



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**



**“Aislamiento e identificación de cepas fúngicas de
Stanhopea tigrina productoras de giberelinas con
efecto benéfico para la orquídea”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

PRESENTA:

M. C. SONIA SALAZAR CEREZO

ASESORA DE TESIS:

D.C. REBECA D. MARTÍNEZ CONTRERAS

PUEBLA, PUE.

ENERO, 2018

ÍNDICE GENERAL

Descripción	Página
Abreviaturas	VI
Índice de tablas	VII
Índice de figuras	VIII
Resumen	X
Abstract	XII
1. Introducción	1
1.1 La familia Orquidácea	1
1.1.1 Diversidad de orquídeas en México	1
1.1.2 El género <i>Stanhopea</i>	2
1.1.2.1 <i>Stanhopea tigrina</i>	2
1.1.2.2 Propagación de <i>Stanhopea tigrina</i>	3
1.2 Germinación de semillas de Orquídea	3
1.2.1 Características de las semillas	3
1.2.2 Germinación <i>in vitro</i> de semillas	4
1.2.2.1 Germinación simbiótica	4
1.2.2.2 Germinación asimbiótica	4
1.2.2.2.1 Nitrógeno	5
1.2.2.2.2 Carbohidratos	5
1.2.2.2.3 Luz	5
1.2.2.2.4 Hormonas	5
1.2.2.2.4.1 Efecto de las giberelinas en la germinación	5
1.3 Microorganismos asociados a orquídeas	6
1.3.1 Hongos asociados a orquídeas	7
1.3.1.1 Hongos productores de giberelinas	7
1.4 Identificación de hongos asociados a plantas	10
1.4.1 Identificación fenotípica	10
1.4.2 Identificación genotípica	11
2. Justificación	12
3. Objetivos	13
3.1 Objetivo general	13
3.2 Objetivos específicos	13
4. Metodología	14
4.1 Diagrama de trabajo	14
4.2 Muestreo	15
4.3 Procesamiento de las muestras	15
4.3.1 Procedimiento 1	15
4.3.2 Procedimiento 2	16
4.3.3 Aislamiento de hongo de la rizósfera	17
4.4 Conservación de muestras	17
4.5 Identificación fenotípica y molecular de hongos filamentosos	17
4.5.1 Identificación mediante características morfológicas	17

4.5.2	Identificación molecular	18
4.5.2.1	Extracción de ADN	18
4.5.2.2	Amplificación por PCR	18
4.5.2.3	Secuenciación y análisis de secuencias	20
4.6	Identificación de levaduras	20
4.6.1	Tinción de Gram	20
4.6.2	Tinción con azul de algodón	20
4.6.3	Auxonogramas	20
4.6.3.1	Asimilación de fuentes de carbono	21
4.6.3.2	Asimilación de fuentes de nitrógeno	21
4.7	Producción de giberelinas	21
4.7.1	Determinación cualitativa de la producción de giberelinas	21
4.7.2	Determinación cuantitativa de la producción de giberelinas	21
4.7.2.1	Preparación de la muestra	21
4.7.2.2	Cromatografía en capa fina (CCF)	21
4.7.2.3	Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	22
4.7.3	Identificación molecular de hongos productores de giberelinas	22
4.7.3.1	Extracción de ADN	22
4.7.3.2	Amplificación de ADN por PCR	23
4.7.3.3	Secuenciación y análisis de secuencias	23
4.8	Germinación de semillas	23
4.8.1	Recolección y almacenamiento de semillas	23
4.8.2	Desinfección de cápsulas	23
4.8.2.1	Desinfección de semillas	23
4.8.3	Germinación simbiótica	23
4.8.3.1	Crecimiento de las cepas	23
4.8.3.2	Inoculación de semillas y hongos	24
4.8.3.3	Incubación	24
4.8.3.4	Desarrollo de semillas	24
4.8.4	Germinación asimbiótica	25
5. Resultados		26
5.1	Muestreo	26
5.2	Aislamiento de hongos asociados a plantas de <i>S. tigrina</i>	26
5.3	Purificación y preservación de cepas aisladas	29
5.4	Identificación fenotípica y genotípica de los hongos filamentosos aislados	30
5.4.1	Identificación fenotípica	30
5.4.2	Distribución de la población en morfogrupos	37
5.4.3	Identificación molecular de aislados representativos	38
5.4.3.1	Extracción ADN	38
5.4.3.2	Amplificación por PCR de la región 18S-ITS-28S	38
5.4.3.3	Secuenciación y análisis bioinformático	39
5.4.4	Distribución de géneros por tejido	42
5.4.4.1.	Hoja	42
5.4.4.2	Raíz	43
5.4.4.3	Pseudobulbo	44

5.4.4.4	Flor	44
5.4.4.5	Rizósfera	45
5.4.5	Géneros identificados en aislados endófitos y epífitos	45
5.4.6	Distribución de géneros fúngicos según el hábito de crecimiento de <i>S. tigrina</i>	47
5.5	Identificación fenotípica de levaduras	49
5.5.1	Tinción de Gram	49
5.5.2	Tinción de azul de algodón	50
5.5.3	Auxonograma	51
5.5.3.1	Asimilación de fuentes de carbono	51
5.5.3.2	Asimilación de fuentes de nitrógeno	51
5.6	Producción de giberelinas	52
5.6.1	Identificación cualitativa	52
5.6.1.1	Aislados filamentosos	53
5.6.1.2	Aislados levaduriformes	54
5.6.2	Condiciones de crecimiento de las cepas productoras de GAs	54
5.6.2.1	pH	55
5.6.2.2	Tiempo de incubación	56
5.6.3	Determinación cuantitativa de la producción de giberelinas	57
5.6.3.1	Cromatografía en capa fina	57
5.6.3.2	Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	58
5.6.4	Identificación molecular de las muestras productoras de giberelinas	61
5.6.4.1	Extracción de ADN	61
5.6.4.2	Amplificación por PCR	61
5.6.4.3	Análisis bioinformático	62
5.7	Germinación de semillas	63
5.7.1	Recolección y almacenamiento de semillas	63
5.7.2	Ensayo piloto de germinación de semillas de orquídeas	63
5.7.2.1	Germinación asimbiótica	64
5.7.2.2	Germinación simbiótica	65
6. Discusión		69
6.1	Aislamiento de hongos asociados a <i>S. tigrina</i>	69
6.2	Identificación y distribución de géneros en <i>S. tigrina</i>	70
6.2.1	Géneros fúngicos que conforman la población endófito y epífita en <i>S. tigrina</i>	71
6.2.2	Distribución de la población fúngica en los diferentes tejidos de <i>S. tigrina</i>	72
6.2.2.1	Hoja	72
6.2.2.2	Pseudobulbo	73
6.2.2.3	Raíz	73
6.2.2.4	Flor	74
6.2.2.5	Rizósfera	74
6.3	Especificidad de géneros en <i>S. tigrina</i>	75
6.4	Distribución de géneros según hábito de crecimiento en las plantas	75
6.5	Producción de giberelinas	76

6.6	Germinación de semillas <i>Brassia Verrucosa</i>	76
6.6.1	Germinación asimbiótica de <i>B. verrucosa</i>	76
6.6.2	Germinación simbiótica	77
7.	Conclusiones	79
8.	Bibliografía	80
10.	Anexos	92

Abreviaturas

2,4-D	Diclorofenoxiacético
°C	Grados centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIA	Ácido indol acético
BA	N6-benciladenina
BrEt	Bromuro de Etidio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CCF	Cromatografía en capa fina
Cm	Cloranfenicol
DO	Densidad óptica
g	Gravedad
GA ₃	Ácido giberélico
GAs	Giberelinas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ITS	Espaciador transcrito interno
Kb	Kilobase
LB	Luria Bertani
LSU	Subunidad grande
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
msnm	Metros sobre el nivel del mar
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar dextrosa papa
rADN	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
RPM	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
sp	Sin especie
SSU	Subunidad pequeña
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
UV	Ultravioleta
YEP	Extracto de levadura peptona
µg	Microgramos
µl	Microlitros

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Cepas fúngicas productoras de giberelinas (GAs)	8
Tabla 2. Procedimientos utilizados en el aislamiento de hongos asociados a la orquídea <i>S. tigrina</i>	16
Tabla 3. Oligonucleótidos usados en la PCR	19
Tabla 4. Reactivos utilizados para la PCR	19
Tabla 5. Estados de germinación de semillas y desarrollo de protocormos	24
Tabla 6. Hongos aislados de las plantas de <i>S. tigrina</i> utilizando el procedimiento 1	26
Tabla 7. Hongos aislados de las plantas de <i>S. tigrina</i> utilizando el procedimiento 2	27
Tabla 8. Identificación genotípica de algunos aislados	39
Tabla 9. Géneros y número de aislados asociados con los morfogrupos identificados	40
Tabla 10. Géneros fúngicos endófitos recuperados de <i>S. tigrina</i> en diferentes hábitos de crecimiento	48
Tabla 11. Géneros fúngicos epífitos recuperados de <i>S. tigrina</i> en diferentes hábitos de crecimiento	49
Tabla 12. Muestras positivas para la producción de giberelinas	53
Tabla 13. Producción de giberelinas según el pH	55
Tabla 14. Factores de retención (Rf) obtenido en cultivos de diferentes muestras	57
Tabla 15. Gradiente de solventes probados en los ensayos de HPLC	59
Tabla 16. Determinación cuantitativa de la producción de GA ₃ y GA ₄ en aislados fúngicos por HPLC	60
Tabla 17. Identificación genotípica de las cepas productoras de GAs	62

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Flores de <i>Stanhopea tigrina</i>	3
Figura 2. Estructura química del ácido giberélico	8
Figura 3. Unidad ARN ribosomal (rDNA)	11
Figura 4. Representación esquemática y sintetizada del desarrollo experimental	14
Figura 5. Recolección de plantas de <i>Stanhopea tigrina</i>	15
Figura 6. Preparación del Microcultivo	18
Figura 7. Hábitos de crecimiento de <i>S. tigrina</i>	26
Figura 8. Distribución de aislados fúngicos en los diferentes tejidos de <i>S. tigrina</i>	28
Figura 9. Distribución porcentual de los aislados de acuerdo con su localización	28
Figura 10. Géneros identificados fenotípicamente	30
Figura 11. Identificación fenotípica de <i>Arthrinium</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp y <i>Chaetomium</i> sp.	31
Figura 12. Características fenotípicas de <i>Cladophialophora</i> sp, <i>Cladosporium</i> sp y <i>Curvularia</i> sp.	32
Figura 13. Identificación fenotípica	34
Figura 14. <i>Geotrichum</i> , <i>Microsporium</i> y <i>Mucor</i> identificados genotípicamente	35
Figura 15. Los géneros <i>Paecilomyces</i> sp, <i>Penicillium</i> sp, y <i>Scedosporium</i> sp.	36
Figura 16. Identificación fenotípica de <i>Trichoderma</i> sp y <i>Verticillium</i> sp	37
Figura 17. ADN genómico obtenido a partir de cultivos fúngicos	38
Figura 18. Amplificación de la región 18s-ITS-28s de diferentes aislados	39
Figura 19. Géneros identificados en hojas de la orquídea <i>Stanhopea tigrina</i>	43
Figura 20. Géneros identificados en raíz de la orquídea <i>Stanhopea tigrina</i>	43
Figura 21. Géneros identificados en pseudobulbo de la orquídea <i>Stanhopea tigrina</i>	44
Figura 22. Géneros identificados en flor de la orquídea <i>Stanhopea tigrina</i>	45
Figura 23. Géneros identificados en rizósfera de la orquídea <i>Stanhopea tigrina</i>	45
Figura 24. Géneros fúngicos endófitos asociados a <i>S. tigrina</i>	46
Figura 25. Géneros epífitos fúngicos asociados a <i>S. tigrina</i>	47
Figura 26. Abundancia de géneros fúngicos en <i>S. tigrina</i> de acuerdo al hábito de crecimiento de las plantas	47
Figura 27. Tinción de Gram	50
Figura 28. Tinción con azul de algodón	50
Figura 29. Asimilación de fuentes de carbono	51
Figura 30. Asimilación de fuentes de nitrógeno	52
Figura 31. Determinación cualitativa de la producción de giberelinas	53
Figura 32. Determinación cualitativa de la producción de giberelinas en levaduras	54
Figura 33. Producción de GAs en medio ICI y Czapek, a diez días de incubación	56
Figura 34. Producción de GAs en varios tiempos de incubación	57
Figura 35. Resultados de la CCF para algunos aislados productores de GAs	58
Figura 36. Producción de giberelinas en aislados fúngicos determinado por HPLC	60
Figura 37. Extracción de ADN de los aislados productores de giberelinas	61
Figura 38. Amplificación de la región 18s-ITS-28s de diferentes aislados	62
Figura 39. <i>Brassia verrucosa</i>	64
Figura 40. Germinación asimbiótica de semillas en medio MS a diferentes concentraciones de GA ₃	64
Figura 41. Germinación asimbiótica de semillas en medio MS (15 μM) en diferentes días de incubación.	65

