la capacidad de enfrentar condiciones de radiación solar elevada en ciertas estaciones del año.

En la RBDC ocho especies de orquídeas fueron halladas en *E. confusum* y siete especies para *G. floribundum*. El follaje perenne en *E. confusum* y copa elevada proporciona sombra a las orquídeas protegiéndolas de la radiación (Sánchez *et al.*, 2008), sin embargo *G. floribundum* (De la Rosa, 2014) presenta follaje caducifolio lo cual sugiere que la preferencia de orquídeas hacia este forófito en particular puede estar siendo determinado por otras propiedades del forófito.

Los datos de presencia-ausencia también son a menudo la base más confiable para la comparación de áreas distantes en estudios macroecológicos (Legendre, 2014). La alta heterogeneidad ambiental dentro de las selvas tropicales genera una alta disponibilidad de microhábitats, por lo tanto, es de esperarse que la distribución de las orquídeas esté

restringida bajo condiciones de micro- sitios específicos producida por características del forófito (Soto *et al.*, 2012). La especificidad hacia los forófitos aún es un tema que sigue causando controversia; algunos reportes en especies de epifitas Neotropicales muestran la existencia de una marcada preferencia por árboles hospederos determinados (García-González *et al.*, 2016). Cedillo (2012) reportó especificidad de *Prosthechea aff. karwinskii* (Mart.) J.M.H.Shaw por el forófito *Quercus deserticola* Trel. En su estudio demostró que otras especies arbóreas presentan axenia (inhospitalidad o repulsión hacia las epífitas) causada por la secreción de sustancias en la corteza de *Pinus spp*; así como por el descortezamiento en el caso de *Arbutus xalapensis* Kunth. Por otra parte, en el estudio de Adhikari *et al.*, (2017) se ha correlacionado positivamente algunas propiedades de la corteza y morfometría de los forófitos como pH de la corteza, el tamaño del tallo, la edad del árbol y la altura del árbol con la distribución de epifitas sobre *Schima wallichii* (DC.) Korth. También ha sido reportado por Timsina *et al.*, (2016) la preferencia de orquídeas epifitas en forófitos de hoja perenne como *Quercus incana* W. Bartram, influyendo positivamente en la abundancia de especies de orquídeas epifitas.

Por ello se analizaron algunas de las propiedades físicas que se proponen, aplicándolas en los forófitos de RBLP y RBDC.



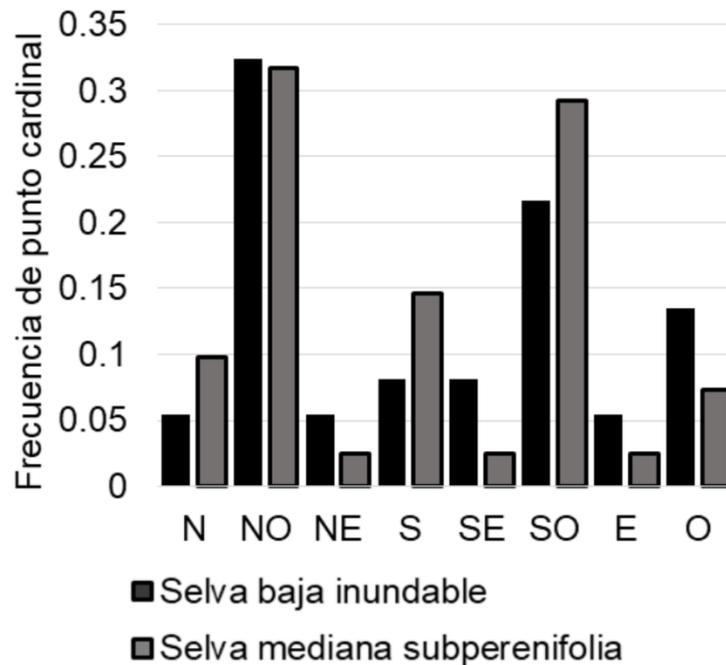
**Figura 13.** Distribución de las especies de orquídeas sobre los forófitos. Encerrados en rojo las especies de forófitos que presentan mayor número de especies de orquídeas.

## 6.2. Distribución circular de orquídeas

Se comparó la distribución circular de las orquídeas epifitas en ambas regiones RDLP y RBDC, los datos revelaron una clara tendencia de crecimiento en dirección NO y SO sobre el tronco de los forófitos en ambas regiones. Para la RBLP los datos indican que existe un 32 % de preferencia por establecerse hacia el NO y un 22 % hacia el SO, a diferencia de la RBDC donde las orquídeas prefieren con un 31 % crecer con orientación al NO y con un 29 % hacia el SO (Figura 14). Interesantemente, sobre estos puntos cardinales se recibe de forma indirecta la radiación solar durante las horas más cálidas del día.

La tendencia de las orquídeas para establecerse sobre estas orientaciones cardinales se determina en gran manera por la naturaleza caducifolia de las especies de forófitos en que se hallan (Addo-Fordjour *et al.*, 2009). Los puntos cardinales preferidos NO y SO, presentan la ventaja de disminuir la incidencia de la radiación solar directa sobre las orquídeas mediante la sombra generada por el eje del tronco. (García-González y Damon, 2013; García-González *et al.*, 2016). Damon (2016) encontró un comportamiento de distribución circular muy similar al que nosotros obtuvimos en *Oncidium poikilostalix* (Kraenzl.) M.W. Chase & N.H. Williams y *Oncidium guatemalenooides* M.W. Chase & N.H. Williams sobre el forófito *Inga micheliana* Harms (especie caducifolia). Otro ejemplo lo constituye *P. karwinskii* y su hospedero *Q. desertícola* (follaje caducifolio), los individuos de esta orquídea están preferentemente ubicados hacia el este, sur y oeste (49 %), y muy pocos se enfrentaron al norte, noroeste y noreste (21 %) (Rodríguez-Cedillo, 2012). En el caso del estudio de Tremblay y Velázquez (2009) sobre *Lepanthes eltoroensis* Stimson cuyo principal forófito fue *Clusia clusioides* (Griseb.) D'Arcy (copa caduca) las

poblaciones estudiadas de orquídeas mostraron una tendencia de establecimiento en la parte noroeste del tronco. Nuestros resultados sugieren que la radiación solar (Pierce *et al.*, 2005) es el factor de principal influencia sobre la distribución circular (posición cardinal de la epífita sobre el eje del troco del forófito), este fenómeno se presenta como una respuesta de protección del individuo; especialmente cuando el forófito presenta follaje caducifolio la orientación sobre puntos NO y SO, disminuye la incidencia solar gracias a la sombra generada por el tronco del forófito (García- González y Damon, 2013; García-González *et al* 2016).



**Figura 14.** Distribución cardinal de las orquídeas sobre el tronco de los forófitos en ambas regiones. N, norte; NO, noreste; NE, noroeste; S, sur; SE, sureste; SO, suroeste; E, este y O, oeste.

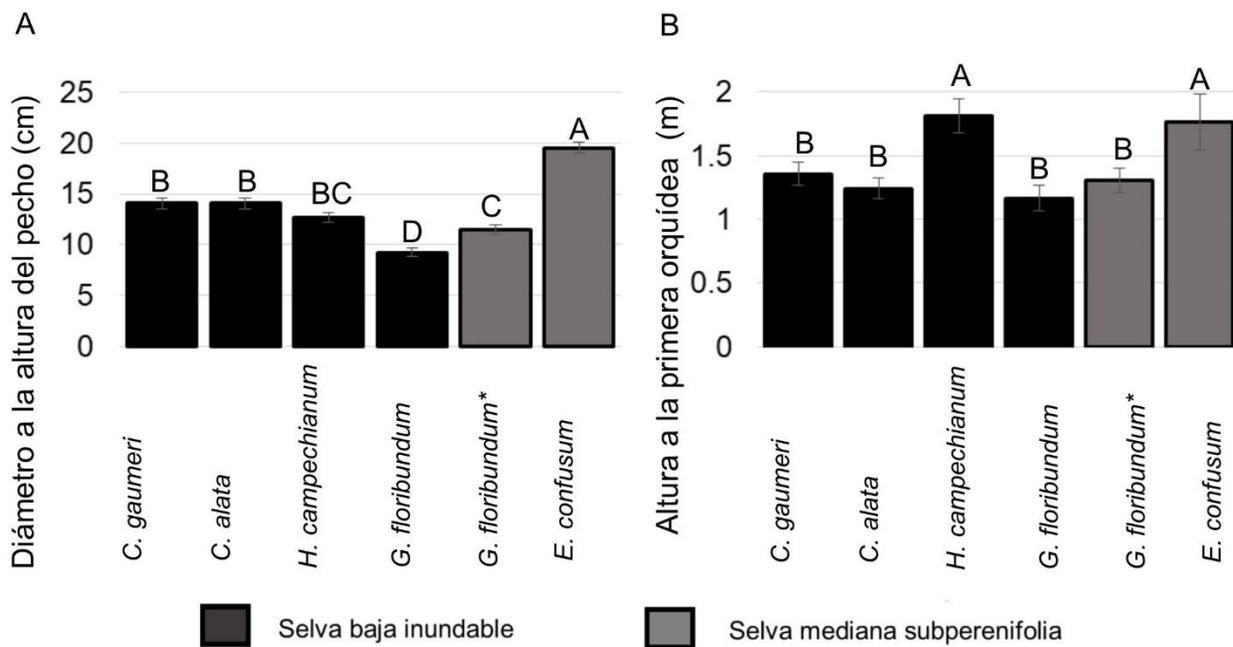
### 6.3. Morfometría de hospederos y punto de colonización inicial de orquídeas

El tamaño de los hospederos es uno de los parámetros más comunes cuando evaluamos las interacciones de las epífitas con su forófito. El diámetro del tallo del árbol a la altura del pecho (DAP) se usa frecuentemente como un indicador del tamaño del hospedero (Oloyede *et al.*, 2014; García-González y Damon 2013; Morales-Hernández *et al.*, 2016).

En este estudio se analizó el diámetro a la altura del pecho (DAP) en los forófitos hallados en las dos zonas RDLP y RBDC. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los tamaños de los forófitos hallados en ambas zonas de estudio. Para la región de RBLP, los principales forófitos *H. campechianum*, *C. alata* y *C. gaumeri* mostraron un DAP muy similar entre las especies, mientras que *G. floribundum* obtuvo el menor DAP ( $10.386 \pm 0.42$ cm). En cuanto a la RBDC, la especie de forófito con mayor DAP fue *E. confusum* ( $19.49 \pm 0.79$ cm), mientras que *G. floribundum* obtuvo nuevamente el menor DAP. Cuando comparamos todas las especies de ambas regiones en conjunto, *E. confusum* sobresalió notablemente por encima de todas las especies presentando el mayor DAP (Figura 15A).

Cuando la altura de la primera orquídea sobre el forófito (ya sea tronco o rama) fue analizada, los datos revelaron que la mayoría de las orquídeas se encuentran establecidas sobre el tronco en un rango de 1-1.5 m para ambas regiones. Un dato interesante es que solo en algunos árboles hospederos la colonización de orquídeas comenzó a una altura mayor, como es el caso de *H. campechianum* y *E. confusum*. Para la RBLP, *H. campechianum* se encontró colonizado desde  $1.81 \pm 0.13$  m a partir del nivel del suelo, mientras que para RBDC la primera orquídea en la especie *E. confusum* fue encontrada a los 2 m (Figura 15B).

Los datos sugieren que el tamaño de los hospederos es un factor primordial que influye sobre la riqueza de orquídeas epífitas, como ha sido referenciado previamente para en otros ecosistemas estudiados. Woods *et al* (2015) encontró en forófitos de la especie *Virola koschnyi* Warb. que la cantidad de epífitas, orquídeas y bromelias aumentó significativamente con el tamaño del árbol, y concluyen que árboles con una mayor superficie y longevidad, contribuyen positivamente a la riqueza de especies. Oloyede *et al.* (2014) incluso indican que árboles con un DAP > 100 cm hospedan mayor cantidad de orquídeas.



**Figura 15.** Morfometría de los forófitos. A) Diámetro a la altura del pecho (DAP) a los 1.20 cm a partir del nivel del suelo, es un indicador de la antigüedad del forófito. B) Altura de la primera orquídea.