Figura 42.	Semillas de <i>B. verrucosa</i> en ensayo de germinación simbiótica	66
Figura 43.	Germinación simbiótica de semillas de <i>B. verrucosa</i>	66
Figura 44	Germinación simbiótica, semillas de <i>B. verrucosa</i> , aislados con crecimiento denso	67
Figura 45.	<i>B. verrucosa</i> en germinación con hongos de crecimiento abundante	67
Figura 46.	Germinación simbiótica de semillas en medio OMA	68

Resumen

La familia Orchidaceae es una de las familias de plantas más ricas en especies. Su valor comercial y hortícola y los usos etnobotánicos han fascinado por mucho tiempo a la humanidad. México posee una notable riqueza de orquídeas, de las cuales alrededor del 40% son endémicas. Sin embargo, la supervivencia de estas especies endémicas se ve amenazada por la extracción de orquídeas de su hábitat natural, la ampliación de los asentamientos humanos y la explotación de sus hábitats. *Stanhopea tigrina* es una especie endémica reportada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 como una especie amenazada, la cual posee una relevancia cultural, biológica y económica para México y Puebla. Si bien se ha establecido que las asociaciones simbióticas entre las orquídeas y los hongos son esenciales para la planta con el fin de sobrevivir durante las etapas críticas de desarrollo, los microorganismos naturales presentes en *S. tigrina* no se conocen. La identificación de cepas fúngicas en *S. tigrina* con la capacidad de producir diferentes metabolitos podría ser útil para el establecimiento de interacciones benéficas destinadas a mejorar las etapas de desarrollo tempranas para facilitar la supervivencia de esta especie. Con este fin, se realizó la identificación fenotípica y genotípica de aislados fúngicos recuperados de las orquídeas de *S. tigrina*. Además, de examinar la capacidad de los aislados para producir giberelinas. Con este trabajo, se pretende contribuir al conocimiento de la diversidad fúngica asociada a *S. tigrina* a la vez identificar aislados fúngicos con la capacidad de producir giberelinas como primer intento de encontrar estrategias que nos permitan revertir el estado de amenaza de esta orquídea.

Resultados: Obtuvimos un total de 891 aislamientos fúngicos de la flor, raíz, pseudobulbo, hoja y rizosfera de seis orquídeas de *Stanhopea tigrina*, las plantas fueron recolectadas del jardín botánico "Xoxocitic" ubicado en el municipio de Cuetzalan del Progreso, Puebla, México, el aislamiento de hongos incluyó endofitos y epífitos asociados con los tejidos antes mencionados. La mayoría de los aislados recuperados fueron epífitos (80%) mientras que el 20% de ellos se recuperaron de tejidos previamente desinfectados (endófitos). De estos aislados, 627 crecieron como hongos filamentosos y 264 como levaduras. Los aislados filamentosos se dividieron en 139 morfogrupos en función de sus características fenotípicas, mientras que la identificación genotípica confirmó el género para cada morfogrupo, mediante la secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2. Usando este enfoque combinado, identificamos 134 morfotipos que incluyeron 63 géneros, mientras que 10 aislamientos agrupados en cinco morfotipos no pudieron ser identificados. De los géneros identificados, *Trichoderma* fue el género más recurrente con 124 aislamientos, mientras que el segundo más frecuentemente fue *Penicillium* con 103 aislamientos. Otros de los géneros más frecuentes incluyeron a *Fusarium* y *Aspergillus*. Además la población con la mayor distribución de géneros fue la epífita con 57 géneros, mientras que 32 géneros fueron identificados en la población endófito. Entre los tejidos la hoja tuvo el mayor número de géneros asociados con 40, seguido de pseudobulbo con 32 y 27 de la raíz, mientras que solo 10 géneros fueron recuperados de la flor. Dentro de esta distribución la rizósfera fue el tejido con la mayor diversidad de epífitos, mientras que la raíz exhibió la mayor diversidad de géneros endófitos, de acuerdo con las interacciones microbianas significativas que ocurren en estos tejidos vegetales y que han sido reportadas. Asimismo cómo se recolectaron plantas con diferentes hábitos de crecimiento, analizamos la población y encontramos que las plantas cultivadas en sustrato mostraron la mayor diversidad de hongos, seguidas de las que crecieron como epífitas, mientras que la orquídea litófito mostró la menor diversidad.

Además, una evaluación cualitativa determinó que aproximadamente el 4% de los aislados producen giberelinas, la cantidad de GA₃ y GA₄ se cuantificó para estos 21 aislados utilizando HPLC. Los resultados confirman la riqueza de especies fúngicas presentes en esta orquídea y la capacidad de algunos de estos aislados para producir metabolitos que podrían aplicarse para mejorar las diferentes etapas del desarrollo de esta orquídea en peligro de extinción. También se evaluó el efecto de los aislados productores de giberelinas sobre la germinación de la semilla en la orquídea epífita *Brassia verrucosa*, demostrando que algunos de los aislados tuvieron un efecto positivo en comparación con las condiciones de germinación asimbióticas. A partir de estos resultados queda por dilucidar el papel de estos productores de giberelinas en la germinación de *Stanhopea tigrina*.

Abstract

Orchidaceae is one of the most species-rich plant families. Their commercial and horticultural values and ethnobotanical uses have long fascinated mankind. Mexico possess a remarkable wealth of orchids of which about 40% are endemic. However, survival of these endemic species is threatened by the extraction of orchids from their natural habitat, the enlargement of human settlements and the exploitation of their habitats. *Stanhopea tigrina* is an endemic species reported in the ecological standard NOM-059-SEMARNAT-2010 as a threatened species with cultural, biological and economical relevance for Mexico and Puebla. While it has been established that symbiotic associations between orchids and fungi are essential for the plant in order to survive during critical development stages, the naturally occurring microorganisms present in *S. tigrina* are not known. The identification of fungal strains in *S. tigrina* with the ability to produce different metabolites could be helpful for the establishment of benefic interactions devoted to improve specific developmental stages to facilitate the survival of this species. To this end, we performed phenotypic and genotypic identification of the fungal isolates recovered from *Stanhopea tigrina* orchids. Additionally, we examined the ability of the isolates to produce gibberellins. With this work, we want to contribute to the knowledge of the fungal diversity associated to *S. tigrina* while identifying fungal isolates that have the ability to produce gibberellins as a first attempt to find strategies that allow us to revert the threatened state of this orchid.

Results: We obtained a total of 891 fungal isolates from the flower, root, pseudobulb, leaf, and rhizosphere from six *Stanhopea tigrina* orchids, plants were collected from the Botanical garden "Xoxoctic" located in the municipality of Cuetzalan del Progreso, Puebla, Mexico, and the isolation included endophytes and epiphytes associated with the aforementioned tissues. The majority of the recovered isolates were epiphytes (80%) while 20% of them were recovered from disinfected tissues (endophytes). Out of these isolates, 627 grew as filamentous fungi and 264 as yeasts. Filamentous isolates were divided into 139 morphogroups based on their phenotypic characteristics, while genotypic identification confirmed the genus for each morphogroup, by sequencing the ITS1-5.8S-ITS2 region. Using this combined approach, we identified 134 morphotypes that comprised 63 genera, while 10 isolates grouped in five morphotypes could not be identified. From the genera, *Trichoderma* was the most recurrent group identified showing 124 isolates, while the second most frequently recovered was *Penicillium* with 103 isolates besides *Fusarium* and *Aspergillus* were found abundantly. The population with the largest distribution of genera was the epiphytic with 57 genera while 32 genera were identified in the endophytic population, between the tissues the leaf had the largest number of associated genera with 40, followed by pseudobulb with 32 and 27 from root, while only 10 isolates were recovered from flower, we found that the rhizosphere was the tissue with the greatest diversity of epiphytes, while root exhibited the highest diversity of endophytic genera, in accordance with the significant microbial interactions that occur in these plant tissues and with previous reports. Also how plants with different growth habits were collected, we analyze the population and found that plants grown in substrate showed the greater fungal diversity, followed by those that grew like epiphytes, while the lithophyte orchid showed the poorest total diversity.

Furthermore, a qualitative evaluation determined that about 4% of the isolates produce gibberellins and the amount of GA₃ and GA₄ was quantified for these 21 isolates using reverse phase HPLC. Our

results confirm the richness of fungal species present in this orchid and the capability of some of these isolates to produce metabolites that could be applied to improve different stages of the development of this endangered orchid. Gibberellin-producers effect on seed germination was evaluated on the epiphytic orchid *Brassia verrucosa*, showing that some of the isolates had a positive effect when compared with asimbyotic conditions. Remaining to elucidate the role of these producers of gibberellins in the germination of *Stanhopea tigrina*

1. Introducción

Las orquídeas pertenecen a una de las familias más grandes de plantas con flores y es considerada como una de las familias más evolucionadas dentro del reino vegetal. Las especies de esta familia seducen por la forma variada de sus flores, sus resplandecientes colores, las llamativas combinaciones cromáticas, la diversidad de los dibujos de sus flores y desde el punto de vista ecológico muchos de sus integrantes son componentes importantes en diversos tipos de vegetación. Estas plantas presentan una amplia diversidad, lo que se relaciona con una serie de usos y aplicaciones que le confieren un alto valor económico; en este sentido, existen numerosas variedades hermosas que se comercializan y otras como la vainilla son utilizadas a nivel mundial desde la antigüedad. Por otro lado, las aplicaciones en el campo de la medicina para algunas especies de orquídeas se conocen desde los inicios de la medicina herbal china (Bulpitt, 2005) e incluso se conocen en la medicina tradicional (Gutiérrez, 2010). A pesar de que la familia Orchidaceae es una de las familias más grandes y con gran diversidad, varios factores han provocado que ciertas especies de esta familia se encuentren en peligro de desaparecer.

Una característica importante en los miembros de esta familia es la asociación simbiótica que forman con diferentes especies de hongos, como los endomicorrízicos, lo que favorece el crecimiento y desarrollo de las plantas, ayudando en la captación del agua de lluvia, al reciclado de minerales y de materia orgánica que proviene de la actividad biológica. De hecho, gran parte de su diversidad y de sus características únicas pueden ser atribuibles a su relación distintiva con algunos hongos (Burgeff, 1909; Benzing, 1981; Zettler et al, 2004). Enseguida se presenta la información relevante acerca de la fisiología de las orquídeas, así como su relación con diferentes microorganismos, particularmente con hongos.

1.1 La familia Orquidaceae

La familia Orchidaceae es una de las familias más grandes de plantas con flores, presenta de 20.000 a 30.000 especies aproximadamente (Chugh *et al.*, 2009), además de que muestran gran complejidad y especialización en su morfología floral y tipos de polinización (Espejo *et al.*, 2002). Las orquídeas son plantas herbáceas, perennes, cuyo tamaño oscila de 3.0 mm hasta varios metros de altura que presentan diversos hábitos de crecimiento ya que pueden crecer sobre los árboles (epífitas), en las rocas (litófitas) y en el suelo (terrestres), siendo la mayor parte de la familia epífita (Ortiz-Arias, 2002). Estas plantas se distribuyen en todos los ecosistemas terrestres excepto en los más extremos, por lo que tienen una distribución prácticamente ubicua, presentando la mayor distribución en las regiones tropicales del sudeste de Asia, América del Sur y América central (Kauth *et al.*, 2008). De acuerdo con esta distribución, México cuenta con una gran diversidad de orquídeas repartida a lo largo del país.

1.1.1 Diversidad de Orquídeas en México

México se encuentra situado en el límite norte del trópico americano, por lo que alberga una notable riqueza de orquídeas, registrándose alrededor de 1260 especies y 170 géneros (Hágsater *et al.*, 2005; Soto *et al.*, 2007) que se encuentran distribuidos principalmente en los estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Morelos, Jalisco, Michoacán, Puebla y San Luis Potosí. La distribución de las plantas se encuentra relacionada con la diversidad climática y tipo de vegetación que presenta el país, lo que las convierte en la tercera familia con mayor diversidad taxonómica en el país, superada sólo por las familias Asteraceae y Fabaceae (Villaseñor, 2003; Hágsater *et al.*, 2005). De las más de 1200 especies de orquídeas reportadas en el país (Hágsater *et al.*, 2005; Mata y Salazar, 2009) se estima que alrededor del 40% son endémicas (Mata y Salazar, 2009). Desafortunadamente, existen

diversos factores, como la contaminación, el cambio climático, la fragmentación y destrucción de hábitats (Rands *et al.*, 2010) e incluso el cambio climático, que han llevado a un déficit en la población e incluso a una pérdida en la diversidad de las especies de orquídeas a nivel mundial. En México, todas aquellas especies vegetales que se encuentran en alguna clase de peligro están enlistadas en la norma ecológica NOM-059-SEMARNAT-2010, siendo asociadas a alguna de las categorías que enmarca esta norma, dependiendo del número de individuos que presente la especie. En este sentido, las especies pueden encontrarse sujetas a protección especial, amenazadas o en peligro de extinción, siendo esta última la categoría que presenta un menor número de individuos. En esta NOM se encuentran reportadas 188 especies de orquídeas de las cuales 74 son endémicas, las cuales corresponden a diversos géneros, incluyendo a varias especies del género *Stanhopea*.

1.1.2 El género *Stanhopea*

El género *Stanhopea* comprende alrededor de 40 especies, las cuales se encuentran distribuidas desde el centro de México hasta Brasil y Perú (Mora-Renata y González, 1996). México es el segundo centro de diversidad de este género con 13 especies (Gerlach, 2010) distribuidas en las zonas boscosas templadas de los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Veracruz y Oaxaca. La mayoría de las especies de este género se localizan en climas calientes o templados en bosques y selvas húmedas, excepto la especie *Stanhopea maculosa*, la cual se localiza al norte del estado de Sonora, en los bosques de encinos y pinos en un hábitat que presenta un periodo de sequía muy pronunciado (Gerlach, 2010).

El género *Stanhopea* es muy conocido por sus flores llamativas de dulce y penetrante aroma (Mora-Renata & González, 1996), las plantas que pertenecen a este género presentan de 2 a 15 flores simultáneamente abiertas durante al menos 1 ó 2 días, sus flores son intensamente aromáticas cuyo aroma es el resultado de la combinación de grupos terpenos y aromáticos. La polinización en estas plantas es inusual pues estas orquídeas no ofrecen alimento para el polinizador (Kenneth *et al.*, 1991). De las 13 especies que se han reportado para este género en el país, tres se encuentran enlistadas en la norma ecológica NOM-059-SEMARNAT-2010 con algún estado de protección: *Stanhopea tigrina*, *Stanhopea ecomuta* y *Stanhopea oculata*. *Stanhopea tigrina*, la planta de interés para este estudio, además de encontrarse en estado de amenaza es una especie endémica del país que se encuentra en el estado de Puebla.

1.1.2.1 *Stanhopea tigrina*

Las orquídeas de la especie *Stanhopea tigrina* se desarrollan en bosques templados de la Sierra Madre Oriental creciendo por lo general en el bosque mesófilo de montaña entre los 1000 y 1500 msnm (Soto-Arenas, 2002). Esta especie se conoce desde la antigüedad por los primeros grupos que habitaron el país, quienes nombraron a la orquídea en náhuatl como “coatzontecomaxochitl”, que significa “flor en forma de cabeza de serpiente”, aunque también se le conoce como “flor serpiente del cerro”, cabeza de víbora, calaveras y torito morado.

Stanhopea tigrina presenta dos hábitos de crecimiento, ya que puede crecer como epífita o como litófito, su tamaño varía de 40-70 cm de alto, tiene raíces flexuosas y sus flores se encuentran mirando hacia abajo (figura 1), son muy grandes de 11 a 18 cm de diámetro, puede presentar de 1 a 2 flores simultáneas, grandes y vistosas, los sépalos son crema o amarillos con manchas variables de color púrpura a púrpura negruzcas, sus pétalos son amarillos y presentan una gran mancha púrpura en la base (Soto-Arenas, 2002), sus flores presentan dulce y penetrante aroma por lo que son muy atractivas para su comercialización, siendo utilizada principalmente de manera ornamental, lo que les confiere un alto valor económico.



Figura 1. Flores de *Stanhopea tigrina*. Se observan los sépalos en color crema con manchas variables en color púrpura negruzco.

El alto valor económico de estas orquídeas, su extracción del hábitat natural, la pérdida de su ecosistema natural y el cambio climático son algunos de los factores que han puesto en amenaza a *Stanhopea tigrina*, una orquídea endémica mexicana, por lo que es importante poner en práctica métodos de conservación que nos ayuden a revertir este estado. Dentro de los métodos de conservación, la propagación ha permitido salvar muchas especies en peligro.

1.1.2.2 Propagación de *Stanhopea tigrina*

El principal uso de la propagación ha sido la multiplicación masiva de especies aprovechadas por el hombre y ha demostrado su utilidad práctica en especies de multiplicación deficiente o relativamente lenta, como las orquídeas. Además, su aplicación ha permitido incrementar aún más el número de individuos cuando se realiza la propagación *in vitro*, como es el caso de las plantas de ornato, que también incluyen a las orquídeas (Juárez & Rosas, 2007).

Existe poca información acerca de los intentos por realizar la micropropagación de *S. tigrina*, en algunos reportes se utiliza a los protocormos como material de partida (Juárez y Rosas, 2007) en medio de cultivo Murashige y Skoog adicionado con N6-benciladenina (BA) y ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). Por otra parte, Martínez y García (2007) reportan el cultivo asimbiótico *in vitro* de semillas utilizando el medio de cultivo Murashige y Skoog adicionado con diferentes compuestos orgánicos, siendo la pulpa de plátano y la leche de coco los que mostraron mejores resultados en cuanto al número de raíces, formación de pseudobulbo y sobrevivencia al trasplante.

1.2 Germinación de semillas de orquídeas

1.2.1 Características de las semillas

Las semillas de orquídeas son muy pequeñas, en un rango de 0.05 a 0.6 mm de longitud, y de 0.01 a 0.93 mm de ancho, pesan de 0.3 a 14 μg (Arditti & Ghani, 2000); la estructura de las semillas de estas plantas es simple (Yang & Lee, 2014) carecen generalmente de un endospermo bien definido y contienen un embrión, el cual tiene forma globular y está velado por capas delgadas de cubierta llamada testa (Arditti, 1992; Arditti & Ghani, 2000). La testa está formada por tejido muerto, compuesto hasta en un 96% de aire, de tal forma que cada semilla puede ser considerada como un auténtico globo. Todas estas características permiten la dispersión de las semillas por el viento y le permiten establecer una asociación simbiótica con hongos para poder germinar (Arditti, 1992; Brundrett, 2002). La germinación simbiótica de semillas de orquídea ocurre de manera natural,

mientras que en los métodos de cultivo *in vitro* es posible germinar a las semillas de orquídea tanto de manera simbiótica, es decir, en presencia de un hongo o bien de manera asimbiótica utilizando un medio de cultivo con nutrientes específicos.

1.2.2. Germinación *in vitro* de semillas

Mediante la germinación *in vitro*, se reproducen semillas en frascos de vidrio o plástico sobre un medio de agar nutritivo que contiene los azúcares y minerales necesarios para que las semillas germinen y crezcan, en algunos casos se puede incluir un hongo micorrízico para promover la germinación. Dependiendo de si el proceso de germinación se realiza en presencia o en ausencia de un microorganismo, en este caso un hongo, existen dos tipos básicos de germinación *in vitro*: simbiótica y asimbiótica, las cuales se describen a continuación.

1.2.2.1 Germinación simbiótica

En la germinación simbiótica, las semillas se siembran con una pequeña porción de un hongo micorrízico apropiado. El proceso comienza cuando el hongo coloniza a la orquídea a través de los tejidos del suspensor del embrión o por los pelos epidérmicos y entran en las células corticales (Deameley *et al.*, 2012). Las hifas colonizadoras de los hongos no infringen la membrana celular cortical pero se ramifican en el espacio entre la pared celular y la membrana, formando elaboradas estructuras en espiral conocidas como pelotones (Dearneley *et al.*, 2012), de manera que el hongo abastece a las plantas jóvenes con azúcares y nutrientes hasta que sean lo suficientemente fuertes para fabricar su propio alimento. Cuando la semilla germina, produce una masa indiferenciada de células llamada protocormo, el cual continúa su crecimiento por varias semanas, meses o incluso años dependiendo de la especie hasta que alcance la edad apropiada para producir raíces y hojas. Los protocormos de las orquídeas epífitas son comúnmente verdes, lo que les posibilita producir parte de su alimento (McKendrick, 2000).

Algunas de las ventajas que presenta el uso de la germinación simbiótica *in vitro* incluyen el uso de medios de cultivo simples, además de que las plantas micorrizadas suelen ser más fuertes y resistentes a infecciones que sus contrapartes cultivadas asimbióticamente (McKendrick, 2000). Debido a estas ventajas, la germinación simbiótica de semillas ha ganado popularidad recientemente en proyectos sobre todo de conservación y restauración (Kauth *et al.*, 2008).

1.2.2.2 Germinación asimbiótica

El inicio de la germinación asimbiótica se llevó a cabo en 1922 por Knudson empleando híbridos de *Cattleya* en agar con sales minerales y azúcar; desde entonces el papel de la nutrición mineral en la germinación de semillas de orquídeas tropicales ha sido investigado extensivamente (Nakamura, 1982). Las técnicas de germinación asimbiótica han sido utilizadas para la producción de orquídeas de importancia comercial y ha demostrado ser una herramienta eficaz para la producción de orquídeas con fines de reproducción y reintroducción (Dutra *et al.*, 2008). Sin embargo, es una técnica que requiere un total conocimiento de los factores que requiere la planta en estudio para poder desarrollarse. Muchos trabajos han tratado de cultivar orquídeas asépticamente suministrando a las plantas diferentes nutrientes como hidratos de carbono, compuestos de nitrógeno, vitaminas, fitohormonas y/o algunos productos naturales (Nakamura; 1982), sin lograr la germinación de manera exitosa. A continuación se describen algunos de los factores que afectan la germinación de las semillas de orquídea.

1.2.2.2.1 Nitrógeno

El nitrógeno tiene un papel importante en la germinación de semillas de orquídeas. Algunos reportes han demostrado que mientras un medio de cultivo asimbiótico puede ayudar a la germinación inicial, otro medio puede apoyar el desarrollo subsecuente. Stenberg y Kane (1998) y Kauth et al. (2006) reportaron alta germinación de las semillas de *Encyclia boothiana* y *Calopogon tuberosus*, respectivamente, en medio Knudson C. Los porcentajes de alta germinación en Knudson C se atribuyen al alto contenido de amonio, el cual puede ser utilizado por las semillas durante la germinación temprana y las etapas iniciales del desarrollo (Kauth et al., 2008). Se ha observado que la utilización de compuestos con nitrógeno por orquídeas difiere de especie a especie aun en el mismo género.