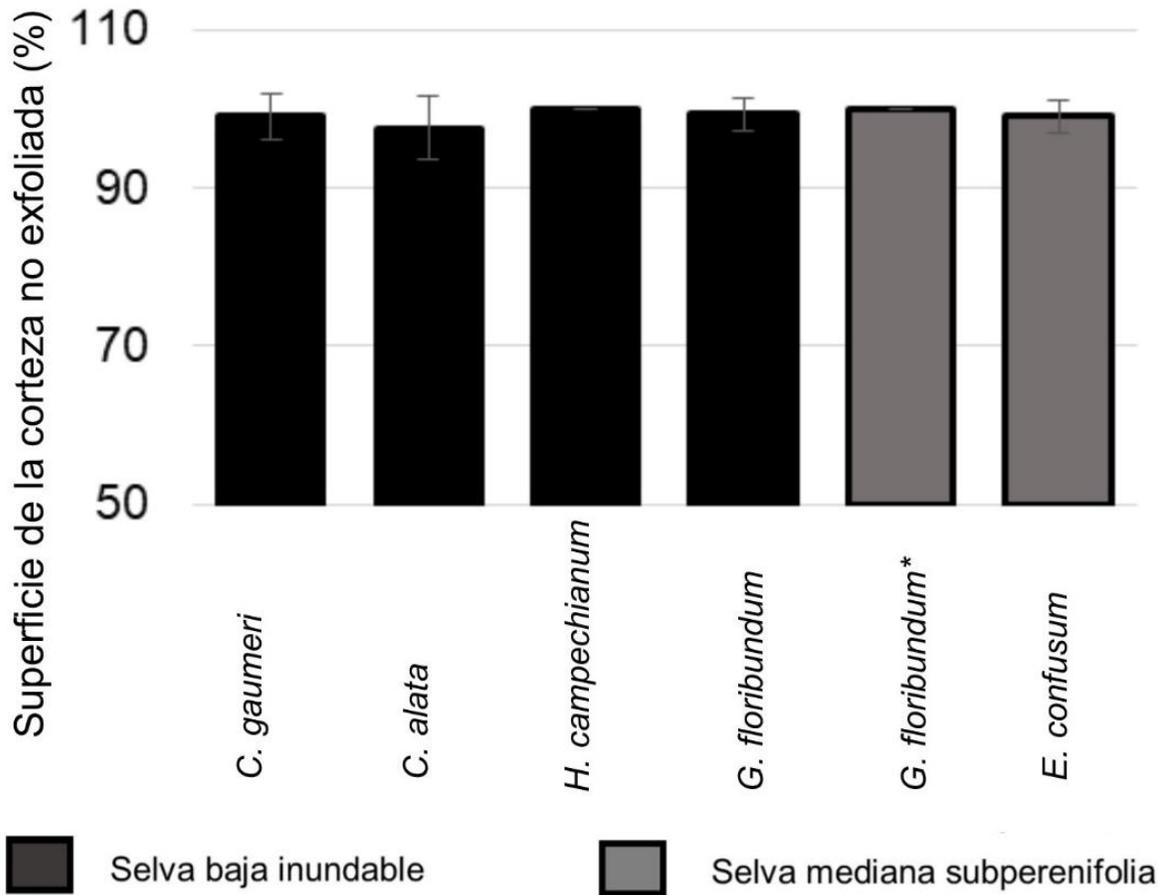
## 6.4. Propiedades físicas de la corteza de los forófitos

### 6.4.1. Tasa de exfoliación de la corteza

Los análisis de estabilidad de la corteza (permanencia del ritidoma viejo después de un lapso de tiempo) realizados en forófitos de ambas selvas no mostraron diferencias significativas en la tasa de exfoliación después de un periodo de evaluación de 10 meses (Figura 16). Consideramos que este tiempo debería extenderse a un mínimo de 22 meses como se ha reportado previamente, o sugerido en el trabajo de Callaway (2002).

Nuestros resultados coinciden con los trabajos de Callaway (2002) quien analizó dos epifitas vasculares, *Tillandsia usneoides* (L.) L. y *Polypodium polypodioides* (L.) Hitchc. y sus respectivos árboles hospederos en un bosque subtropical. Su estudio de 22 meses indicó que la estabilidad de la corteza (tasa de corteza no exfoliada) no se correlaciona con la preferencia de *T. usneoides* por el árbol hospedera *Celtis laevigata* (Kunth) Spreng, y de *P. polypodioides* por *Quercus virginiana* Mill, pues ambos forófitos mostraron una baja tasa de exfoliación del 5 %. El autor sugiere que otras condiciones microclimáticas del tronco pudieran estar afectando positivamente la distribución y colonización de estas especies epifitas. En el estudio de López-Villalobos *et al.*, (2008), se evaluó en un bosque seco tropical la colonización de *Tillandsia paucifolia* Baker en el forófito *Bursera fagaroides* (Kunth) Engl. Después de un periodo de 3 meses, los resultados mostraron que la corteza de tipo exfoliante presentó una baja tasa de exfoliación del 10 %. Además, existió una baja mortalidad de epifitas en el tronco sugiriendo que la distribución de *T. paucifolia* no solo está determinada por la tasa de exfoliación, si no probablemente a mejores condiciones microclimáticas en el tronco, pudiendo existir otro factor que determina la preferencia de las epifitas. Nuestros

resultados en comparación con las investigaciones (mencionadas arriba) indican que la tasa de exfoliación de la corteza no es un factor determinante sobre preferencia del forófito para las especies epifitas.

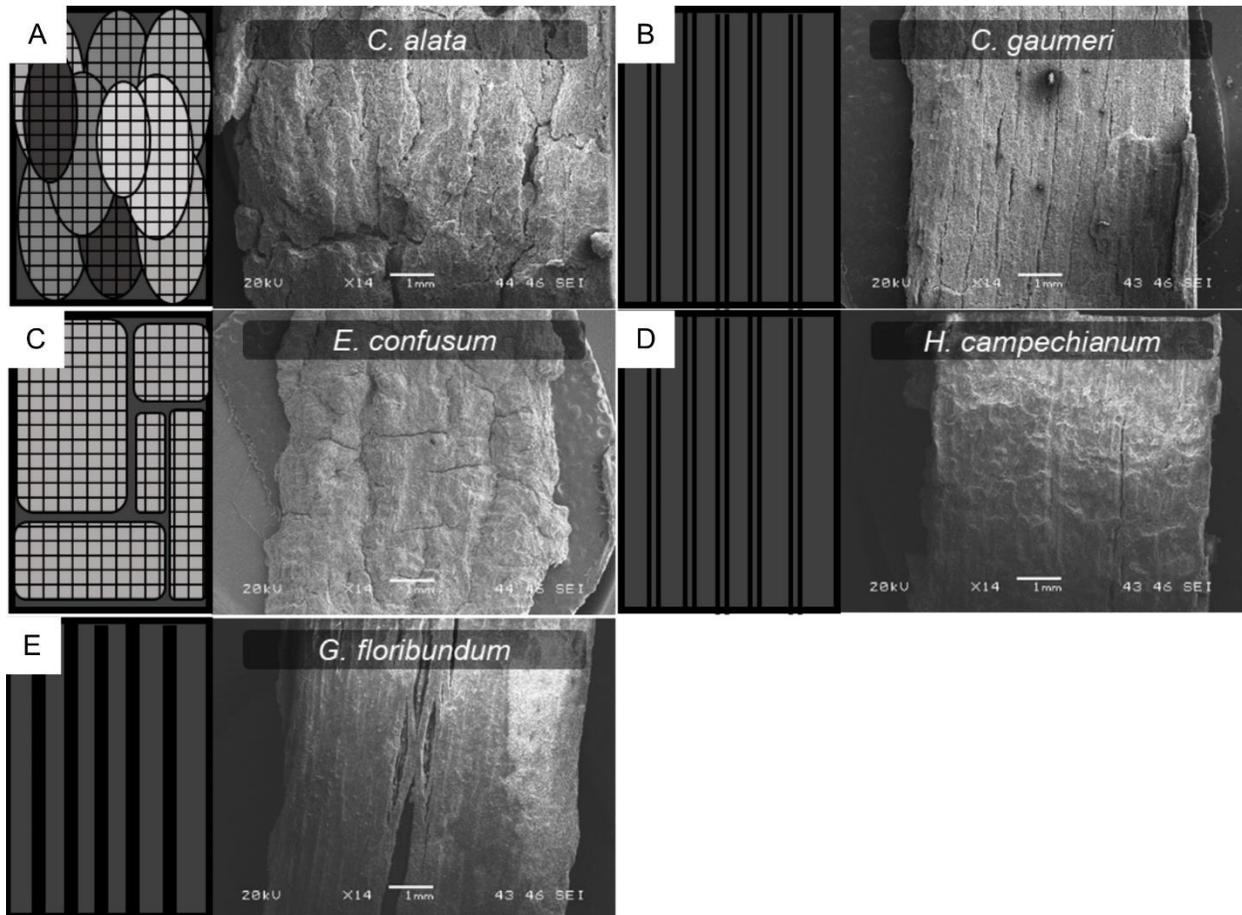


**Figura 16.** Tasa corteza no exfoliada (estabilidad de la corteza) en forófitos presentes de la selva mediana subperenifolia (BRDC) y la selva baja inundable (RDBP) de Campeche.

#### 6.4.2. Rugosidad

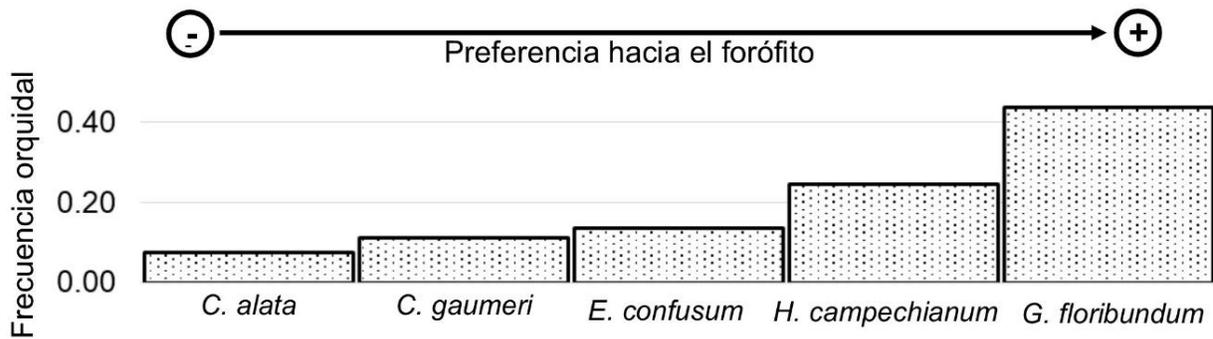
La rugosidad es una propiedad característica en cada especie de forófito y pudiese estar correlacionada con la abundancia epífitas en las comunidades (Callaway *et al.*, 2002). Por ello en este estudio la rugosidad de la corteza fue evaluada como un factor que pueda estar determinando la aparente especificidad de forófitos presentes en ambas selvas.

La microestructura de la corteza en los diferentes forófitos fue observada a detalle mediante MEB. Aquí, por primera se vez se usó la clasificación propuesta por Coder (2014) para ritidomas. Basado en esta nomenclatura, todos los forófitos presentaron corteza rugosa pero con diferencias en el patrón de decoraciones: Lineal para *H. campechianum* y *C. gaumeri*, escamosa para *C. alata*, en placas para *E. confusum* y fisurada para *G.floribundum* (Figura 17A-E). Estas estructuras específicas en combinación de factores antes mencionadas como la tasa de exfoliación y propiedades métricas, pueden promover la preferencia por ciertos microhábitats a pesar de las defensas presentadas por las posibles especies hospederas.



**Figura 17.** Rugosidad de la corteza del forófito con Microscopía Electrónica de Barrido y clasificación de acuerdo a la topología propuesta por Coder (2014). A) Escamosa, B) lineal, C) en placas. D) lineal, E) fisurada. El recuadro de la izquierda muestra un esquema de acuerdo a Coder (2014).

Para determinar si existía alguna relación entre la especificidad del forófito y la microestructura de la corteza descritas, evaluamos la frecuencia de orquídeas por forófito. Nuestro análisis del tipo de corteza y la frecuencia de forófito, reveló que los dos forófitos con cortezas tipo fisurada y en placas (*G. floribundum* y *E. confusum* respectivamente) fueron las especies más preferidas por las orquídeas. La corteza menos preferida fue de microestructura escamosa (*C. alata*) (figura 18).