1.2.2.2.2 Carbohidratos

Puesto que las semillas de orquídeas tienen reservas mínimas de carbohidratos, se requiere de una fuente exógena para la germinación *in vitro*. Ernst y Arditti (1990) reportan la germinación de plántulas de *Phalaenopsis* en presencia de muchas fuentes de carbono incluyendo glucosa, un azúcar simple y maltosa, un azúcar de cadena larga (Kauth et al., 2008). También se ha observado la capacidad de las orquídeas para utilizar disacáridos como la sacarosa y lactosa y otros polisacáridos como el almidón; sin embargo, se ha observado que éstas no pueden metabolizar galactosa, lo cual no es muy sorprendente pues este azúcar es menos común en las plantas que los azúcares de seis carbonos capaces de ayudar a un buen crecimiento (Arditti, 1967).

1.2.2.2.3 Luz

Otro de los factores importantes en la germinación de orquídeas es la luz, aunque en la literatura se encuentran reportes con resultados contradictorios sobre este factor. Algunos autores defienden la incubación de semillas de orquídeas en oscuridad, mientras que algunos apoyan la idea de que la luz probablemente beneficia la germinación de semillas (Zettler & McInnis, 1994), la *Vainilla* por ejemplo parece germinar bien en la oscuridad, y no bajo una intensa luz: mientras que las semillas de *Cypripedium* germinan bien y las plántulas jóvenes parecen sobrevivir mejor si se mantienen durante máximo 90 días en oscuridad; ciertas especies pueden germinar en luz y oscuridad, pero las plántulas crecidas en luz serán diferentes de las que crecen en la oscuridad (Arditti, 1976). En general, las orquídeas epífitas requieren luz y las especies terrestres oscuridad para la germinación; se ha observado que la respuesta de la germinación a los fotoperíodos es frecuentemente especie-específica e independiente del hábito de crecimiento.

1.2.2.2.4 Hormonas

Además de los factores antes mencionados, las fitohormonas juegan un papel importante en la germinación de semillas; las hormonas que más se usan como nutrientes en los medios de cultivo son las auxinas y las citoquininas, ya sea para aumentar el porcentaje de germinación o para estimular el protocormo y el desarrollo de las plántulas. La importancia de estas hormonas es limitada en la germinación, pero aumenta durante el desarrollo de los protocormos (Novak et al., 2014); además, algunas otras fitohormonas han sido empleadas para estudiar el efecto que pueden tener en la germinación. Nuevamente, el efecto de cada hormona sobre diferentes estados de desarrollo de la planta puede variar dependiendo de la especie de orquídea.

1.2.2.2.4.1 Efecto de las giberelinas en la germinación

Los efectos de las giberelinas (GAs) endógenas y exógenas en el rompimiento de la latencia de semillas han sido reconocidos en diversas especies de plantas; la aplicación de giberelinas puede reemplazar la necesidad de un estímulo ambiental específico como la temperatura o la luz. Se han

propuesto dos mecanismos de acción de las (GAs) en el proceso de germinación; el primero es su influencia en la hidrólisis de las reservas de alimento ya que se ha observado que su aplicación en semillas de *Lycopersicon esculentum* provoca la hidrólisis de las paredes celulares de las semillas ricas en galactomananas que forman parte de la resistencia mecánica para la protrusión de la radícula. El segundo mecanismo de acción consiste en un efecto directo sobre el potencial de crecimiento del embrión (Karssen *et al.*, 1989; Debeaujon y Koornneef, 2000).

Desde el primer reporte sobre el efecto estimulante del ácido giberélico (GA₃) en semillas de lechuga (Lona, 1956), se han descrito resultados similares en otras plantas. Por ejemplo, se ha demostrado el papel esencial de las GAs en la promoción de germinación en semillas de *Arabidopsis*; esto se ha evidenciado por defectos en la germinación de semillas en mutantes GA deficientes en *ga1-3* y *ga2-1* (Koornneef y van der Veen, 1980; Ogawa *et al.*, 2003) y por el efecto inhibitorio que se observa al utilizar inhibidores de la biosíntesis de giberelinas, como paclobutrazol y uniaconazol, sobre la germinación de semillas (Jacobsen y Olszewski, 1993). Mutantes de tomate deficientes en GA₃ han demostrado que las GAs endógenas promueven la germinación de semillas por la inducción de enzimas que hidrolizan la pared celular en el endospermo, facilitando su debilitamiento y promoviendo la sujeción mecánica de la región del endospermo opuesta a la punta de la radicular (Groot y Karssen, 1987).

1.3 Microorganismos asociados a Orquídeas

Como el resto de las plantas, las orquídeas se encuentran interactuando con microorganismos, siendo los más estudiados los hongos y las bacterias, los cuales producen metabolitos secundarios como hormonas, vitaminas, antibióticos, etc. que pueden beneficiar a la planta, además de que pueden mejorar la disponibilidad de los nutrientes (Chen *et al.*, 2012, Singh *et al.*, 2011, Xing *et al.*, 2011, Tan *et al.*, 2012). Dentro de los metabolitos generados por las bacterias se encuentra el ácido indol acético (IAA) (Tsavkelova *et al.*, 2005; Wilkinson *et al.*, 1994), hormona vegetal responsable de la división, alargamiento y diferenciación de células y tejidos de plantas, jugando un papel importante en desarrollo y crecimiento de la raíz y el xilema (Tsavkelova *et al.*, 2007). Poco se sabe sobre la composición y la actividad funcional de las bacterias asociadas a las orquídeas, los primeros estudios se remontan a finales de 1980, en estos se aislaron bacterias endófitas de las capas internas de las raíces del sustrato de orquídeas terrestres, las bacterias aisladas incluían los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Arthrobacter* y *Kurthia*, además algunas cepas pertenecían a las enterobacterias (Wilkinson *et al.*, 1989, 1994). Tsavkelova *et al.*, en 2003 reportan el aislamiento de cianobacterias del género *Oscillatoria* y *Nostoc* en la superficie de las raíces de la orquídea epífita *Dendrobium*, las cuales fueron capaces de fijar nitrógeno; estas mismas bacterias no se recuperaron del suelo cerca de las plantas, sugiriendo alguna afinidad especial por la superficie de la raíz (Tsavkelova *et al.*, 2003). Además se ha reportado la presencia de bacterias heterotróficas y fototróficas en las orquídeas *Acampe papillosa* y *Dendrobium moschatum* (Tsavkelova *et al.*, 2004), el papel funcional de estos aislados se demostró por la alta actividad de fijación de nitrógeno de la comunidad de cianobacterias asociadas a las orquídeas y la producción de ácido indol-3-acético (IAA) (Tsavkelova *et al.*, 2003, 2005). Kolomeitseva *et al.* (2006) reportaron que la bacterización de semillas de orquídeas epífitas y terrestres de diferentes géneros (*Dendrobium*, *Paphiopedilum*, *Ponthieva*, y *Dactylorhiza*) con *Bacillus*, aislado de *Dendrobium leonis* (Lindl.) Rchb, estimuló la germinación y el desarrollo de las orquídeas (tomado de; Tsavkelova *et al.*, 2006). Además algunos estudios han reportado el uso de *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* asociados a las raíces de vainilla que son utilizados como control biológico de enfermedades causadas por hongos; donde además de disminuir el ataque de estos patógenos, podrían estimular el crecimiento aumentando la producción (Naik *et al.*, 2010).

1.3.1 Hongos asociados a orquídeas

Las asociaciones entre las orquídeas y los hongos han sido ampliamente documentadas, tal es el caso de algunas cepas del género *Fusarium* con la capacidad de estimular la germinación de semillas de orquídeas (Bayman y Otero, 2006). La mayoría de los estudios se han centrado en la especificidad de las micorrizas orquídeoides, las cuales han sido motivo de controversia, pues mientras algunos estudios muestran una relación específica entre el hongo y la orquídea, otros sugieren una relación más generalizada. En este sentido, Stewart y Cane en 2006 reportaron la germinación de la orquídea *Habenaria macroceratitis* por micobiontes provenientes de la misma especie, lo que sugiere una relación específica, mientras que *Tolumnia variegata* y *Ionopsis utricularioides* muestran otro comportamiento, ya que *T. variegata* puede germinar al asociarse con hongos del género *Ceratobasidium* provenientes de plantas adultas tanto de *T. variegata* como provenientes de *I. utricularoide*, mientras que *I. utricularoides* germinó significativamente mejor con sus propios aislados, demostrando que *T. variegata* tienen una asociación menos específica con simbiontes fúngicos que *I. utricularoides* cuya asociación es más específica y efectiva (Otero *et al.*, 2004), sugiriendo la posibilidad de una interacción hongo-orquídea mucho más generalizada. En otro estudio, se reportó un alto grado de especificidad entre dos orquídeas no fotosintéticas del género *Hexalectris* (Taylor *et al.*, 2003). En plantas de Vainilla (*Vanilla planifolia*) se reporta la asociación de hongos del género *Ceratobasidium*, *Thanatephorus* y *Tulasnella*, y se encontró que el hongo *Ceratobasidium* provocó un efecto positivo sobre la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas (Hernández-Hernández, 2011). Se ha reportado la germinación simbiótica *in vitro* de especies de orquídeas terrestres raras como es el caso de *Habenaria macroceratitis* en la que se observó la germinación exitosa de las semillas al ser inoculadas con aislados del género *Epulorhiza* (Stewart & Kane, 2006), también se ha reportado que algunos aislados de *Fusarium* son capaces de inducir la germinación de semillas y la formación protocormos en la orquídea terrestre *Cypripedium reginae* (Vujanovic *et al.*, 2000).

Además de las interacciones simbióticas con hongos micorrízicos, las orquídeas se relacionan con hongos endófitos y epífitos, aunque los estudios al respecto son sorprendentemente escasos (Bayman y Otero, 2006), por lo que es importante estudiar a esta población que ha demostrado tener gran capacidad en la liberación de metabolitos secundarios benéficos para las plantas, además de conferir otros tantos beneficios, por ejemplo, algunos hongos pueden metabolizar un amplio rango de fuentes de carbono y producir enzimas hidrolíticas, incluyendo protopectinasa, celulasa y otras hidrolasas que rompen las macromoléculas, lo que posibilita el crecimiento del hongo como saprófito en suelos con desechos orgánicos o como parásito en diferentes especies vegetales (Rasmussen, 2002).

1.3.1.1 Hongos productores de giberelinas

Las giberelinas constituyen una gran familia de ácidos carboxílicos diterpenoides tetracíclicos, algunos miembros funcionan como hormonas de crecimiento en plantas superiores, han sido reconocidas como reguladoras en numerosos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, involucradas en el discernimiento de los estímulos ambientales (Briones-Moreno *et al.*, 2017; de Lucas *et al.*, 2008; Grennan, 2006). Algunas de las funciones conocidas de las GAs incluyen desarrollo de embriones, inducción de germinación de semillas, desarrollo de raíces, expansión de hojas, alargamiento del tallo, floración, desarrollo de semillas y maduración de polen (Achard & Genschik, 2009; Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006; Ogawa *et al.*, 2003; Pattanaik *et al.*, 2014; Plackett *et al.*, 2011).

Además de ser fitohormonas, las GAs también son producidas por algunos hongos y bacterias. Estos metabolitos fueron identificados por primera vez como productos secundarios del hongo *Fusarium fujikuroi* causante de síntomas de crecimiento descontrolado (enfermedad "bakanae") en plántulas de arroz. La primera giberelina identificada fue el compuesto GA₃ (figura 2), la cual se aisló inicialmente por científicos japoneses y presentaba la capacidad para restaurar el crecimiento normal de las plantas mutantes enanas, efecto asociado a la presencia de sustancias tipo-GA₃ en plantas superiores, llevando a proponer que las GAs son hormonas vegetales naturales que regulan el crecimiento y desarrollo en plantas superiores (Tudzynski, 2005).