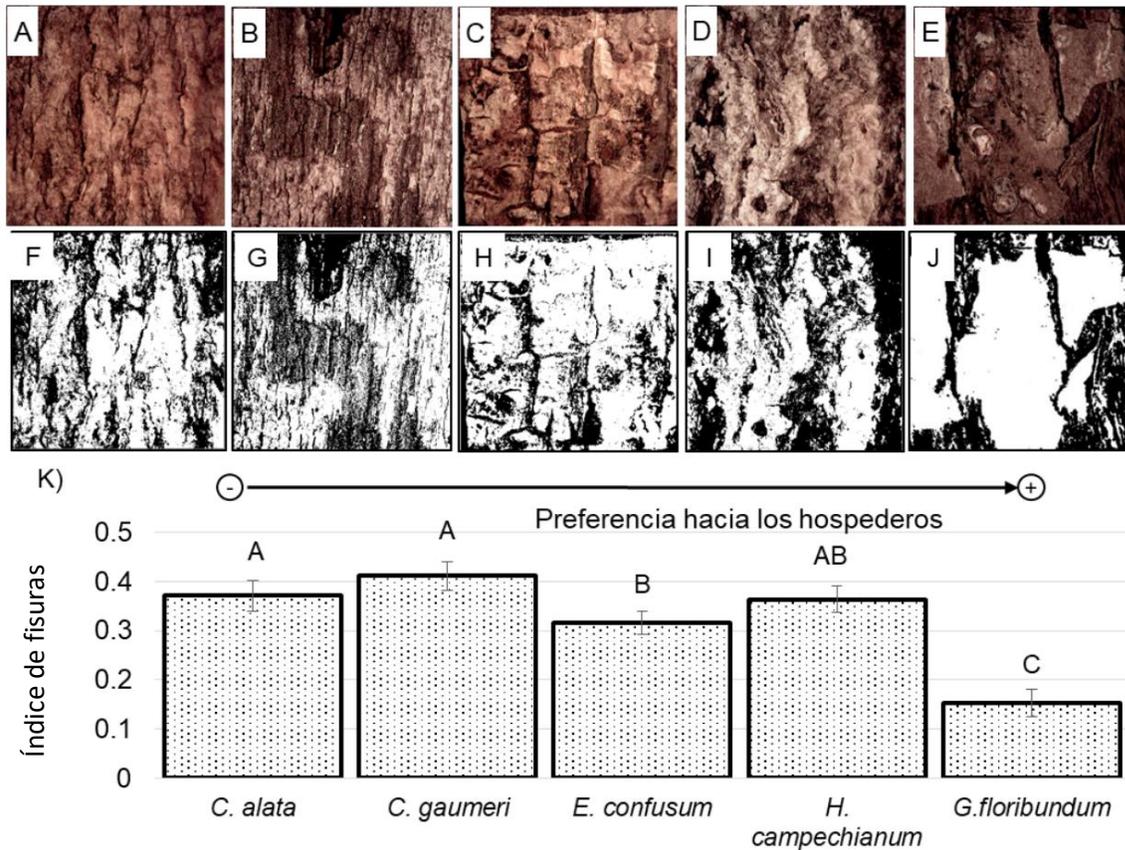


**Figura 18.** Frecuencia orquidal en los forófitos analizados.

Nuestro nuevo método para calcular el índice de fisuración (IF) cuantitativamente, relacionado con la rugosidad de la corteza, (Figura 19 A-J) demostró que hay diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en el IF calculado para las cortezas de las diferentes especies de forófito. Las cortezas que presentan mayor superficie fisurada son propias de las especies *C. Gaumeri*, *C. Alata*, y *H. campechianum* ( $0.36 \pm 0.02$ ,  $0.41 \pm 0.02$ , respectivamente). *E. confusum* mostró valores intermedios de IF de  $31.63 \pm 2.40$  y *G. floribundum* fue el forófito con mayor presencia de carga orquidal pero interesantemente presentó valores de IF muy bajos ( $0.15 \pm 0.02$ ) (Figura 19K).

Nuestro procedimiento para evaluar el índice de fisuración fue similar al reportado para cortezas de forófitos de líquenes (McDonald *et al.*, 2017), el cual emplea una calca sobre la corteza del forófito que solo captura las fisuras que se logran imprimir sobre el papel. Al emplear micrografías obtenidas por microscopía óptica estereoscópica, nuestro método ofrece mayores detalles y mayor precisión sobre el cálculo del índice de fisuración (IF). Por otra parte, el método para líquenes no cuantifica la profundidad de la fisura lo cual es un factor que podría ayudar a calcular el potencial de hídrico considerando un plano de referencia y la superficie de la corteza (Sioma *et al.*, 2018).

Nuestros análisis de IF sugieren que la preferencia de las orquídeas hacia el forófito no está determinada por la rugosidad de la corteza. Por esto, el estudio exploró otras características físicas de la corteza que pudieran estar influyendo sobre la preferencia de las orquídeas hacia los árboles hospederos, como la capacidad de absorción de agua y capacidad de retención de humedad, las cuales se evaluaron a continuación.



**Figura 19.** Índice de fisuras. A-E) Micrografías obtenidas por microscopía de luz para el desarrollo del nuevo protocolo para estimar el índice de fisuras. F-J) Micrografías monocromáticas de la corteza obtenidas por el procesamiento en el software GIMP. F) *C. alata*, G) *C. gaumeri*, H) *E. confusum*, I) *H. campechianum*, J) *G. floribundum*. K) Índice de rugosidad (IR). Se observa una correlación negativa entre el índice de fisuras y la frecuencia orquidal en todos los forófitos analizados.

#### 6.4.3 Capacidad de absorción y retención de agua

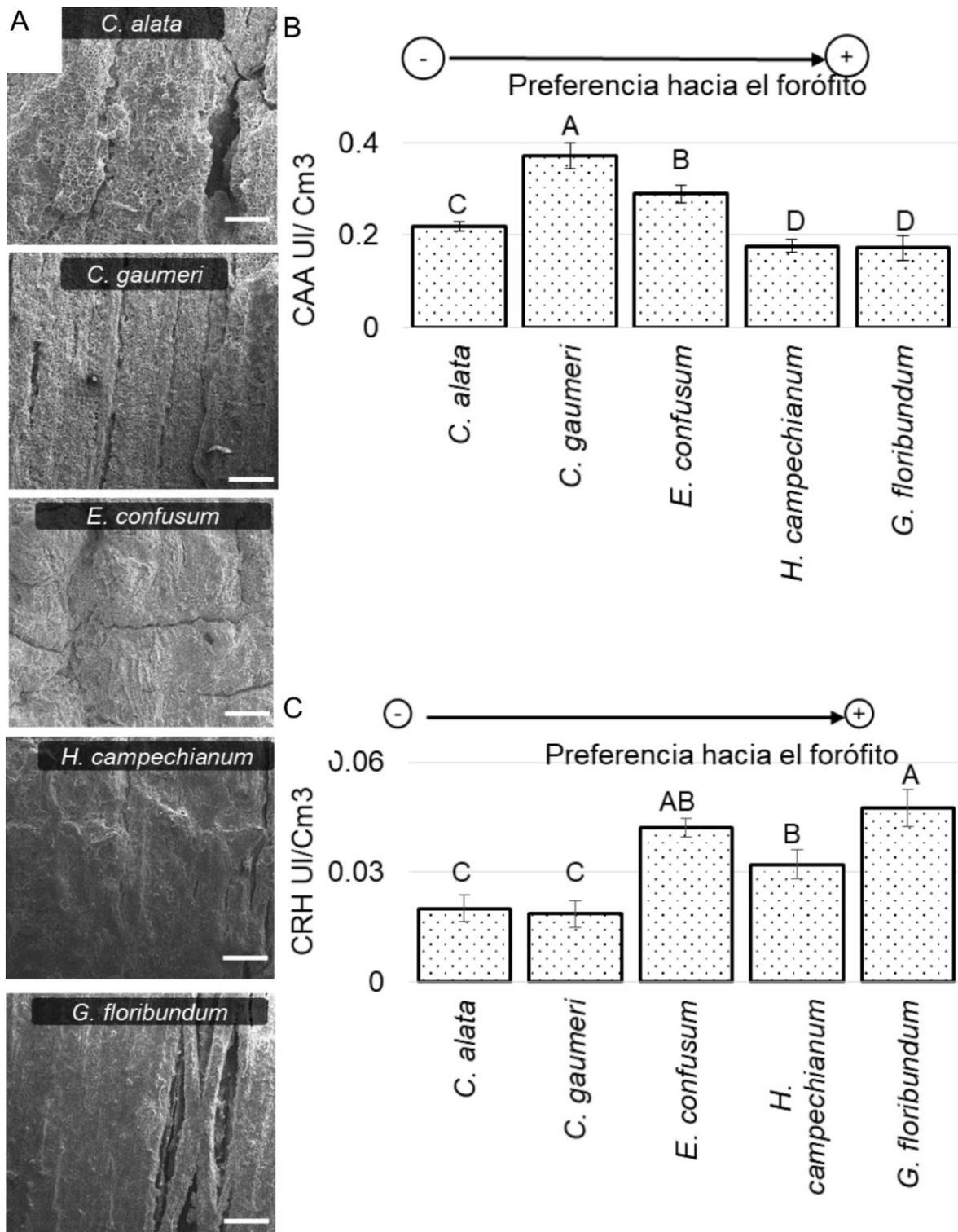
La capacidad de absorción de agua (CAA) fue evaluada en todos los forófitos de ambas zonas de estudio (Figura 20A). Los datos mostraron que las especies con la mayor cantidad de frecuencia de orquídeas presentes, *H. Campechianum* y *G. Floribundum*, poseen los niveles más bajos de CAA:  $0.17 \pm 0.014 \mu\text{l}/\text{cm}^3$  y  $0.17 \pm 0.02 \mu\text{l}/\text{cm}^3$ , respectivamente (Figura 20B). Interesantemente, los valores más altos de CAA fueron

encontrados en 2 hospederos que presentan una menor cantidad de frecuencia de orquídeas identificados previamente *C. gaumeri* y *C. alata*.

La humedad de la corteza es un factor principal para el establecimiento de las epífitas al funcionar como una reserva de agua pluvial para la zona radical de las epífitas (Valova y Sieleszova, 2008; Rosell y Olson, 2014). Aquí los análisis de CAA no mostraron una correlación positiva entre la preferencia del forófito y la cantidad máxima de agua en la corteza, tampoco con un mayor índice de fisuras. Esto pudiera sugerir que el relieve de la corteza no determina positivamente la especificidad del forófito.

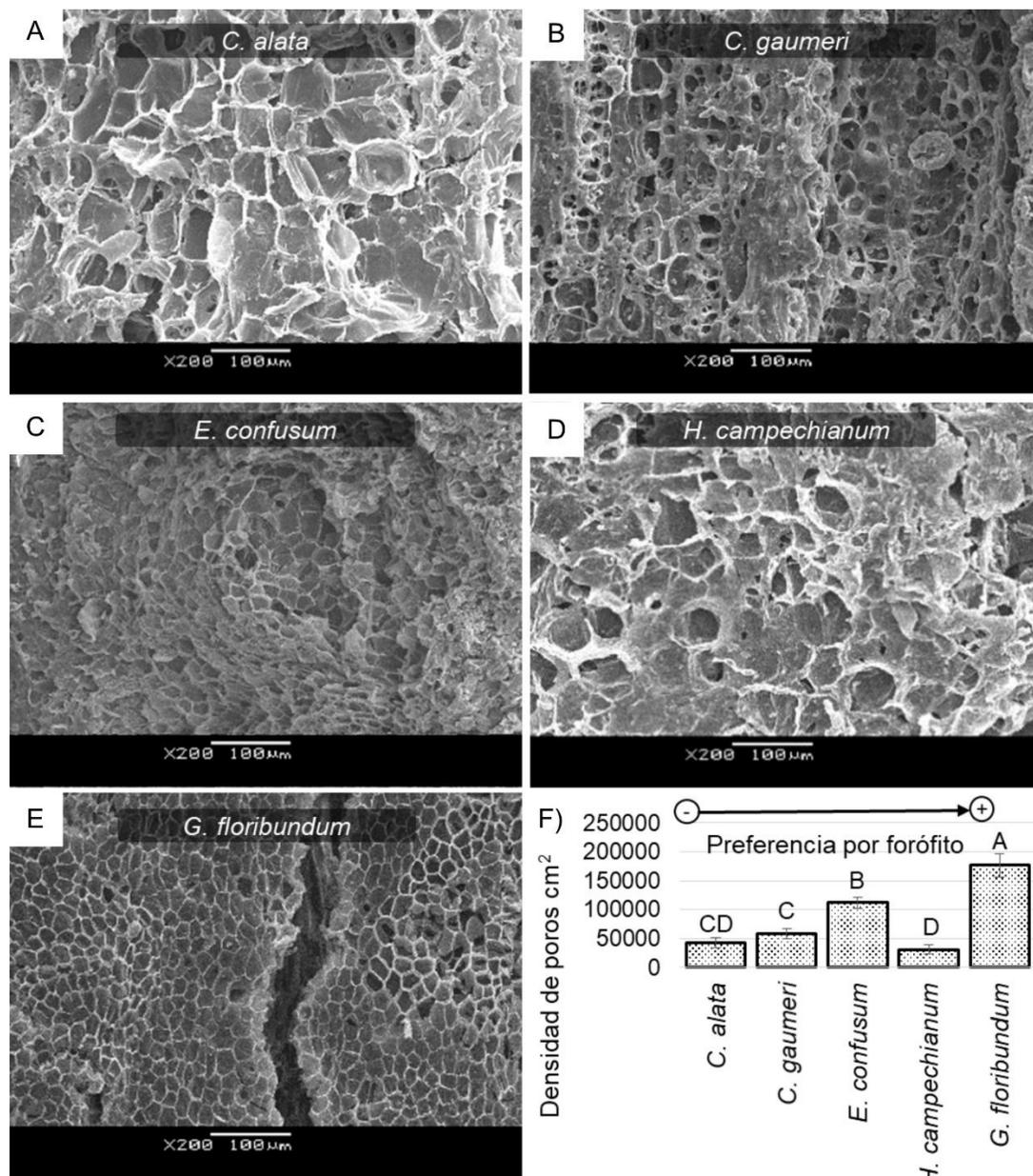
Para determinar que otras propiedades hidrológicas de la corteza que pudieran tener un efecto en la preferencia de las orquídeas se evaluó la capacidad de retención de humedad (CRH). Este parámetro es un indicador de la humedad mantenida en la corteza después de un periodo de desecamiento, y se atribuye principalmente a la porosidad del sustrato y las fuerzas físicas para adherir el agua (Owen, 2008). Los valores de CRH evidenciaron una correlación positiva entre la cantidad mínima que puede retener una corteza después de drenar y la preferencia por el hospedero (Figura 20C). Los forófitos más preferidos por las orquídeas mostraron una mayor capacidad de retención de agua (10 % aproximadamente), mientras que aquellos con la presencia de orquídeas más baja mostraron los valores de CRH más bajos (*C. alata* and *C. gaumeri*). Estos resultados concuerdan con estudios previos. Callaway *et al.* (2002) halló en los forófitos preferidos *C. laevigata* y *Q. virginiana*, un 14 % de agua retenida después del periodo de desecamiento; las relaciones hídricas de la corteza mostraron patrones similares, pero las diferencias entre forófitos con mayor preferencia y menor no fueron altamente significativos.

Estos datos sugieren que la cantidad de agua que puede ser retenida por la corteza durante un periodo de desecamiento (Granados-Sánchez et al., 2003), aparentemente es más importante que la cantidad máxima que puede absorber y pudiese ser un factor determinante en la especificidad hacia los forófitos.



**Figura 20.** Micro relieve de la corteza y la humedad en la corteza. A) Microestructura de la corteza visualizada con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) barra=500 µm. B) Capacidad de absorción de agua. C) Capacidad de retención de humedad (CRH).

Para analizar cómo la corteza del forófito con mayor CRH presenta una mayor preferencia por las orquídeas, se realizó un análisis de ultra resolución de la corteza usando MEB (Figura 21A). Los resultados indican que *G. floribundum* fue el forófito con mayor cantidad de poros por cm<sup>2</sup> seguido de *E. Confusum*; *C. Alata* y *C gaumeri*; los árboles que poseían una menor carga orquidal presentaron también la menor cantidad de poros en su corteza, excepto *H. campechianum* que obtuvo la menor cantidad de poros, pero, alojó una gran cantidad de orquídeas (Figura 21B). Se ha reportado que la capacidad de retención de agua está determinada por la porosidad de la corteza (Johansson, 1974). Los resultados entre las características de la ultra estructura y la retención de agua mostraron la existencia de una relación positiva. Las cortezas con mayor capacidad de retención de agua también mostraron una mayor densidad de poros; la propiedad de cohesión del agua podría explicar por qué las cortezas de forófitos con más poros pueden retener más agua (Anne-Marrie *et al.*, 2004).



**Figura 21.** Porosidad de la corteza y la especificidad hacia los forófitos. A-E) Micro morfología de las cortezas de los forófitos mediante análisis MEB. Morfología de los poros, F) Densidad de poros obtenida mediante las microfografías de MEB.

## 6.5 Dinámica de adhesión de la raíz a la corteza

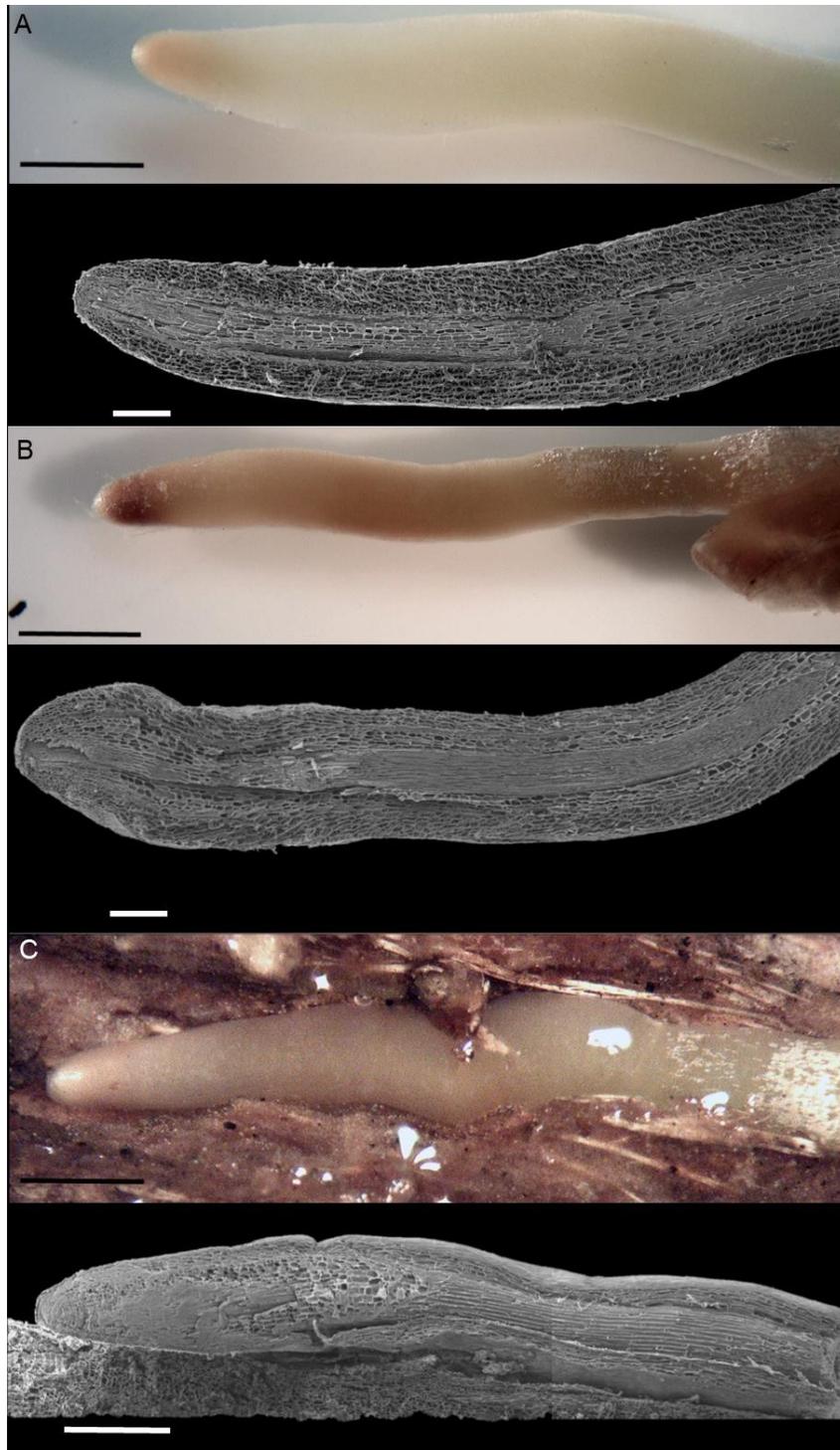
### 6.5.1 Morfología y anatomía de la raíz durante el crecimiento

La dinámica de crecimiento de raíces de epifitas ha sido estudiada escasamente. El presente estudio adaptó la clasificación reportada para la planta trepadora *Hedera helix* Lowe (Melzer *et al.*, 2010; Lenaghan y Zhang, 2012). Las raíces adventicias de la orquídea modelo evaluada *E. alata*, presentan tres etapas de desarrollo durante el proceso de adhesión a la corteza del forófito las cuales se muestran a continuación:

1. Etapa 1: el ápice de la raíz crece hasta llegar a la corteza; la raíz presenta una coloración clara y translúcida en contraste con el ápice el cual es opaco, Las micrografías de MEB mostraron en esta etapa la existencia de poros en la pared del velamen (Figura 22A).
2. Etapa 2: la raíz muestra una curvatura en dirección al sustrato. En el momento que la corteza entra en contacto con el ápice de la raíz, se confiere una señal para iniciar la etapa tres.
3. Etapa tres: la punta de la raíz adventicia continúa su crecimiento paralelamente al sustrato, e induce la formación de más raíces adventicias. En las etapas 2 y 3 se logró observar mayor opacidad de la epidermis (inicio en la formación del velamen) y cambios en la coloración de la raíz (Etapa 2 y 3) (Figura 22B y 22C).

Algunos autores Tattini *et al.*, (2000); Tattini *et al.*, (2005); Chomicki *et al.*, (2015) indican que la raíz madura puede incrementar su tolerancia a la luz UV-B mediante la acumulación de flavonoides en las estratos corticales exteriores. Esto puede explicar algunos de los cambios observados en la coloración de las raíces a medida que la raíz madura.

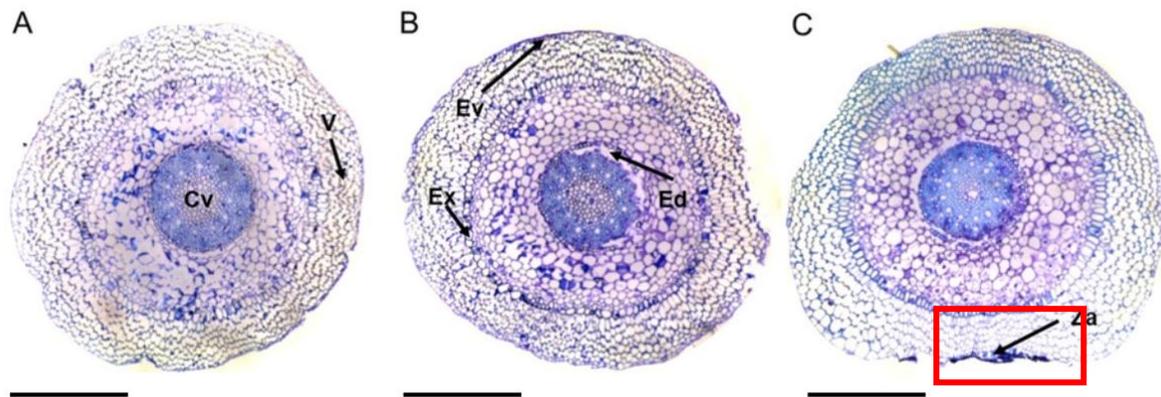
El velamen se deriva del protodermo mediante divisiones periclinales. Las células de este último, que son alternativamente largas y cortas, se vacuolan por primera vez y, por lo tanto, marcan claramente el límite interno del velamen (Engard, 1944).



**Figura 22.** Desarrollo de la raíz de *Encyclia alata* (Bateman) Schltr y la interacción con la corteza de *Gymnopodium floribundum* Rolfe. Estereoscopia y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) en vista longitudinal. A) Raíz a los 7 días, B) Raíz a los 14 días, C) Raíz en adhesión a los 21 días. Barra= 2mm. MEB Barra: A) 500  $\mu$ m; B) 500  $\mu$ m; C) 1mm. Estereomicroscopio Nikon SMZ800.

### 6.5.2 Crecimiento secundario de la raíz durante el proceso de adhesión

Para evaluar la existencia de crecimiento primario y secundario en los tejidos que componen la raíz en las diferentes etapas de desarrollo durante su establecimiento sobre la corteza del forófito, se realizaron cortes histológicos transversales teñidos con Azul de Toluidina O. En las tres etapas analizadas, las paredes celulares primarias en parénquima y el velamen se tiñeron de color rosado púrpura, las paredes celulares secundarias se tiñen de azul como en el caso del xilema, y la endodermis y exodermis teñidas en azul (Figura 23). Interesantemente, algunas células del velamen en la última etapa de desarrollo mostraron color azul, sugiriendo la existencia de un crecimiento secundario (Recuadro rojo en figura 23C).



**Figura 23.** Tinción con azul de Toluidina de las secciones transversales de raíz de *E. alata* (Bateman) Schltr. A) Raíz etapa 1, B) Raíz etapa 2, C) Raíz etapa 3. Se indican las posiciones del Velamen (V), Epivelamen (Ev), Cilindro vascular central (Cv), Exodermis (Ex), Endodermis (Ed), Zona de adhesión (Za). Barra= 500  $\mu$ m. Estereomicroscopio Leica M165C.