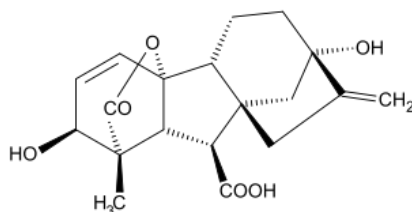


Figura 2. Estructura química del ácido giberélico (GA₃)

Las giberelinas se identificaron primero como metabolitos secundarios del hongo *Fusarium fujikuroi* Nirenberg (teleomorfo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wollenweber), pero están presentes en otros hongos, incluidos otros aislados de *Fusarium* como *F. sacchari*, *F. konzum* y *F. proliferatum* (Troncoso et al. al, 2010; Tsavkelova et al., 2008) y también en otras especies como *Sphaceloma manihoticola* (Rademacher et al., 1979), *Phaeosphaeria* sp. cepa L487 (Kawaide & Sassa, 1993), *Aspergillus fumigatus* (Khan et al., 2011d), *Neurospora crassa* (Kawanabe et al., 1985, 1983), *Penicillium* sp (Hamayun et al., 2010a) y *Phoma herbarum* (Hamayun et al. ., 2009c), entre otros (Tabla 1). Como metabolitos secundarios, no son esenciales para el crecimiento o desarrollo de hongos, y dado que los hongos están expuestos a un ambiente hostil con una diversidad de organismos competidores (Fox & Howlett, 2008), es posible sugerir que metabolitos secundarios (como GA) podrían probablemente constituir una ventaja para que el productor sobreviva en su nicho ecológico.

Tabla 1. Cepas fúngicas productoras de giberelinas (GAs)

Hongos	Giberelinas producidas	Referencia
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	GA ₁ , GA ₃ , GA ₄ , GA ₇ , GA ₅ , GA ₉ , GA ₁₂ , GA ₁₅ , GA ₁₉ , GA ₂₄	Khan et al., 2009
<i>Aspergillus caespitosus</i>	GA ₁ , GA ₄ , GA ₇	Khan et al., 2014 ^a
<i>Aspergillus clavatus</i>	GA ₁ , GA ₃ , GA ₄	You et al., 2015
<i>Aspergillus fumigatus</i>	GA ₄ , GA ₉ , GA ₁₂	Khan et al., 2011d
<i>Cadophora malorum</i>	GA ₁ , GA ₃ , GA ₄ , GA ₇ , GA ₉ , GA ₁₂ , GA ₂₀ , GA ₂₄ , GA ₃₄ , GA ₅₃	You et al., 2013
<i>Chaetomium globosum</i>	GA ₁ , GA ₄ , GA ₉ , GA ₁₂ , GA ₂₀	Khan et al., 2012b
<i>Chrysosporium pseudomerdarium</i>	GA ₁ , GA ₃ , GA ₄ , GA ₇ , GA ₅ , GA ₉ , GA ₁₅ , GA ₁₉ , GA ₂₄	Hamayun et al., 2009 ^a

<i>Cladosporium</i> sp	GA ₁ , GA ₃ , GA ₄ , GA ₇ , GA ₉ , GA ₁₂ , GA ₁₅ , GA ₁₉ , GA ₂₀	Hamayun et al., 2010c
<i>Fusarium moniliforme</i>	GA ₃	Latus-Ziętkiewicz et al., 1996
<i>Gibberella fujikuroi</i>	GA ₃	Rojas et al., 2001
<i>Neosartorya</i> sp	GA ₁ , GA ₃ , GA ₄ , GA ₇ , GA ₉ , GA ₁₅	Hamayun et al., 2011
<i>Neurospora crassa</i>	GA ₃	Kawanabe et al., 1983
<i>Paecilomyces formosus</i>	GA ₁ , GA ₃ , GA ₄ , GA ₈ , GA ₉ , GA ₁₂ , GA ₂₀ , GA ₂₄	Khan et al., 2012 ^a
<i>Penicillium minioluteum</i>	GA ₄ , GA ₇	Khan et al., 2011 ^a
<i>Phaeosphaeria</i> sp	GA ₄ , GA ₉ , GA ₂₄	Sassa et al., 1994
<i>Phoma</i> sp	GA ₁ , GA ₃ , GA ₄ , GA ₉ , GA ₁₅ , GA ₁₉ , GA ₂₀	Hamayun et al., 2010d
<i>Porostereum spadiceum</i>	GA ₁ , GA ₃ , GA ₄ , GA ₅ , GA ₇ , GA ₁₉	Hamayun et al., 2017
<i>Sphaceloma manihoticola</i>	GA ₄	Rademacher and Graebe., 1979

En las orquídeas los efectos de las giberelinas son diversos, por ejemplo, la adición de ácido giberélico (GA₃) en algunas orquídeas aumenta la longitud de la hoja de las plántulas, sin embargo el número de hojas disminuye, en *Phalaenopsis* la aplicación de GA₃ incrementa el tamaño de las hojas de 10.9cm (control) a 18.1cm en un tratamiento usando 125mg/L (Cardoso et al., 2012). Este comportamiento es consistente con los resultados obtenidos por Vichiato et al. (2007) en plantas de *Dendrobium nobile* en las que hubo un incremento de 64.08% en altura y 44.27% en la longitud de las hojas en comparación con las plantas control. Sin embargo en esta orquídea se presentó una disminución del 50% en el diámetro de los pseudobulbos y del 56.09% en el ancho de las hojas. En *Cymbidium*, una alta concentración de GA₃ retrasó la floración y disminuyó el porcentaje de plantas que exhiben la inducción floral, sin embargo, no bloqueó totalmente la inducción floral (Kostenyuk et al., 1999), por otra parte el tratamiento de GAs con *Cypripedium* y *Cattleya* resulta en una floración temprana al compararla con las plantas control (Smith, 1958). En cuanto a la germinación, el ácido giberélico no promovió la germinación de semillas en *Calanthe discolor* (Miyoshi y Mii 1995), pero promovió el desarrollo de las plántulas de *Phalaenopsis* (Cárdenas y Wang 1998). Cuando las plántulas *Phalaenopsis* se cultivaron en la presencia de GA₃, el peso fresco y la longitud de la raíz fueron significativamente mayores que los mismos parámetros medidos en las plántulas control (Cárdenas y Wang 1998). Estos resultados pudieron deberse a que las concentraciones de GA₃ fueron demasiado altas para promover la germinación de semillas, pero óptimas para mejorar el desarrollo de las plántulas. En un contexto diferente, GA₃ mejora la supervivencia de los protocormos de la

orquídea *Orchis purpurella* (Tsavkelova *et al.*, 2008). También se ha reportado que el hongo micorrízico *Fusarium* sp, aislado de la orquídea *Dendrobium desiflorum*, secreta GAs y algunas vitaminas (Wu *et al.*, 2002). En este sentido, se ha propuesto que la capacidad de algunos aislados endófitos de orquídeas para producir fitohormonas podría proporcionar una ventaja en la colonización de la raíz y mejorar otras interacciones con la planta huésped; en el caso de las GAs, se ha demostrado que interfieren con la defensa de las plantas al suprimir la señalización del jasmonato con lo que probablemente comprometen la capacidad del huésped para evadir la infección por hongos (Navarro *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2010; Bhattacharya *et al.*, 2012). Además, los efectos benéficos proporcionados por los microorganismos asociados a plantas provienen en muchas ocasiones de estudios enfocados al aislamiento y evaluación de metabolitos secundarios, por lo que estos resultados podrían sugerir que las interacciones entre los hongos productores de giberelinas y las plantas, así como sus efectos, podrían ser dependientes de la identidad de las especies interactuantes, de ahí la importancia de su identificación.

1.4 Identificación de hongos asociados a plantas

La identificación fenotípica ha sido durante mucho tiempo base y tradición en la identificación de hongos filamentosos, que es sin lugar a dudas de gran importancia; sin embargo, no refleja la diversidad real de la población pues tiene la limitante de que muchos de los hongos asociados a plantas no son cultivables bajo las condiciones con las que se cuenta en un laboratorio; además, algunos aislados presentan micelio estéril lo que impide su identificación, de tal forma que la identificación fenotípica debe ser complementada con técnicas moleculares que permitan poner en evidencia la identidad de este tipo de aislados.

1.4.1 Identificación fenotípica

Los hongos han sido estudiados y descritos tradicionalmente basados en métodos dependientes de cultivos y la caracterización de particularidades morfológicas en cultivo. La mayoría de los hongos pueden ser identificados después del crecimiento en cultivo. Los métodos clásicos de identificación fenotípica para hongos se basan principalmente en una combinación de características morfológicas microscópicas y macroscópicas que incluyen la forma colonial, el color de la superficie y la pigmentación. Debido a que la identificación generalmente depende de la visualización de las estructuras portadoras de esporas, es usualmente dependiente de la capacidad del organismo para esporular. Los hongos que no esporulan en cultivo a menudo son imposibles de identificar y, por lo tanto, es importante seleccionar las condiciones de cultivo que favorezcan la esporulación (Richardson & Warnock, 2012). Estos enfoques tradicionales para la identificación de hongos implican procedimientos de aislamiento, técnicas de esterilización, condiciones de cultivo y la esporulación de los aislamientos (Guo *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 2008; Ko *et al.*, 2011). Es importante tener especial cuidado con estos métodos porque las características de algunos hongos son medio dependientes y las condiciones de cultivo pueden afectar sustancialmente la compatibilidad vegetativa y sexual. Además, de que los métodos convencionales no se pueden aplicar para identificar aislados fúngicos que no esporulan en cultivo, los cuales se clasifican como micelio estéril (Huang *et al.*, 2009). Si bien la identificación fenotípica es un método de bajo costo, no siempre es útil para todos los aislados, como es el caso de los aislados estériles, además de ser necesario un conocimiento profundo que permita identificar a un hongo tomando a consideración únicamente sus características macro y microscópicas. Por lo que la identificación de hongos debe realizarse combinando tanto la técnica de identificación fenotípica como herramientas moleculares que nos permitan complementar los estudios taxonómicos de hongos, brindándonos herramientas que posibilitan la identificación de hongos aún en ausencia de esporas (Huang *et al.*, 2009).

1.4.2 Identificación genotípica

Las técnicas moleculares se han desarrollado para proporcionar una identificación rápida en comparación con los métodos fenotípicos tradicionales (Leaw *et al.*, 2016). Los genes con información filogenética, son aquellos que tienen una misma función en todos los organismos, evolucionan aproximadamente a la misma velocidad y se encuentran presentes en una sola copia en el genoma o bien se comportan como tal (evolución concertada). Algunos genes que se adaptan a estos criterios han sido empleados en estudios filogenéticos de hongos, e incluyen a los genes que codifican para la citocromo oxidasa, factores de elongación de proteínas ribosomales (Mitchell *et al.*, 1995), gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, orotidina -5'-monofosfato descarboxilasa (Taylor *et al.*, 1994) y genes ribosómicos. Dentro de estos genes, el locus más popular en estudios micológicos de identificación basados en ADN, es la región del espaciador transcrito interno (ITS) del ADN ribosomal fúngico (rADN) (Leaw *et al.*, 2006; Hyde & Soyong, 2008). Esta región nuclear, que es bien conocida en los campos de la ecología molecular y la sistemática de hongos, se encuentra entre la subunidad pequeña (SSU) y la subunidad grande (LSU) de los genes del ARN ribosomal (rARN) y contiene dos regiones espaciadoras no codificantes separadas por el gen rARN 5.8S (figura 8). En los hongos es típicamente de aproximadamente 650-900 pb en tamaño, incluyendo el gen 5.8S (Horton & Bruns, 2001), son secuencias altamente variables de gran importancia para distinguir especies de hongos por análisis de PCR (Martin & Rygielwicz, 2005), con la facilidad de que el rADN es un gen multicopia y estas copias están repetidas en tandem, lo que posibilita su amplificación.