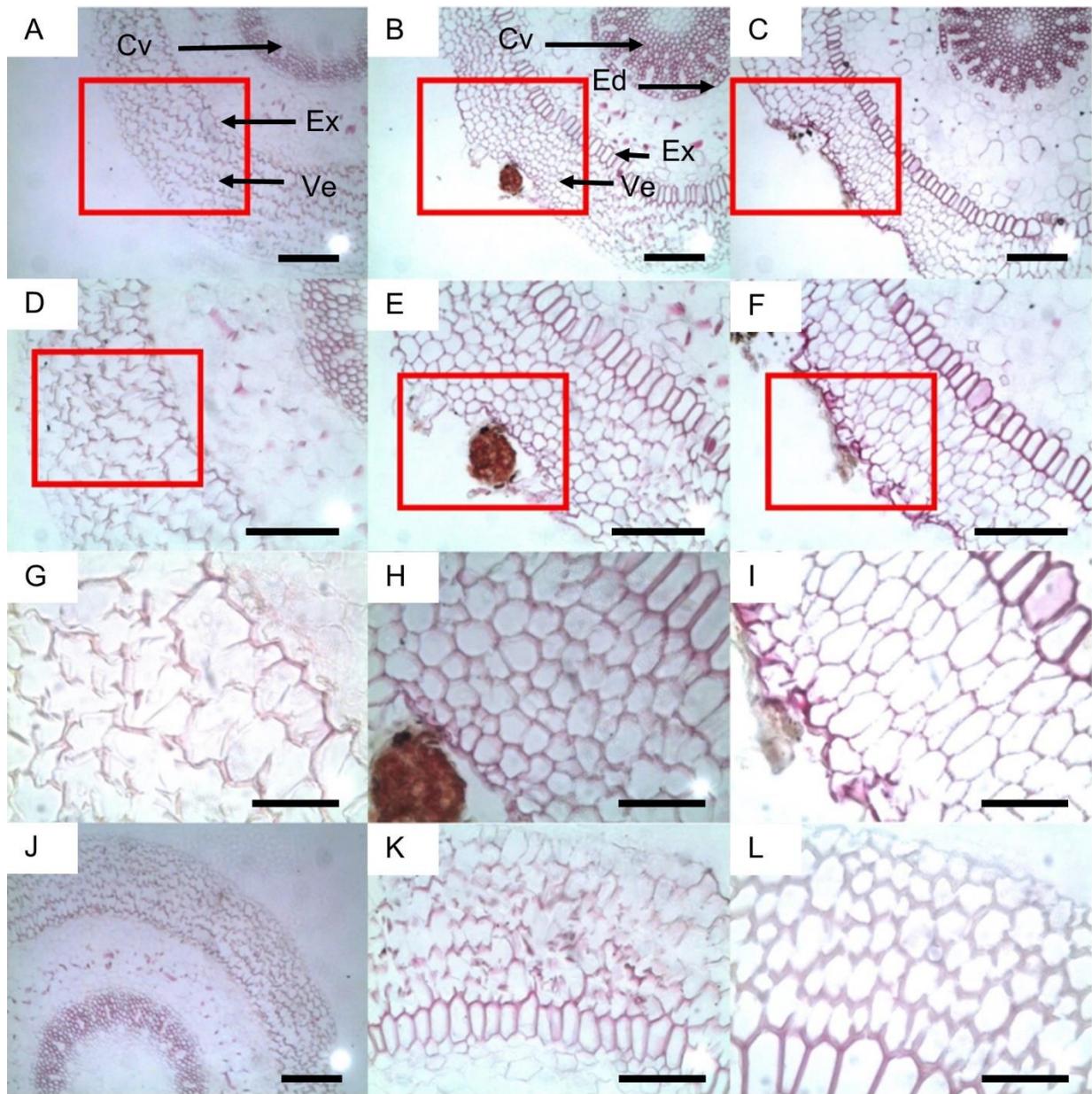
La presencia de células con engrosamientos de pared en la corteza es interpretada típicamente como una mejora en el soporte mecánico durante la desecación y retención de agua, y está relacionado con la acumulación de lignina (Joca *et al.*, 2017). Algunos autores sostienen que en orquídeas existen células lignificadas en la exodermis las cuales constituyen una barrera apoplástica que en conjunto con el velamen, ofrecen protección mecánica y evitan que el agua regrese de la corteza al ambiente externo (Ma y Peterson, 2003; Joca *et al.*, 2017). En el velamen, las paredes celulares engrosadas están compuestas por largas hebras de celulosa formando una malla. Los poros, visualizados en nuestro primer análisis por MEB (Figura 21 A-E) que aparecen en la pared celular representan áreas que no están engrosadas (Idris, 2015).

### **6.5.3 Acumulación ectópica de lignina en la zona de interacción raíz-corteza.**

Para determinar la naturaleza del crecimiento secundario, probablemente acumulación de lignina, los cortes histológicos de las diferentes etapas se tiñeron ahora con la técnica de Wiesner (Figura 24) y también fueron visualizados con un microscopio confocal laser de barrido (Figura 25).

Las tinciones con fluoroglucinol-HCL revelaron un aumento en el contenido de los aldehídos de lignina (color rojo) en células del epivelamen (Figura 24C) que mostraron pared secundaria por Azul de Toluidina corroborado con la técnica Histoquímica de fluoroglucinol. En la zona de contacto (epivelamen + corteza) los tejidos del epivelamen presentan una mayor concentración de lignina, en contraste con los mismos tejidos en raíces jóvenes (Figura 24 F, I) (Yang *et al.*, 2013).

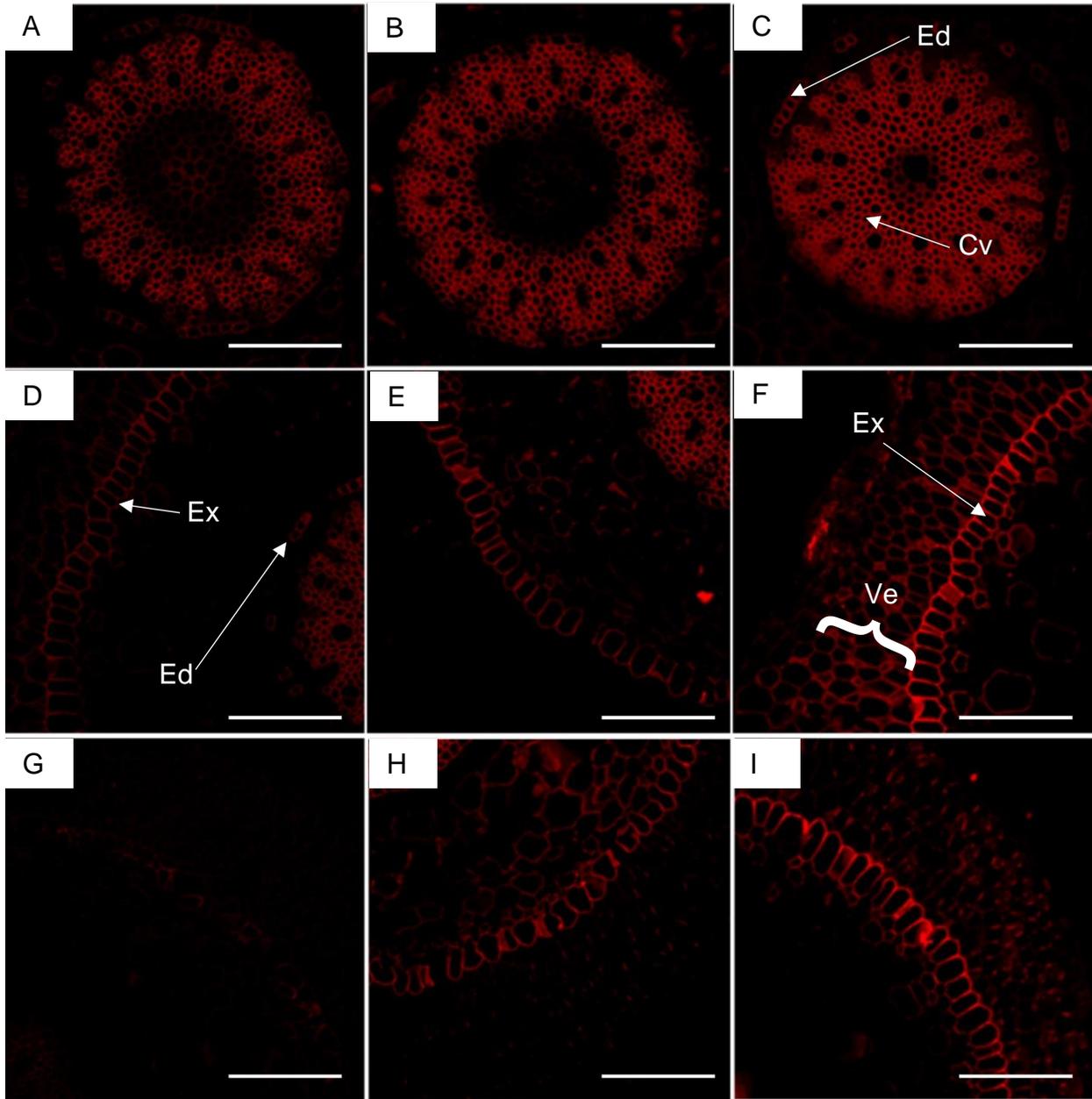
La técnica del floroglucinol es capaz de identificar los grupos terminales de cinamaldehídos (Anderson *et al.*, 2015)). Se ha reportado que la epidermis de la raíz *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. no existen cinamaldehídos (por lo tanto, no se colorean) a menos que exista una lignificación ectópica (Zhong *et al.*, 2000). La raíz de *E. alata* muestra coloraciones diversas en la epidermis y específicamente una mayor intensidad en la zona de adhesión, lo cual sugiere una lignificación ectópica resultado de la interacción de la raíz con la corteza (Figura 24).



**Figura 24.** Histoquímica de lignina con floroglucinol-HCl en cortes transversales de raíz de *Encyclia alata* (Bateman) Schltr. A, D, G, J) Raíz etapa 1; B, E, H, K) Raíz etapa 2; C, F, I, L) Raíz etapa 3. A-C) Se muestra presencia de lignina en las paredes de las células del velamen (Ve), endodermis (Ed), exodermis (Ex) y cilindro vascular (Cv). Se observa detalladamente la presencia de lignina con una mayor concentración en raíces de etapa 3 en la zona de adhesión (I). (J-L) Velamen sin contacto adherente. Barra: (A, B, C, J) 200  $\mu$ m; (D-F) 150  $\mu$ m; (G, H, I, K, L) 75  $\mu$ m. Cuadro rojo indica zoom al velamen en zona de adhesión. Microscopio compuesto Leica DM2000

Mediante una excitación de láser de 488 nm con una emisión de 500 a 610 nm con la microscopia confocal obtuvimos visualización directa de la lignina y su distribución en las diferentes regiones anatómicas de la raíz (Decou *et al.*, 2017) tales como: endodermis, exodermis, xilema y zona de contacto (Figura 25). Este patrón de acumulación es congruente con lo observado con el análisis con la tinción con fluoroglucinol. La autofluorescencia (excitación 488 nm y emisión 500 a 610 nm) de las paredes celulares lignificadas por xilema ha sido previamente reportada en diferentes especies vegetales como *Fraxinus ornus* L., *Myrtus communis* L., *Olea europaea* L. (De Micco y Aronne, 2007).

La variación de la intensidad de autofluorescencia dentro de las paredes celulares en el velamen fue prominente cuando fueron excitados a 488 nm. El nivel de lignificación fue variable de acuerdo a cada una de las 4 etapas de desarrollo de la raíz, durante el proceso de adhesión a la corteza del forófito (Figura 25). La autofluorescencia observada en la región del xilema (Figura 25D-F) validó el protocolo usado en el software del microscopio laser confocal de barrido. En las células cercanas a la zona de adhesión, las paredes se encuentran más lignificadas que las que no están en contacto, (Figura 25G-I). Esta lignificación ocurre inicialmente en el primer estrato que entra en contacto con la zona de adhesión y luego avanza de forma gradual a los siguientes estratos de células, en dirección hacia la endodermis. En contraste, no existe la misma actividad en otras regiones de la raíz, que no están en contacto con la zona de adhesión (Figura 25J-L).

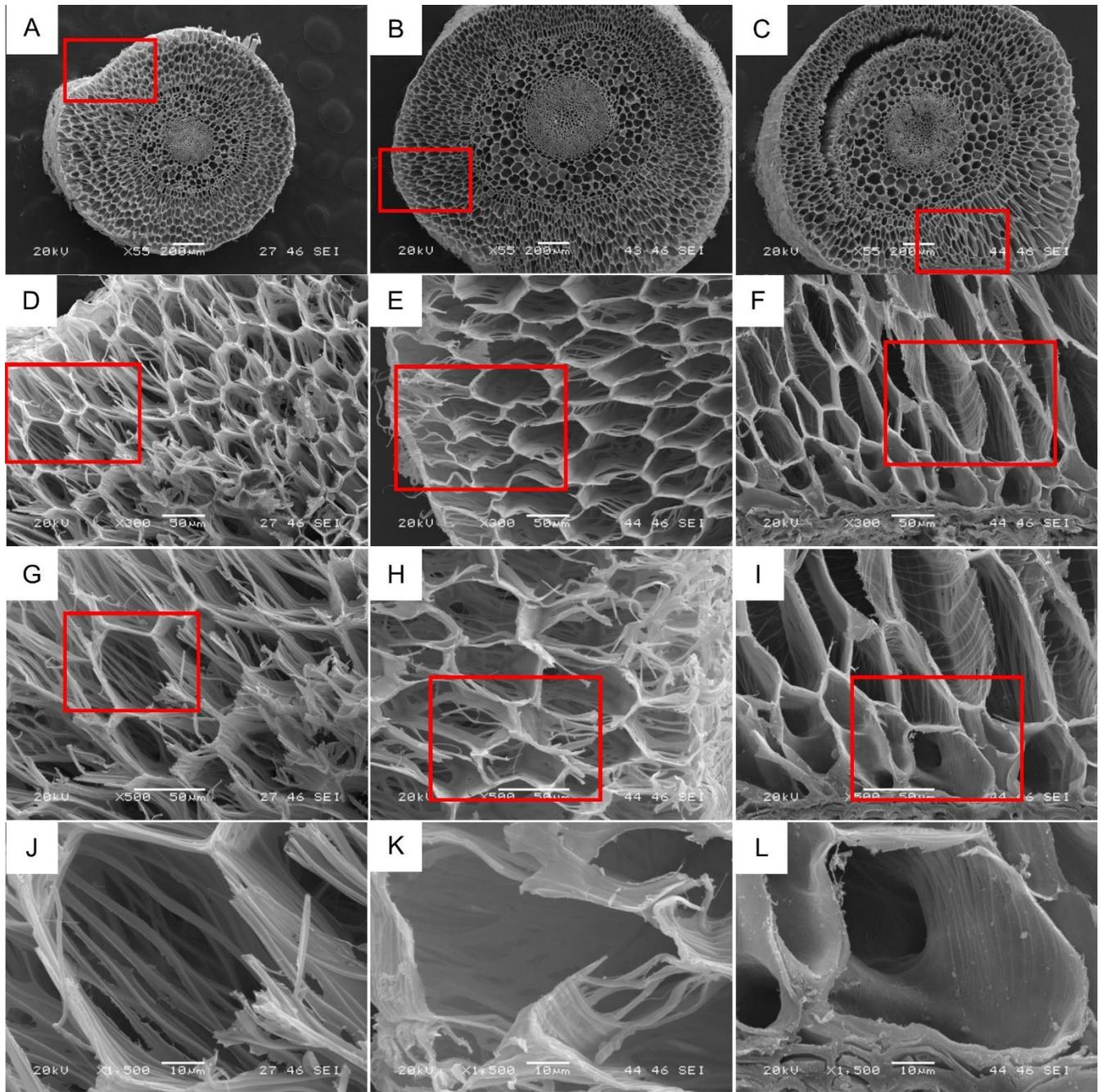


**Figura 25.** Autofluorescencia de lignina en cortes transversales de *Encyclia alata* (Bateman) Schltr. Excitación 488 nm, Emisión 500 a 610 nm. A, D, G) Raíz etapa 1; B, E, H) Raíz etapa 2; C, F, I) Raíz etapa 3; A, B, C) Cilindro vascular central; D, E, F) Zona de adhesión al forófito, J-L) Zona sin contacto a la corteza. Barra=200nm Se indican las posiciones del Velamen (Ve), Cilindro vascular central (Cv), Exodermis (Ex), Endodermis (Ed). Microscopio laser confocal Zeiss AXIO Imager.Z2

#### **6.5.4 Cambios de las paredes celulares próximas a la zona de adhesión**

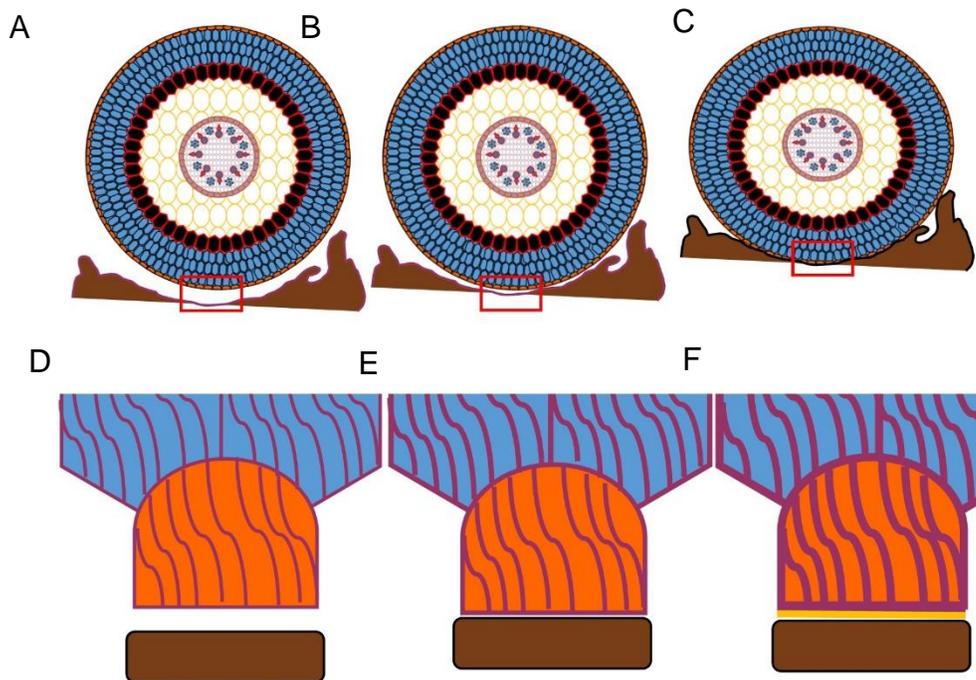
Con la técnica de MEB se observaron los cambios en la morfología de los engrosamientos en forma de estrías de la pared celular del epivelamen, durante el establecimiento de la raíz sobre la corteza. (Figura 26). El proceso de engrosamiento de las estrías de la pared, fue de manera gradual resultado de la acumulación de celulosa y lignina mencionada previamente. Durante la etapa 1 las estrías presentan un diseño definido (Figura 27J), Las bandas son anchas con los ejes largos, son paralelas, no ramificadas y no se cruzan (Sanford y Adanlawo, 2008). A medida que las etapas de adhesión avanzan, las estrías se multiplican formando estructuras más complejas que revisten completamente a la pared celular (Figura 27K, L), formando barreras celulares gruesas entre célula y célula.

El velamen de *E. alata* presenta una rizodermis de seis estratos celulares, que pueden estar correlacionados con el grosor de este tejido, sin embargo sus células varían de acuerdo a su tamaño, influenciado por el estado de desarrollo y la interacción con la zona de contacto. Los diferentes reportes sostienen que la variación en el grosor del velamen en orquídeas puede ocurrir debido al número de estratos celulares, la tasa de maduración, el tamaño de la célula, los patrones de engrosamientos parietales y a la configuración genética. (Joca *et al.*, 2017; Pedroso-de-Moraes, *et al* 2017).



**Figura 26.** Engrosamiento de las paredes del velamen en raíz de *Encyclia alata* (Bateman) Schltr. A, D, G, J) Raíz etapa 1; B, E, H, K) Raíz etapa 2; C, F, I, L) Raíz etapa 3. Cuadro rojo: ampliación de mayor detalle.

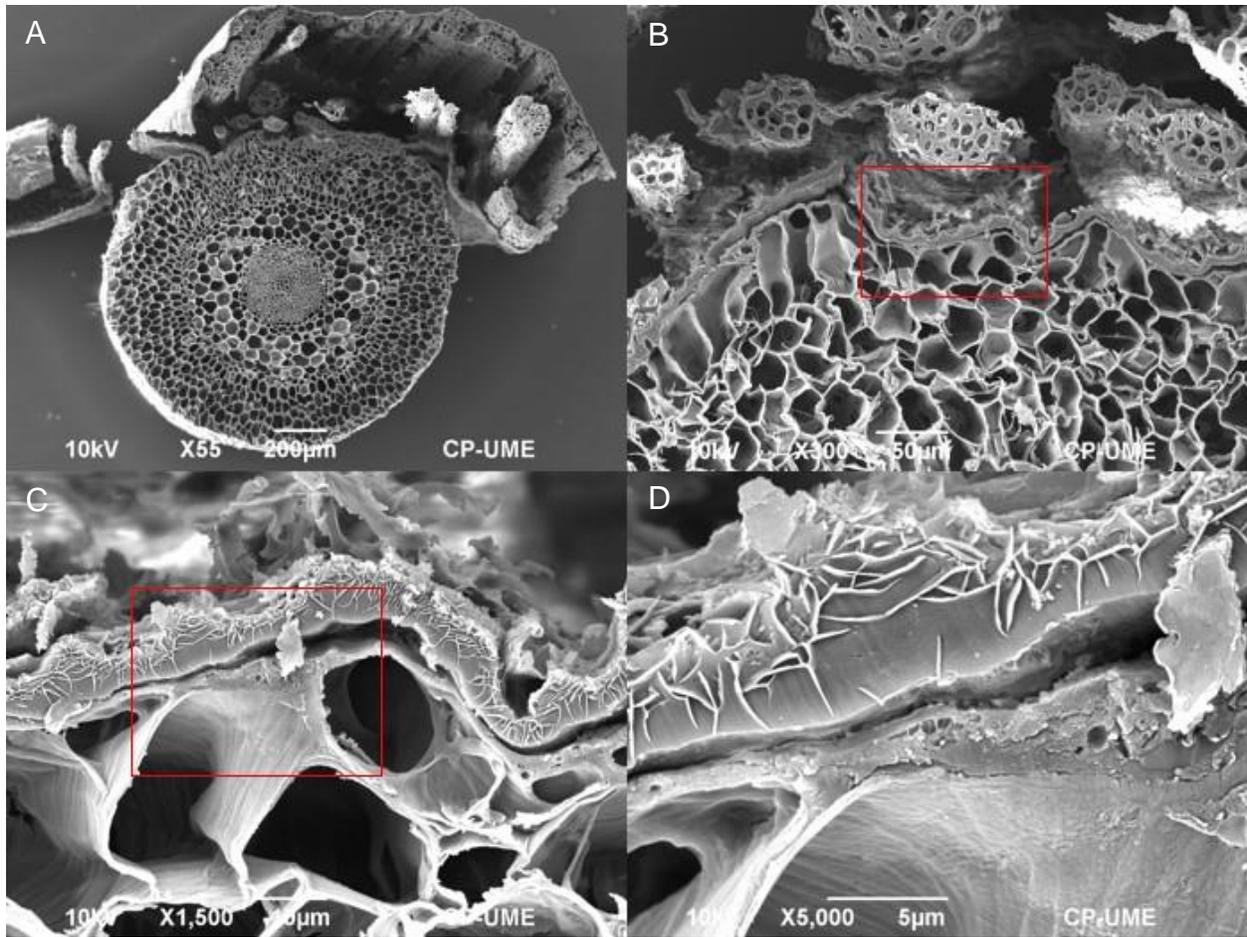
Los resultados en conjunto muestran que la acumulación de lignina es una respuesta a la dinámica de adhesión de la raíz, la cual ocurre de manera específica en la zona de contacto, este efecto, solo se han reportado para madera de compresión (Donaldson *et al.*, 2010; Donaldson y Radotik, 2013). Para nuestro caso, sugerimos que la deposición ectópica de lignina pudiera ser una respuesta a la compresión de los tejidos sobre la zona de adhesión (Figura 27). El revestimiento ocasionado en las estrías de las paredes del epivelamen y los siguientes estratos de velamen durante las diferentes etapas de adhesión (Figura 27C), pudiese conferir cierto grado de resistencia a las fuerzas de compresión incidentes en estos estratos de células.



**Figura 27.** Revestimiento de las paredes y las estrías en las células próximas a la zona de contacto. A) Raíz de 3 días, B) Raíz de 7 días, C) Raíz de 14 días. D) Célula del velamen sin contacto con la zona de adhesión, E) Contacto en la corteza del forófito, F) Aumento en el engrosamiento reticulado del velamen y deposición de sustancias en la zona de adhesión. Se muestra en morado las estrías de la pared

### 6.5.5 Morfología de la zona de contacto

La ultraestructura de la región entre el epitelio y la corteza (zona de contacto o zona de adhesión) fue analizada con técnicas de MEB (Figura 28). En esta se encontró la presencia de sustancias acumuladas que sugerimos puede ser un “adhesivo orgánico”, el cual puede estar siendo liberado mediante secreciones en la superficie de la epidermis de la raíz, que pueden conferir firmeza y anclaje a la raíz. Las evidencias para las secreciones adhesivas de raíces adventicias hasta ahora se han limitado en hiedras, el cual fue un descubrimiento inicial de Darwin de un "fluido viscoso" secretado de la superficie de las raíces adherentes (Darwin, 1875). Diversos autores marcan la existencia de nano partículas presentes en las superficies, donde había una adhesión por parte del sistema radical de *H. helix* (Zhang *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2010). Estas partículas a su vez confieren un mayor anclaje que otros adhesivos en otras especies de plantas (Huang *et al.*, 2013). En cambio, algunos otros factores, como la reticulación, deben ocurrir para generar tal fuerza adherente.



**Figura 28.** Estructura de la zona de contacto entre *Encyclia alata* (Bateman) Schltr y *Gymnopodium floribundum* Rolfe. A) Raíz en etapa 3 adherida a la corteza del forófito. B) Zona de adhesión; C) Engrosamiento de la pared del epivelamen en zona de contacto; D) Capa de sustancias adhesivas entre el epivelamen y el ritidoma del forófito.

## VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 7.1 Conclusiones

- Los análisis de las propiedades físicas de la corteza (capacidad de retención de humedad y porosidad), sugiere que estos son factores determinantes sobre la especificidad del forófito. Debido a que la interacción se lleva a cabo en la corteza es más propio referirse a este suceso como especificidad de la corteza o del ritidoma.
- El método generado para la cuantificación del grado de fisuración de la corteza es útil para proporcionar información detallada y con una menor variación observada que con otros métodos convencionales
- El proceso de establecimiento de la raíz sobre la corteza promueve la acumulación ectópica de lignina en la pared del epivelamen, en regiones próximas a la zona de adhesión.
- Las sustancias depositadas entre el epivelamen y la corteza secundaria o súber, pueden estar encargadas de proporcionar adhesión a la raíz y posiblemente confieren una mayor fuerza de anclaje a la planta.
- La metodología integral de diversas técnicas de microscopia de luz, histoquímica y microscopia electrónica de barrido fue efectiva en la búsqueda de respuesta a los aspectos que hasta el momento se mantenían desconocidos en cuanto al desarrollo y respuesta al ambiente de las orquídeas.

## 7.2 Perspectivas

- Los estudios de la porosidad de la corteza bajo nuestro enfoque aún son poco comunes, por lo que es necesario aplicar estas metodologías en el estudio de diferentes forófitos a fin de proporcionar nueva información con mayor robustez, que pudiera fortalecer el conocimiento de la dinámica de la selección de epífitas.
- Es necesario el desarrollo de nuevos modelos de adhesión, que integren el papel que desempeñan los compuestos que se depositan entre la raíz y el ritidoma de los forófitos.
- Seguir avanzando en el conocimiento del desarrollo de la raíz sobre la corteza, estudiando por ejemplo la dinámica de los gránulos de almidón en el gravitropismo de la raíz de orquídeas y su papel en el censado del sustrato, y el flujo de auxinas y su función en la raíz durante en las etapas de adhesión al forófito.