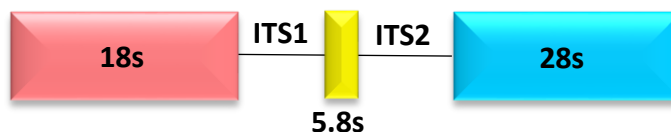


Figura 3. Unidad ARN ribosomal (rDNA). Se presenta el gen 18S, el gen 5.8S, el gen 28S y los dos ITS (espaciadores transcritos internos).

Las ventajas de uso del ADN ribosómico para el estudio de relaciones filogenéticas incluyen: Universalidad y homología. Estas moléculas se encuentran en el genoma de todos los organismos, son secuencias homólogas cuya estructura y función se ha conservado a lo largo de la evolución. Además presentan alto número de copias, pues el agrupamiento de ADNr nuclear en eucariotas consta en la mayoría de los casos de varios cientos de copias repetidas. Los procesos de evolución concertada permiten una homogeneidad en las copias (Hillis & Dixon, 1991). Este fenómeno permite que los genes que codifican para el ARN ribosómico se encuentren bien representados en el ADN extraído, y facilita la amplificación de los mismos a partir de una cantidad mínima de material biológico de partida además de la disponibilidad de secuencias. La secuenciación de cantidades crecientes de estos genes y su almacenamiento en bases de datos públicas permite la comparación con secuencias nuevas y la disponibilidad de “outgroups” para los análisis filogenéticos. Hasta 2012, ~ 172,000 secuencias fúngicas de ITS de longitud completa se depositaron en GenBank, y el 56% se asociaron con un nombre binominal en latín, representando ~ 15,500 especies y 2,500 géneros, derivadas de ~ 11,500 estudios científicos en ~ 500 revistas. (Schoch *et al.*, 2012).

Justificación

La velocidad a la que se están perdiendo las especies y la poca información sobre el impacto de la pérdida de hábitat sobre las especies de orquídeas hace necesario estudiar a los microorganismos asociados a estas plantas. Estamos en una etapa de crisis en cuanto a la pérdida de la diversidad de orquídeas en Puebla ya que los asentamientos humanos y la explotación de estos hábitats con fines lucrativos han puesto en peligro la existencia de algunas de las especies endémicas de la zona.

Los atributos estéticos de las orquídeas, aunado a sus características biológicas, como sus mecanismos de polinización, sus asociaciones simbióticas con hongos, sus características cosmopolitas por ser habitantes de ríos, pantanos, selvas, bosques, desiertos; su capacidad de desarrollarse como colonizadores secundarios, son sólo algunas de las muchas peculiaridades que hacen que esta familia de plantas sea extremadamente interesante. Todos estos factores han incrementado el interés por coleccionarlas, por lo que es indispensable conservar su diversidad para proponer un mejor aprovechamiento desde distintos enfoques como el ornamental, educativo y científico.

Stanhopea tigrina, orquídea cultural, biológica y económicamente importante para México y en particular para Puebla, actualmente se encuentra amenazada y en resguardo por parte del gobierno. La contribución al conocimiento de la diversidad microbiológica asociada a esta orquídea podría ayudarnos a proponer estrategias que puedan revertir en un futuro su estado de amenaza.

3 Objetivos

3.1 Objetivo General

- Identificar fenotípica y genotípicamente aislados fúngicos productores de giberelinas con efecto benéfico sobre la especie de orquídea amenazada *Stanhopea tigrina* del jardín botánico Xoxoctic, Cuetzalan del Progreso, Puebla.

3.2 Objetivos específicos

- Obtener muestras de la orquídea *Stanhopea tigrina*.
- Aislar hongos microscópicos epífitos y endófitos de plantas de *Stanhopea tigrina*.
- Identificar fenotípica y genotípicamente los aislados de hongos microscópicos recuperados.
- Analizar la distribución de las especies fúngicas identificadas
- Evaluar la capacidad de los aislados fúngicos para producir giberelinas.
- Valorar el efecto de hongos productores de giberelinas sobre la germinación de semillas.

4 Metodología

4.1 Diagrama de trabajo

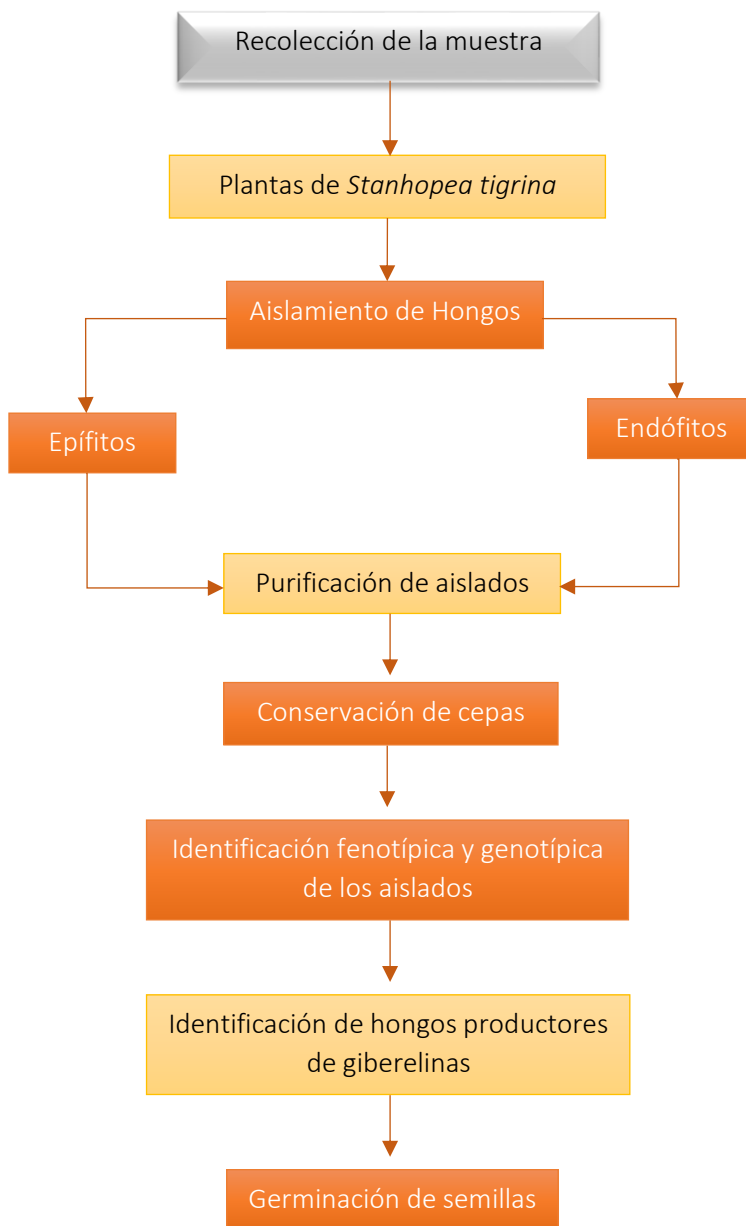


Figura 4. Representación esquemática y sintetizada del desarrollo experimental.

4.2 Muestreo

Las muestras fueron recolectadas en el jardín botánico Xoxoctic, que corresponde a un ecosistema de bosque mesófilo de montaña, con una altitud de 1000 msnm, que presenta un clima húmedo de templado a cálido y lluvia durante todo el año (PYGEUM, 2009), el lugar alberga la riqueza que ofrece este ecosistema en la sierra poblana, rodeado por árboles siempre verdes y orquídeas de distintas especies, diversidad de helechos, entre otra vegetación. El jardín botánico se localiza en los alrededores de Cuetzalán del Progreso, Puebla (México) y cabe mencionar que este sitio corresponde a una reserva natural en donde se preservan las especies nativas de la región.

Durante el muestreo se recolectaron plantas de la orquídea *Stanhopea tigrina*, las cuales fueron identificadas por el Biólogo Raúl Álvarez Mora (Jardín botánico Xoxoctic), y fueron depositadas en bolsas plásticas con cierre hermético, rotuladas y colocadas en hieleras para después ser transportadas al laboratorio (figura 5).

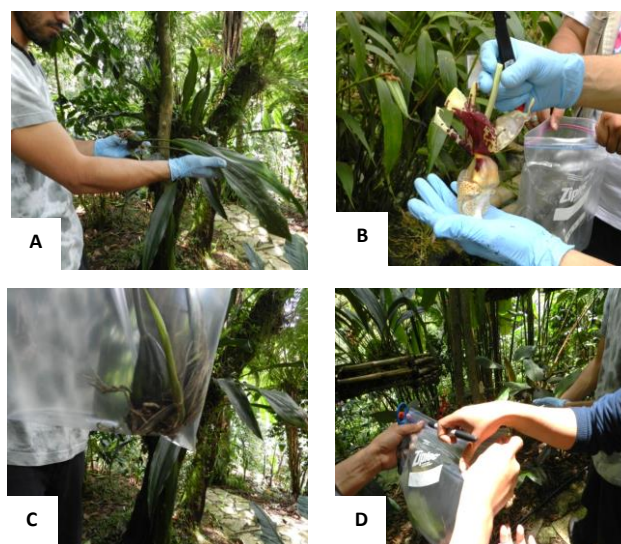


Figura 5. Recolección de plantas de *Stanhopea tigrina*. A) Recolección de plantas, B) obtención de flor de *S. tigrina*, C) muestras colocadas en bolsas plásticas, D) muestras siendo rotuladas.

4.3 Procesamiento de las muestras

Las muestras de *S. tigrina* fueron llevadas al laboratorio y procesadas 24 horas posteriores a su obtención; a partir de las plantas recolectadas se aislaron hongos endófitos y epífitos. Para la obtención de cepas se realizaron dos procedimientos, los cuales se describen a continuación:

4.3.1 Procedimiento 1

Aislamiento de epífitos:

El aislamiento de epífitos se realizó utilizando los tejidos de la raíz, pseudobulbo y hoja de tres plantas, así como de una flor. Los tejidos se procesaron por separado y en condiciones de esterilidad. Primero se pesaron dos gramos de cada tejido y se lavaron en 100 ml de solución salina isotónica con agitación

constante por un período de 3 minutos; concluido el tiempo de lavado, los tejidos fueron retirados y utilizando el sobrenadante se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Se tomaron 100µl de cada dilución y se colocaron en placas petri con medio de cultivo PDA, V8, LB, Agar Nutritivo y Medio Mínimo (Tabla 2).

Aislamiento de endófitos:

Las muestras de raíz, pseudobulbo, hoja y flor (2 g) utilizadas en el procedimiento antes descrito fueron lavadas con agua destilada estéril por 2 minutos, enseguida se realizó un lavado con alcohol al 70% y agitación manual durante 2 minutos, posteriormente se sometieron a otro lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 1% y agitación por 2 minutos, finalmente se realizaron dos lavados con agua destilada estéril y agitación; cada lavado tuvo una duración de un minuto y se realizaron con la finalidad de retirar el exceso de desinfectante. Las muestras fueron cortadas en pequeños fragmentos y se maceraron en un mortero con pistilo estéril. El extracto obtenido se pasó a un frasco estéril y se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} ; a partir de las diluciones se tomaron 100 µl de cada dilución y se pusieron en placas con medio PDA, V8, LB, Agar Nutritivo y Medio Mínimo (Tabla 2).

4.3.2 Procedimiento 2

Aislamiento de epífitos:

Se utilizaron muestras de raíz, pseudobulbo y hoja, provenientes de tres plantas, además de una flor de *Stanhopea tigrina*; los tejidos se procesaron por separado en condiciones de esterilidad utilizando dos gramos de cada uno. Para cada muestra, se humedeció un hisopo con solución salina isotónica estéril y se pasó sobre los tejidos de la planta tratando de recolectar la mayor cantidad de muestra posible sin maltratar el tejido; una vez recolectada la muestra el hisopo se sumergió en un tubo eppendorf con 1 ml de solución salina isotónica estéril. A partir de esta muestra se realizaron diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} y se colocaron 100 µl de cada muestra en medios de cultivo sólido PDA, V8 y Agar Malta adicionados con cloranfenicol (50 µg/ml) (Tabla 2).

Aislamiento de endófitos:

Utilizando las muestras de raíz, pseudobulbo, hoja y flor (2g) del procedimiento anterior, se aplicó un lavado superficial con agua destilada estéril por 2 minutos, seguido de un lavado con alcohol al 70% y agitación por 2 minutos, se retiró el alcohol y se hizo un lavado con solución de hipoclorito de sodio al 1% con agitación por 2 minutos. Finalmente se realizaron dos lavados en agua destilada estéril con agitación por un minuto para cada lavado. Las muestras ya desinfectadas se cortaron en pequeños fragmentos y se maceraron en un mortero con pistilo estéril. El extracto obtenido se pasó a un frasco estéril y luego se realizaron diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Se colocaron 100 µl de cada dilución en placas con medio PDA, V8 y Agar Malta adicionados con cloranfenicol (50 µg/ml) (Tabla 2).

Tabla 2 Procedimientos utilizados en el aislamiento de hongos presentes en la orquídea *S. tigrina*

Procedimiento 1	Procedimiento 2
Aislamiento de epífitos	Aislamiento de epífitos
Lavado en 100ml solución salina, 3min	Un hisopo húmedo se pasó sobre la muestra
Diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}	Diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}
LB, Agar Nutritivo, Medio mínimo enriquecido, PDA y V8	Agar malta, PDA y V8 (Cm [50µg/ml])
Aislamiento de endófitos	Aislamiento de endófitos

Desinfección de tejido
Macerado
Diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}
LB, Agar Nutritivo, Medio mínimo
enriquecido, PDA y V8

Desinfección de tejidos
Macerado
Diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}
Agar malta, PDA y V8 (Cm
[50µg/ml])

4.3.3 Aislamiento de hongos de la rizósfera

Aunado al aislamiento de hongos asociados a tejidos, se realizó el aislamiento de hongos asociados a rizósfera. Para este aislamiento se tomó 1 gramo de muestra y se colocó en 100ml de solución salina isotónica, la muestra se mezcló y se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} ; a partir de cada dilución se tomaron 100µl que fueron colocados en placas con PDA, V8, LB, Agar Nutritivo y Medio Mínimo para el procedimiento 1 o bien en medio PDA, V8 y Agar Malta adicionados con cloranfenicol (50µg/ml) para el procedimiento 2.

4.4 Conservación de muestras

Una vez inoculadas las placas, éstas fueron incubadas a 30°C por una semana, el crecimiento de las cepas se monitoreó diariamente y las colonias obtenidas durante el procedimiento fueron seleccionadas tomando únicamente fenotipos representativos de cada placa. Las cepas obtenidas fueron purificadas resembrando en medio PDA; para cada uno de los aislamientos se realizaron las resiembras necesarias hasta obtener cultivos puros, los cuales fueron preservados en medio YEPS-glicerol (50:50).

Para la preservación de aislados, los cultivos fueron crecidos en 5ml de medio líquido YEPS por 72 horas. Después de la incubación, el cultivo se centrifugó a 12 000 RPM por 8 minutos, el sobrenadante se eliminó y se adicionó al tubo 1 ml de glicerol-YEPS (50:50) en donde se resuspendió el botón celular. La suspensión se transfirió a un criovial, se rotuló y almacenó a -80°C.

4.5 Identificación de los hongos filamentosos

4.5.1 Identificación mediante características morfológicas

Para realizar la identificación morfológica, los aislados fueron crecidos en medio de cultivo PDA a 30°C por una semana, después de este periodo se observaron sus características macroscópicas incluyendo el tipo de colonia, color, aspecto del filamento, anverso de la colonia y pigmentación al medio; además los aislados se sometieron a crecimiento en condiciones de microcultivo para poder observar sus características microscópicas.

Para realizar la técnica de microcultivo, primero se cortó un cubo de agar PDA estéril el cual fue colocado sobre un portaobjetos. En los laterales del cubo de agar se sembró el aislado fúngico y se puso encima un cubreobjetos; el sistema se colocó en una placa de petri en ambiente de cámara húmeda (Figura 6) y se incubó a 30 °C. Transcurridos siete días, se tomó el cubreobjetos sobre el que se encuentran adheridos los filamentos fúngicos que se formaron y se colocó sobre un portaobjetos con una gota de azul de algodón para su observación al microscopio (Prats, 2006).

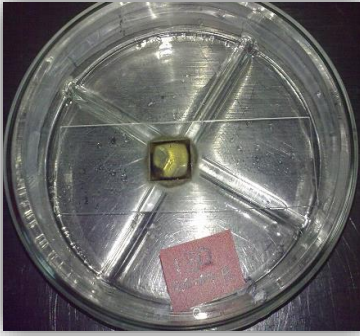


Figura 6. Preparación del microcultivo. Se deposita un cubo de agar en el centro en donde se desarrolla el crecimiento del aislado. El crecimiento se desarrolla en ambiente de cámara húmeda.

Las preparaciones obtenidas se observaron al microscopio utilizando el objetivo 40X y 100X los cuales permitieron apreciar estructuras microscópicas las cuales fueron comparadas con bibliografía de referencia (Arenas, 2008; Koneman, 2001). Una vez observadas las características macroscópicas y microscópicas los aislados se agruparon en morfogrupos.

4.5.2 Identificación molecular

4.5.2.1 Extracción de ADN

A partir de los morfogrupos obtenidos se tomaron aislados representativos de cada morfogrupo y se realizó su identificación genotípica. Como primer paso en la identificación genotípica se realizó la extracción de ADN utilizando un método modificado del reportado por Liu *et al.* (2000), (i) En un tubo eppendorf de 1.5 ml que contenía 500 μ l de una solución tampón de lisis (400 mM de Tris-HCl [pH 8.0], 60 mM de EDTA [pH 8.0], 150 mM de NaCl, 1% de dodecilsulfato de sodio), se añadió un pequeño trozo de micelio y se agregaron dos perlas de vidrio de 6mm de diámetro, el tubo se agitó por 30 min (ii) Posteriormente se agregó 150 μ l de una solución de acetato de potasio (a pH 4.8; la cual contenía 60 ml de 5 M de acetato de potasio, 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua destilada), el tubo fue mezclado con vortex brevemente y se centrifugó a $> 10000 \times g$ durante 5 min. (iii) El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó nuevamente según lo descrito anteriormente. A continuación se añadió un volumen igual de alcohol isopropílico y se mezcló brevemente por inversión. (iv) Posteriormente el tubo se centrifugó a $> 10,000 \times g$ por 5 min, y el sobrenadante se descartó. El ADN resultante se lavó en 300 μ l de etanol al 70%. El pellet se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se descartó. Finalmente el pellet de ADN se secó al aire y se disolvió en 40 μ l de agua libre de nucleasas.

4.5.2.2 Amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

Para la amplificación del ADN se utilizaron los oligonucleotidos ITS1F y LR5 (Tabla 3) reportados en la literatura. Estos flanquean una región del rADN, que incluye el gen 18S, el espaciador intergénico ITS1, el gen 5.8S, el espaciador ITS2 y el gen 28S (Luna *et al.*, 2001; Tedersoo *et al.*, 2006; Guevara,

2004). Este rDNA contiene la información para el RNA que conforman los ribosomas (Rentara, 2007) y es un gen multicopia repetido en tandem, lo que facilita su amplificación. Además de que entre las secuencias altamente conservadas de los genes de esta región se encuentran estas regiones variables, denominadas espaciadores ITS (Internal Transcribed Spacer), cuya función es desconocida (Peintner *et al.*, 2004), aunque la tasa de variabilidad en estas regiones espaciadores es más elevada que en los genes, sus secuencias se pueden alinear con confianza entre taxones estrechamente relacionados (Guarro *et al.*, 1999), por lo que es altamente confiable para la identificación genotípica. En este trabajo se utilizó esta región para identificar a los aislados a nivel de género.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la PCR

PRIMERS	SECUENCIA	Tm		REFERENCIA
ITS1F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	60°	Fwd	M. Gardes & T. D. Bruns, 1993
LR5	TCC TGA GGG AAA CTT CG	52°	Rev	Hopple and Vilgalys, 1994

Las condiciones de reacción utilizadas durante la PCR se describen a continuación. En un microtubo para PCR se agregaron los reactivos según se describe en la tabla 4. La PCR se realizó bajo el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos; para cada ciclo una desnaturalización a 94°C por 35 segundos, el alineamiento a 55°C por 35 segundos y la extensión a 72°C por 2 minutos. La reacción concluyó con una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Para visualizar el ADN, se realizó el corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1%, los cuales se migraron a 100V en buffer TAE 1X durante 40 minutos. Una vez corridos los geles fueron teñidos con Bromuro de Etidio (BrEt) y visualizados en un transiluminador.

Tabla 4. Reactivos utilizados para la PCR

REACTIVO	CANTIDAD (ul)
Agua estéril	17.5
Buffer 10x	2.5
Taq [0.5 u]	0.5
dNtps [200 mM]	0.5
ITS1Fwd [1 mM]	0.5
LR5Rev [1 mM]	0.5
ADN [10-100 ng]	2
DMSO	1

4.5.2.3 Secuenciación y análisis de secuencias

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar bajo las condiciones de macrogen proveedor del servicio. Una vez recibidas las secuencias nucleotídicas, éstas fueron alineadas y comparadas con aquellas que están depositadas en la base de datos del GenBank utilizando los programas Bioedit y BLAST.

4.6 Identificación fenotípica de levaduras

4.6.1 Tinción de Gram

En la identificación fenotípica de levaduras, como primera aproximación se realizó la tinción de Gram. La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial, que puede ser utilizada en la tinción de levaduras al teñirlas como Gram positivas debido a la cantidad de lípidos y esteroides que presentan en la pared celular (Bartholomew & Mittwer, 1952).

Primero se preparó el frotis, para lo cual se colocó una gota de agua destilada en medio de un portaobjetos y se tomó un poco de muestra, se mezcló la muestra y el agua destilada, posteriormente la preparación se fijó con calor, teniendo precaución de un sobrecalentamiento.

Para realizar la tinción de Gram se colocó cristal violeta sobre el frotis por un minuto, luego de un minuto la muestra se enjuagó (evitando que el chorro de agua cayera directamente sobre la muestra), se secó al aire y se procedió a colocar lugol sobre la misma, pasando un minuto la muestra se lavó y secó, posteriormente se colocó alcohol-cetona, se enjuagó el portaobjetos y se colocó safranina sobre la muestra por 30 segundos, finalmente se enjuagó el portaobjetos y se dejó secar completamente. Una vez realizada la tinción, las laminillas fueron observadas en un microscopio de luz empleando el objetivo 40X y 100X.

4.6.2 Tinción con azul de algodón

Continuando con la identificación de levaduras se realizó la tinción con azul de algodón. La tinción de azul de algodón posee características tintoriales que permiten observar componentes fúngicos. El azul de algodón es un colorante ácido, que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas. Para realizar la tinción con azul de algodón primero se preparó un extendido de la muestra el cual fue fijado con calor, una vez obtenido el extendido se colocó una gota de azul de algodón sobre la muestra, se puso un cubreobjetos sobre la muestra y se observó al microscopio.

4.6.3 Auxonogramas

Un paso importante en la identificación de levaduras está relacionada con su metabolismo, en este trabajo y como parte de una identificación parcial se midió la capacidad de asimilación de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Por lo que se realizaron auxonogramas, el método se fundamenta en el empleo de diversos nutrientes hidrocarbonados o nitrogenados sobre un medio sintético base, la prueba indica la capacidad de la levadura para metabolizar diferentes moléculas simples, las cuales podría utilizar el microorganismo como nutriente o como fuente de energía. Estas capacidades metabólicas son empleadas de manera diferente por cada levadura, lo que ayudó a describir parcialmente su metabolismo básico.