## VIII. LITERATURA CITADA

Adhikari, Y. and Fischer, A. 2012. Distribution pattern of the epiphytic orchid *Rhynchostylis retusa* under strong human influence in Kathmandu valley, Nepal. *Botanica Orientalis: Journal of Plant Science*. 8 (1): 90-99.

Adhikari, Y.P. Fischer, H.S. Fischer, A. 2012. Host tree utilization by epiphytic orchids in different land-use intensities in Kathmandu Valley, Nepal. *Plant Ecology*. 213 (9): 1393-1412.

Adhikari, Y.P. Fischer, A., Fischer, H.S. Rokaya, M.B. Bhattarai, P. Gruppe, A. 2017. *Journal of Mountain Science*. 14 (6): 1065-1075.

Adler, E. 1997. Lignin chemistry—past, present and future. *Wood Science and Technology*. 11 (1): 169.

Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. Walter, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science.

Albert, V. and Carretero-Paulet, L. 2014. A genome to unveil the mysteries of orchids. *Nature genetics*. 47 (1): 3-4.

Albinsson, B. Li, S Lundquist, K. Stomberg, R. 1999. The origin of lignin fluorescence, *Journal of Molecular Structure*. 508 (1–3): 19-27.

Anna, I. y Jarosław, K. 2014. Hydrological properties of bark of selected forest tree species. Part I: the coefficient of development of the interception surface of bark. *Trees*. 28 (1): 831.

Anderson, N. A. Tobimatsu, Y. Ciesielski, P. N. Ximenes, E. Ralph, J. Donohoe, B. S. Ladisch, M. Chapple, C. 2015. Manipulation of Guaiacyl and Syringyl Monomer Biosynthesis in an *Arabidopsis* Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase Mutant Results in Atypical Lignin Biosynthesis and Modified Cell Wall Structure. *The Plant cell*. 27 (8): 2195-209.

Arditti, J. 1966. Orchids *Scientific American* 214 (1): 70–78.

Asmida, I. Akmal, A. W. N. Latif, M. T. Nizam, M. Rusop, M. Rafiq Z. A. Ihsanalwi D. D. Normas S. F. Alwi, I. 2016. Atmospheric air pollution and roughness of bark as possible factor in increasing density of epiphytic terrestrial algae. *Asian Journal of Applied Sciences*. 04 (1): 256-261.

Barretta-dos-Santos, L. and Sant'Ana, J. Petini-Benelli, A. Pedroso-de-Moraes, C. 2015. Root anatomy of *Galeandra leptoceras* (orchidaceae). *Lankesteriana International Journal on Orchidology*. 15 (2): 159-165.

Barros, J. Serk, H. Granlund, I. Pesquet, E. 2015. The cell biology of lignification in higher plants, *Annals of Botany*. 115 (7): 1053–1074.

Benavides, A. Vasco, A. Duque, A. Duivenvoorden, J. 2011. Association of vascular epiphytes with landscape units and phorophytes in humid lowland forests of Colombian Amazonia. *Journal of Tropical Ecology*. 27 (3): 223-237.

Benzing, D. H. 1987. Vascular Epiphytism: Taxonomic Participation and Adaptive Diversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 74 (2): 183.

Benzing, D. 1990. *Vascular Epiphytes: General Biology and Related Biota*. Cambridge University Press.

Boerjan, W. Ralph, J. Baucher, M. 2003. Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*. 54 (1): 519-546.

Bray D. 2000 Critical Point Drying of Biological Specimens for Scanning Electron Microscopy. *Supercritical Fluid Methods and Protocols. Methods In Biotechnology*. Humana Press. 13 (1): 235-243.

B. Melzer, T. Steinbrecher, R. Seidel, O. Kraft, R. Schwaiger, T. Speck. 2010 The attachment strategy of English ivy: a complex mechanism acting on several hierarchical levels, *Journal of The Royal Society Interface*. 7 (50): 1383–1389.

Callaway, R. M. Reinhart, K. O. Moore, G. W. Moore, D. J. Pennings, S. C. 2002. Epiphyte host preferences and host traits: mechanisms for species-specific interactions. *Oecologia*. 132 (2): 221-230.

Cardelú's C. L. Zhao. Vascular epiphyte communities in the inner-crown of *Hieronima alchorneoides* and *Lecythis ampla* at La Selva Biological Station, Costa Rica. *Biotropica*. 39 (1): 171–176.

Cascante-Marín, A. Jong, M. Borg, E. D. Oostermeijer J. G. B. Wolf J. H. D Nijs J.C. M. 2006. Reproductive strategies and colonizing ability of two sympatric epiphytic Bromeliads in a tropical premontane area. *International Journal of Plant Sciences*. 167 (6): 1187-1195.

Carlsen, M. 2000. Structure and Diversity of the Vascular Epiphyte Community in the Overstory of a Tropical Rain Forest in Surumoni, Amazonas State, Venezuela *Selbyana*. 21 (1-2): 7-10.

Castro Hernández, J. C. Wolf, J. H. D, García-Franco, J. G. González-Espinosa, M. 1999. The influence of humidity, nutrients and light on the establishment of the epiphytic bromeliad *Tillandsia guatemalensis* in the highlands of Chiapas, Mexico. *Revista de Biología Tropical*. 47 (4): 763-773.

Chomicki, G. Bidel, L. P. Ming, F. Coiro, M. Zhang, X. Wang, Y. Baissac, Y. Jay-Allemand, C. Renner, S. S. 2015. The velamen protects photosynthetic orchid roots

against UV-B damage, and a large dated phylogeny implies multiple gains and losses of this function during the Cenozoic. *New Phytologist*. 205 (1): 1330-1341.

Coder D. 2014 Periderm appearance. University of Georgia Warnell School of Forestry & Natural Resources. Tree anatomy series. Publication WSFNR14-14. 14 (14): 8.

Darwin, C. 1874. *The Movement and habits of Climbing Plants*, John Murray, London.

De Micco, V. and Aronne, G. 2007. Combined histochemistry and autofluorescence for identifying lignin distribution in cell walls. *Biotechnology & Histochemistry*. 82 (1): 209-216.

Davis, B.J. Phillips R.D. Wright M. Linde C. C. Dixon K. W. 2015. Continent-wide distribution in mycorrhizal fungi: implications for the biogeography of specialized orchids, *Annals of Botany*. 116 (3): 413–421.

Donaldson, L. A. and Knox, J. P. 2011. Localization of cell wall polysaccharides in normal and compression wood of radiata pine: relationships with lignification and microfibril orientation. *Plant physiology*. 158 (2): 642-653.

Donaldson, L. Radotić, K. Kalauzi, A. Djikanović, D. Jeremić, M. 2010. Quantification of compression wood severity in tracheids of *Pinus radiata* D. Don using confocal fluorescence imaging and spectral deconvolution. *Journal of Structural Biology*. 169 (1):106-115.

Donaldson, L. and Radotic, K. 2013. Fluorescence lifetime imaging of lignin autofluorescence in normal and compression wood. *Journal of Microscopy*. 251 (1): 178-187.

Eberhardt, T. L. 2015. Thickness and roughness measurements for air-dried longleaf pine bark. In *Proceedings of the 17th biennial southern silvicultural research conference*. e-Gen. Tech. Rep. SRS–203. Asheville, NC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station. 17 (1): 6.

Einzmann, H. J. R. Beyschlag, J. Hofhansl, F. Wanek, W. Zotz, G. (2015). Host tree phenology affects vascular epiphytes at the physiological, demographic and community level. *Annals of Botany Plants*. 7 (plu073): 1-16.

Flores-Palacios, A. and Ortiz-Pulido, R. 2005. Epiphyte Orchid Establishment on Termite Carton Trails1. *Biotropica*. 37 (1): 457-461.

Franco, P. M. A. S. Filho, J.P.L Isaias, R. D. S. 2013. Structural adaptations of two sympatric epiphytic orchids (Orchidaceae) to a cloudy forest environment in rocky outcrops of Southeast Brazil. *Revista de Biología Tropical*. 61 (3): 1053-1065.

Fowke L.C. 1995 Transmission and Scanning Electron Microscopy for Plant Protoplasts, Cultured Cells and Tissues. In: Gamborg O.L., Phillips G.C. (eds) Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer Lab Manual. Springer, Berlin, Heidelberg.

García-González, A. Riverón-Giró, F. B. González-Ramírez, I. S. Escalona, D. S.Y. Hernández, Montero, Y. y Palaci, V. E. 2016. Ecología y estructura poblacional del endemismo cubano *Tetramicra malpighiarum* (orchidaceae), en el Parque Nacional Desembarco del Granma, Cuba. *Lankesteriana*. 16 (1): 1-11.

García-González, A. y Damon, A. 2013. Abundancia, distribución en los forófitos y producción de frutos de la primera población de *Telipogon helleri* (Orchidaceae) descubierta en México. *Revista mexicana de biodiversidad*. 84 (3): 894-900.

González, H. E. Raventós, J. Mújica, B.E. Bonet, A. 2007. Estructura y ecología de la población del endemismo cu-bano *Broughtonia cubensis* (Orchidaceae), en Cabo San Anto-nio, Península de Guanahacabibes, provincia de Pinar del Río, Cuba. *Lankesteriana*. 7 (1): 469–478.

Gaskett, A.C. and Gallagher, R. V. 2018. Orchid diversity: Spatial and climatic patterns from herbarium records. *Ecology and Evolution*. 8 (1):11235–11245.

Gibson, L. J. 2012. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of the Royal Society, Interface*. 9 (76): 2749-2766.

Gowland, K.M. Wood, J, Clements, M.A. Nicotra, A.B. 2011. Significant phorophyte (substrate) bias is not explained by fitness benefits in three epiphytic orchid species. *American Journal of Botany*. 98 (1): 197-206.

Granados-Sánchez, D. López-Ríos, G. Hernández-García, M. Sánchez-González, A. 2003. Ecología de las plantas epífitas. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 9 (2): 101-111.

Hall, D. J., Skerrett, E. J. Thomas, W. D. E. 1978. Critical point drying for scanning electron microscopy: a semi-automatic method of preparing biological specimens. *Journal of Microscopy*. 113 (1): 277-290.

Hernández-Pérez, E. S. Solano, E. Ríos-Gómez, R. 2018. Host affinity and vertical distribution of epiphytic orchids in a montane cloud forest in southern Mexico. *Botanical Sciences*. 96 (2): 200-217.

Huang, Y. Lenaghan, S. C. Xia, L. Burris, J. N. Stewart, C. N. Zhang, M. 2013. Characterization of physicochemical properties of ivy nanoparticles for cosmetic application. *Journal of nanobiotechnology*: 11 (3).

Jacquemyn, H. Brys, R. Waud, M. Busschaert, P. Lievens, B. 2015. Mycorrhizal networks and coexistence in species-rich orchid communities. *New Phytologist*. 206: 1127-1134.

James, E. Altland, J. S. Owen, Jr. Jackson, B. E. and Fields J.S. 2018. Physical and Hydraulic Properties of Commercial Pine-bark Substrate Products Used in Production of Containerized Crops. *HortScience*. 53 (1):1883-1890

Jiménez-Salmerón, R. F. Valencia-Díaz, S. Toledo-Hernández, V. H. Flores-Palacios, A. 2017. Bark peeling does not explain the distribution of epiphytes between six phorophyte species of a tropical dry forest of Mexico. *Plant Ecology and Evolution*. 150 (3): 257-264.

Joca, T. A. C. Coelho, O. D. Zotz, G. Winkler, U. Pinheiro, M. A. S. F. 2017. The velamen of epiphytic orchids: Variation in structure and correlations with nutrient absorption, *Flora*. 230 (1): 66-74.

Johansen, D. A. 1940. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York

Johansson D. 1974. Ecology of vascular epiphytes in West African rain forests. *Acta Phytogeographica Suecica*. 59 (1):1 –129.

Kramer, P. J. 2012. *Water Relations of Plants*. Academic Press.

Kraus, J.E.; Arduin, M. 1997. *Manual basico de metodos em morfologia vegetal*. Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro, Seropedica. Brazil.

Laube, S. and Zotz, G. 2006. Host-specific nor Random: Vascular Epiphytes on Three Tree Species in a Panamanian Lowland Forest, *Annals of Botany*. 97 (6): 1103–1114.

Lenaghan S. C. Zhang, M. 2012. Real-time observation of the secretion of a nanocomposite adhesive from English ivy (*Hedera helix*). *Plant Science*. 183 (1):206-211.

Levia, D. F. and Herwitz, S. R. 2005. Interspecific variation of bark water storage capacity of three deciduous tree species in relation to stemflow yield and solute flux to forest soils. *Catena*. 64 (1): 117-137.

Li, J. W. Chen, X. D. Hu, X. Y. Ma, L. Zhang, S. B. 2018. Comparative physiological and proteomic analyses reveal different adaptive strategies by *Cymbidium sinense* and *C. tracyanum* to drought. *Planta*. 247 (1): 69-91.

López-Villalobos, A. Flores-Palacios, A. y Ortiz-Pulido, R. 2008. The relationship between bark peeling rate and the distribution and mortality of two epiphyte species *Plant Ecology*. 198 (2): 265- 274.

Lüttge, U. 1989. *Vascular plants as epiphytes. Evolution and ecophysiology. Ecological Studies*, Springer Berlin Heidelberg New York. 76 (1): 200-223.

Ma, F. and Peterson. C.A. 2003. Current insights into the development, structure, and chemistry of the endodermis and exodermis of roots. *Canadian Journal of Botany*. 81 (1):405-421.

- MacFarlane, D. and Luo, A. 2009. Quantifying tree and forest bark structure with a bark-fissure index. *Canadian Journal of Forest Research*. 39 (1): 1859-1870.
- Martínez, E. y Galindo-Leal, C. 2017. The vegetation of Calakmul, Campeche, Mexico: Classification, description and distribution. *Botanical Sciences*. 71 (1): 7-32.
- McDonald, L. Woudenberg, M. Dorin, B. Adcock, A. M. McMullin, R. T. Cottenie, K. 2017. The effects of bark quality on corticolous lichen community composition in urban parks of southern Ontario. *Botany*. 95 (1): 1141–1149.
- Mehltreter, K. Flores-Palacios, A. García-Franco, J. G. 2005. Host preferences of low-trunk vascular epiphytes in a cloud forest of Veracruz, Mexico. *Journal of Tropical Ecology*. 21 (1):651–660.
- Mujica, E. Raventos, J. Gonzalez, E. 2009 Análisis de la selección de sustrato por parte de *Dendrophylax lindenii* (Orchidaceae) en Cabo San Antonio, Península de Guanahacabibes, Pinar del Río, Cuba. *Lankesteriana*. 9 (1): 533-540.
- Muthukumar, T. and Shenbagam, M. 2018. Vegetative anatomy of the orchid *Bulbophyllum sterile* (orchidaceae: epidendroideae). *Lankesteriana International Journal on Orchidology*. 18 (1): 13-22.
- Oliveira, V. C. and Sajo, M. G. 1999. Root anatomy of nine orchidaceae species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 42(4): 1-9.
- O'malley, K. 2009. Patterns of abundance and diversity in epiphytic orchids on *Parashorea malaanonan* trees in Danum Valley, Sabah. *The Plymouth Student Scientist*. 2 (2): 38-58.
- Othmani, A. Piboule, A. Dalmau, O. Lomenie, N. Mokrani, S. Voon, L. F. C. L. Y. 2014. Tree Species Classification Based on 3D Bark Texture Analysis. In: Klette, R. Rivera, M. Satoh, S. 2013. *Image and Video Technology. PSIVT. Lecture Notes in Computer Science*. 8333 (1).
- Pathan, A.K. Bond, J. Gaskin, R.E. 2008. Sample preparation for scanning electron microscopy of plant surfaces—Horses for courses. *Micron*. 39 (8): 1049-1061.
- Pathan, A.K. Bond, J. Gaskin, R.E. 2010. Sample preparation for SEM of plant surfaces. *Materials Today*. 12 (1): 32-43.
- Paz-Bermúdez G, López M. E. Carballal, R. 2000. Líquenes saxícolas y terrícolas y hongos liquenícolas interesantes de la costa de Galicia (NW España). *Candollea*. 55 (1): 137-152.
- Pérez-Escobar, O.A. Chomicki, G. Condamine, F.L. Karremans, A.P. Bogarín, D. Matzke, N.J. Silvestro, D. Antonelli, A. 2017. Recent origin and rapid speciation of Neotropical orchids in the world's richest plant biodiversity hotspot. *The New phytologist*. 215 (2): 891-905.

- Pedroso-de-Moraes, C. Prezzi, L. E. De Souza-Leal, T. Canonici, T. F Raymundo, O. Silveira, P. 2015. Edge Effect on Orchids of a Fragment of Semi-Deciduous Seasonal Forest in the Southeast of Brazil. *Iheringia Serie Botanica*. 70 (1): 115-127.
- Pierce, K. B. Lookingbill, T. Urban, D. 2005. A simple method for estimating potential relative radiation (PRR) for landscape-vegetation analysis. *Landscape. Ecology*. 20 (1): 137-147.
- Porembski, S. and Barthlott, W. 1988. Velamen radicum micromorphology and classification of Orchidaceae. *Nordic Journal of Botany*. 8 (1): 117-137.
- Pradhan, M. P. and Loqué, D. 2014. Histochemical staining of *Arabidopsis thaliana* secondary cell wall elements. *Journal of visualized experiments*. 87 (1): 1-11.
- Rasmussen, H. N., Dixon, K. W. Jersáková, J. y Tesitelová, T. 2015. Germination and seedling establishment in orchids: a complex of requirements. *Annals of botany*. 116 (3): 391-402.
- Rasmussen, H. N. and Rasmussen, F. N. 2009. Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos*. 118 (1): 334-345.
- Renau-Piqueras, J. y Faura, M. 1994. Técnicas de microscopía, micromanipulación y análisis de imagen. II Reunión científica en biología celular y molecular. A Coruña: Universidade da Coruña, Servicio de Publicacións. 1 (1): 73-92.
- Rojas-Soto, O. y Bocanegra, A. 2002. Record of the hooded merganser (*Lophodytes cucullatus*) in "Los Petenes", northwestern Campeche, Mexico. *Ornithology neotropical*. 13 (1): 85–86.
- Romberger, J.A. Mikola, P. 1964. *International Review of Forestry Research*. Academic Press. 1 (1): 203-277.
- Rosabal, D. Burgaz, A. R. Reyes, O. J. 2013. Substrate preferences and phorophyte specificity of corticolous lichens on five tree species of the montane rainforest of Gran Piedra, Santiago de Cuba. *The Bryologist*. 116 (2): 113-121.
- Rosell, J. A. Olson, M. E. 2014. The evolution of bark mechanics and storage across habitats in a clade of tropical trees. *American Journal of Botany*. 101 (1): 764–777.
- Sanford, W. W. and Adanlawo, I. 2008. Velamen and exodermis characters of West African epiphytic orchids in relation to taxonomic grouping and habitat tolerance. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 66: 307-321.
- Sioma, A. Socha, J. Klamerus-Iwan, A. 2018. A New Method for Characterizing Bark Microrelief Using 3D Vision Systems. *Forests*. 9 (30): 1-12.
- Stephen J. P. and Nellist, P.D. 2011. *Scanning Transmission Electron Microscopy*. Springer-Verlag New York. 1 (1): 523-536.

- Stern, W.L. and Judd, W.S. 2001. Comparative anatomy and systematics of Catasetinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 136 (1): 153–178.
- Tattini, M. Gravano, E. Pinelli, P. Mulinacci, N. Romani, A. 2000. Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytologist*. 148 (1):69-77.
- Tattini, M. Guidi, L. Morassi-Bonzi, L. Pinelli, P. Remorini, D. Degl'Innocenti, E. Giordano, C. Massai, R. Agati. G. 2005. On the role of flavonoids in the integrated mechanisms of response of *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* to high solar radiation. *New Phytologist*. 167 (1): 457-470.
- Tewari, L. Tewari, G. Nailwal, T. Pangtey, Y. P. S. 2009. Bark Factors Affecting the Distribution of Epiphytic Ferns Communities. *Nature and Science*. 7 (5): 76-81.
- Timsina, B. Rokaya, M.B. Munzbergova, Z. Kindlmann, P. Shrestha, B. Bhattarai, B. Raskotiet, B. 2016. Diversity, distribution and host-species associations of epiphytic orchids in Nepal. *Biodiversity and Conservation*. 25 (1): 2803-2819.
- Tremblay, R. L. Zimmerman, J. K. Lebrón, L. Bayman, P. Sastre, I. Axelrod, F. Alers-García, J. 1998. Host specificity and low reproductive success in the rare endemic Puerto Rican orchid *Lepanthes caritensis*. *Biological Conservation*. 85 (3): 297-304.
- Trépanier, M. Lamy, M. P. and Dansereau, B. 2009. *Phalaenopsis* can absorb urea directly through their roots. *Plant Soil*. 319 (1-2): 95.
- Tsutsumi, C. y Kato M. 2006. Evolution of epiphytes in Davalliaceae and related ferns, *Botanical Journal of the Linnean Society*. 151 (4): 495–510.
- Valová, M. and Sialeszová, S. 2008. Interspecific variations of bark's water storage capacity of chosen types of trees and the dependance on occurrence of epiphytic mosses. *GeoScience Engineering*. 54 (4): 45-51.
- Vergara-Torres, C.A. Pacheco-Álvarez, M. C. Flores-Palacios, A. 2010. Host preference and host limitation of vascular epiphytes in a tropical dry forest of central Mexico. *Journal of Tropical Ecology*. 26(6): 563-570.
- Villalobos-Zapata, G. J. y Mendoza. V. J. 2010. La Biodiversidad en Campeche: Estudio de Estado. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Gobierno del Estado de Campeche, Universidad Autónoma de Campeche, El Colegio de la Frontera Sur. México. 1 (1): 730.
- Waisel, Y. Eshel, A. Kafkafi, U. 1991. *Plant Roots: The Hidden Half*. Marcel Dekker, New York. 1 (1): 875–894.

- Wagner, K. Mendieta-Leiva, G. y Zotz, G. 2015. Host specificity in vascular epiphytes: a review of methodology, empirical evidence and potential mechanisms. *Annals of Botany Plants*. 7 (plu092).
- Went, F.W. 1940. Soziologie der Epiphyten eines tropischen Regenwaldes *Annales du Jardin Botanique de Buitenzorg*. 50 (1): 1-98.
- Wiesner, J. 1878. Über das Verhalten des Phloroglucins und einiger verwandten Körper zur verholzten Zellmembran. *Sitzungsber. Kaiserl. Akad. Wiss., Math.-Naturwiss.* 1 (77): 60-66.
- Whitmore, T. 1962. *Studies in Systematic Bark Morphology*. I. Bark Morphology in Dipterocarpaceae. *The New Phytologist*. 61 (2): 191-207.
- Wright, S. Wright, D. J. 2002. Chapter 1- Introduction to Confocal Microscopy. Editor(s): Brian Matsumoto, *Methods in Cell Biology*, Academic Press. 70 (1): 1-85.
- Williams, V.L. Witkowski, E.T.F. Balkwill, K. 2007. Relationship between bark thickness and diameter at breast height for six tree species used medicinally in South Africa. *South African Journal of Botany*. 73 (3): 449-465.
- Woods, C.L. Cardelús, C. L. DeWalt, S. J. 2015. Microhabitat associations of vascular epiphytes in a wet tropical forest canopy. *Journal of Ecology*. 103 (1): 421-430.
- Wu, Y. Zhao, X. Zhang, M. 2010. Adhesion mechanics of ivy nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 344 (1): 533–540.
- Wyse, V Sarah and Burns, B. 2011. Do host bark traits influence trunk epiphyte communities? *New Zealand Journal of Ecology*. 35 (3): 296-301.
- Yang, F. Mitra, P. Zhang, L. Prak, L. Verhertbruggen, Y. Kim, J. Sun, L. Zheng, K. Tang, K. Auer, M. Scheller, H. V. Loqué, D. 2013. Engineering secondary cell wall deposition in plants. *Plant Biotechnology Journal*. 11 (1): 325-335.
- Zhao, M. Geekiyanage, N. Xu, J. Myo Myo Khin, M. Nurdiana, D. R. Paudel, E. Harrison, R. D. 2015. Structure of the Epiphyte Community in a Tropical Montane Forest in SW China. *Public Library of Science ONE*. 10 (4): e0122210.
- Zhang, F. Zhang, J. Yan, N. Hu, H. and Zhang, S. 2015. Variations in seed micromorphology of *Paphiopedilum* and *Cypripedium* (Cypripedioideae, Orchidaceae). *Seed Science Research*. 25 (4): 395-401.
- Zhang, M. M. Liu, H. Prest, S. Fischer, S. 2008. Nanoparticles secreted from ivy rootlets for surface climbing. *Nano Letters*. 8 (1): 1277–1280.
- Zhang, S. Yang, Y. Li, J. Qin, J. Zhang, W. Huang, W. Hu, H. 2018. Physiological diversity of orchids. *Plant Diversity*. 40 (4): 196-208.

Zhong, R. Ripperger, A. Ye, Z. H. 2000. Ectopic deposition of lignin in the pith of stems of two *Arabidopsis* mutants. *Plant physiology*. 123(1): 59-70.

Zotz, G. 2013. The systematic distribution of vascular epiphytes a critical update. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 171 (1): 453–481.

Zotz, and Hietz, P. 2001. The physiological ecology of vascular epiphytes: current knowledge, open questions. *Journal of Experimental Botany*. 52 (364): 2067–2078.

Zotz, G. y Schultz, S. 2008. The vascular epiphytes of a lowland forest in Panama—species composition and spatial structure. *Plant Ecology* 195 (1): 131.

Zotz, G and Winkler, U. 2013. Aerial roots of epiphytic orchids: the velamen radicum and its role in water and nutrient uptake *Oecologia*. 171 (1): 733-741.

Zhu, N. Wu, D. Chen, K. 2018. Label-free visualization of fruit lignification: Raman molecular imaging of loquat lignified cells. *Plant methods*. 14 (58): 1-16.

Zytynska, S. E. Fay, M. F. Penney, D. Preziosi, R. F. 2011. Genetic variation in a tropical tree species influences the associated epiphytic plant and invertebrate communities in a complex forest ecosystem. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 366(1569): 1329-1336.