4.6.3.1 Asimilación de fuentes de carbono

Para la prueba de asimilación de fuentes de carbono se utilizaron la glucosa, galactosa y manosa como fuentes de carbono. Las cepas se pusieron a crecer por 72 horas a 30°C en las diferentes fuentes de carbono, al finalizar el periodo de incubación se observó si hubo crecimiento de las cepas en alguna de las fuentes utilizadas.

4.6.3.2 Asimilación de fuentes de nitrógeno

En la prueba de asimilación de fuentes de nitrógeno se utilizaron a la urea, fenilalanina y cloruro de amonio. Las muestras se pusieron a crecer en los medios con las diferentes fuentes de nitrógeno y fueron incubadas a 30°C por 72 horas, al finalizar se observó la presencia o no de crecimiento sobre los medios, se tomó como asimilación positiva si las cepas pudieron crecer sobre el medio evaluado.

4.7 Producción de giberelinas

4.7.1 Determinación cualitativa de la producción de giberelinas

La evaluación de la producción de giberelinas en los aislados (filamentosos y levaduriformes) se realizó inoculando las muestras en 5 ml de medio ICI, con baja concentración de nitrógeno, e incubando a 30°C, la incubación se realizó por 10 días en el caso de los hongos filamentosos y por 72 horas en el caso de los aislados levaduriformes. Las cepas se crecieron en condiciones de oscuridad y agitación (1200 RPM). Una vez que las muestras salieron de incubación se tomó una alícuota de 0.2 ml del medio de cultivo y se mezcló con 0.2 ml de etanol (96%, v/v), a esta mezcla se le adicionaron 2 ml de una mezcla fría de volúmenes iguales de ácido sulfúrico y etanol al 96%. La mezcla se incubó a 48°C por 30 minutos. Las muestras fueron observadas con lámpara UV, aquellas muestras que fueron positivas para la producción de giberelinas presentaron fluorescencia verde. (Candau *et al.*, 1992), mientras que las negativas no presentaron fluorescencia. Se utilizaron; como control negativo tubos con medio ICI (sin cultivo) y como control positivo el reactivo de ácido giberélico (GA3) (sigma) en diferentes concentraciones [2 µg, 6 µg y 12 µg].

4.7.2 Determinación cuantitativa de la producción de giberelinas

4.7.2.1 Preparación de la muestra

Para la determinación cuantitativa de giberelinas se midió la capacidad cualitativa de los aislados de producir giberelinas en medio ICI y Czapek, ambos medios contienen una baja concentración de nitrógeno, requisito indispensable para la producción de giberelinas y han sido utilizados en estudios de microorganismos productores de giberelinas. Según los resultados de este ensayo se decidió utilizar al medio de cultivo Czapek.

A partir de micelio de siete días de edad, se inoculó un matraz que contenía 100 ml de caldo Czapek (1% glucosa, 1% peptona). Los matraces se incubaron a 30°C en presencia de luz. Después de 10 días el cultivo se filtró. Se tomaron 50 ml del filtrado y se ajustó el pH a 2.5-3 por adición de 1N de HCl. Las muestras fueron extraídas utilizando acetato de etilo como disolvente de extracción. Para la extracción se usó un embudo de separación de 1L, las muestras se extrajeron tres veces utilizando acetato de etilo (1:1). La fase orgánica se separó y se pasó a través de sulfato de sodio anhidro (10 g). El disolvente se evaporó en un rotavapor de vacío a 40°C y 10 rpm. Finalmente el residuo se disolvió en 50 µl de metanol grado HPLC y se usó para análisis en HPLC/cromatografía en capa fina.

4.7.2.2 Cromatografía en capa fina (CCF)

Para la cromatografía en capa fina se utilizaron láminas de aluminio recubiertas con gel de sílice. Las placas se cortaron a un tamaño apropiado (10 x 8 cm), las giberelinas puras y las muestras se disolvieron en metanol y se colocaron en la placa con ayuda de un capilar de vidrio fino. El solvente se dejó evaporar. La CCF se corrió en un sistema que contenía Cloroformo/Acetato de etilo/ Ácido acético (5:4:1). Las manchas se visualizaron en UV (254 nm y 366nm) después de cubrir con etanol: ácido sulfúrico concentrado (95: 5) (Castillo *et al.*, 2007).

4.7.2.3 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Para la determinación cuantitativa de giberelinas por HPLC, se utilizó un instrumento Hewlett Packard HPLC (Serie 1100) equipado con un desgasificador cuaternario, una bomba cuaternaria. La fase estacionaria consistió en una columna C 18 fase reversa de acero inoxidable. Los cromatogramas se registraron en un software OPEN LAB versión Ad1.d4. Se usó acetonitrilo y agua ácida (0.01% H₃PO₄) como fase móvil en una proporción de 70:30 por un periodo de 15 minutos con una velocidad de flujo de 0.6 ml/min. Todas las muestras se filtraron a través de 0.2 µm de membrana (Millipore) utilizando un sistema de jeringa de filtración. Se utilizaron estándares con una concentración de 1 mg/ml y se inyectaron 1 µl de cada solución incluyendo los estándares y las alícuotas, a una longitud de onda de 206nm (modificado de Bhalla *et al.*, 2010). La concentración de giberelinas se calculó aplicando la ecuación reportada por Bhalla *et al.*, 2010.

$$\gamma = \alpha \times c \times v/\beta$$

Donde:

γ = concentración del analito deseado

α =área del pico de la muestra

c =concentración de la solución estándar (µg mL⁻¹)

v =volumen de la muestra

β =área del pico del respectivo estándar

4.7.3 Identificación molecular de hongos productores de giberelinas

4.7.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el “Animal and Fungi DNA preparation Kit” (Jena Biosence). Según el protocolo que se describe a continuación: (I) Lisis celular de los hongos. Se transfirió 1ml del cultivo a un microtubo de 1.5 ml. Se obtuvieron las células por centrifugación a 15,000g por 1 minuto y se desechó el supernadante. Posteriormente se resuspendió la pastilla celular en 300 µl de Cell Resuspension Solution y se adicionaron 1.5 µl de Proteinase K solution. La muestra se invirtió varias veces para mezclar. La solución se incubó a 55°C por 60 minutos. Pasado ese periodo se centrifugó la muestra a 15,000 g por 1 minuto y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 300 µl de Cell Lysis Solution. (II) Precipitación de proteínas. Se añadieron 100µl de Protein Precipitation Solution al lisado celular. Y se mezcló la muestra usando vortex por 20 segundos. La muestra fue centrifugada a 15,000g por 3 minutos. (III) El supernadante se transfirió a un nuevo tubo de 1.5ml que contenía 30 µl de isopropanol, la muestra se mezcló invirtiendo gentilmente. Posteriormente la muestra se centrifugó a 15,000g por un minuto, se descartó el sobrenadante y el tubo se colocó sobre

un papel absorbente. Se añadieron 500 µl de Washing buffer, posteriormente el tubo se invirtió varias veces para lavar el ADN. Se centrifugo la muestra a 15,000g por 1 minuto. Se desechó el sobrenadante cuidadosamente y se dejó secar al aire a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos. (IV) Hidratación del ADN. La muestra se rehidrató en 40µl de agua libre de nucleasas y almacenó a -80°C.

4.7.3.2 Amplificación de ADN por PCR

La amplificación del ADN de la muestra se realizó utilizando los oligonucleótidos ITS1F y LR5, las condiciones de PCR que se utilizaron fueron las mismas que las descritas en el apartado 4.5.2.2.

4.7.3.3 Secuenciación y análisis de secuencias

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar bajo las condiciones de macrogen proveedor del servicio. Una vez obtenidas las secuencias, se realizó una comparación y alineamiento de éstas empleando los programas BioEdit y BLAST.

4.8 Germinación de semillas

4.8.1. Recolección y almacenamiento de semillas

Tres cápsulas de *S. tigrina* se recolectaron el 18 de marzo de 2016, después de su colecta fueron secadas sobre gel de sílice por una semana a 25°C ± 2°C, y almacenadas en obscuridad a 4°C hasta el momento de ser utilizadas.

4.8.2 Desinfección de cápsula

La desinfección de semillas se realizó en campana de flujo laminar. Primero se enjuagó la cápsula con agua destilada estéril, en seguida se sumergió la cápsula en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5% por diez minutos y se enjuagó con agua destilada tres veces (Zhang *et al.*, 2013), se transfirió la cápsula a una superficie desinfectada (una caja petri estéril), la cápsula se cortó longitudinalmente a la mitad con la ayuda de un bisturí desinfectado (Roy *et al.*, 2011). Se levantó una mitad de la cápsula con las pinzas y se golpeó ligeramente sobre un recipiente estéril para obtener las semillas.

4.8.2.1 Desinfección de semillas

Las semillas obtenidas se esterilizaron por 1 minuto en una solución que contiene 5 ml de etanol (100%), 5 ml de NaOCl al 6% y 90 ml de agua estéril desionizada. Seguida de la esterilización, las semillas fueron enjuagadas tres veces por un minuto en agua desionizada estéril (Dutra *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2007; Stewart & Kane, 2006).

4.8.3. Germinación simbiótica

4.8.3.1. Crecimiento de las cepas

Las cepas fúngicas que se utilizaron en el ensayo piloto de germinación fueron cultivadas a 30°C por una semana (7 días) en medio PDA con antibiótico (50 mg/ml de penicilina y cloranfenicol) (Khamchatra et al., 2016; Swangmaneecharern et al., 2012).

4.8.3.2 Inoculación de semillas y hongos

Para la inoculación de las semillas y los hongos, primero se preparó una suspensión de semillas, para lo cual se tomó una porción pequeña de semillas y se diluyeron en 1 ml de agua, de esta suspensión se tomaron 50 µl, que contenían aproximadamente 50 semillas, y se colocaron en cada una de las placas. El medio que se utilizó para el ensayo fue el agar harina de avena (OMA). Una vez inoculadas las semillas se dispersaron sobre todo el medio utilizando un asa bacteriológica estéril. Las placas inoculadas se dejaron secar por unos minutos en condiciones de esterilidad, posteriormente se inocularon con 5 mm de agar con el hongo a probar. Esta porción de agar fue tomada de las placas que contenían el hongo crecido por siete días (Stewart & Zettler, 2002; Aewsakul et al., 2013; Tan et al., 2014). La porción de agar se colocó en el centro de la placa que ya contenía las semillas de la orquídea, se usó como control negativo placas de agar OMA con semillas de la orquídea sin hongo. Una vez que las placas estuvieron inoculadas se sellaron con parafilm e incubaron según se describe en el siguiente apartado.

4.8.3.3 Incubación

Las muestras se incubaron a $25 \pm 3^\circ\text{C}$ en obscuridad por 5 semanas observando el crecimiento dos veces por semana (Aewsakul et al., 2013; Dutra et al., 2009; Johnson et al., 2007). Pasado este periodo las muestras se incubaron por 12 horas de luz/obscuridad (Stewart & Zettler, 2002).

4.8.3.4 Desarrollo de semillas

El desarrollo de las semillas se monitoreó dos veces por semana. Para monitorear el desarrollo de las semillas, las placas se colocaron en campana de flujo laminar y se observó la etapa de germinación de las semillas utilizando un microscopio Nikon eclipse E600. Cada placa en observación se expuso a luz natural por aproximadamente 20 minutos. La germinación y el desarrollo del protocormo se midió en base a una escala que va de 0-5 (Dutra et al., 2008; Stewart & Kane, 2006; Stewart & Zettler, 2002; Johnson & Kane, 2007; Zeng et al., 2012) según lo que se presenta en la tabla 5. Los porcentajes de germinación se calculan dividiendo el número de semillas en cada etapa de germinación y el desarrollo individual por el número total de semillas en la muestra (Johnson & Kane, 2007; Zeng et al., 2012).

Tabla 5. Estadios de germinación de semillas y desarrollo de protocormos.

Estado

--

0	No germinación
1	Embrión hinchado, producción de rizoides
2	Alargamiento del embrión, ruptura de la testa
3	Aparición de promeristemo
4	Aparición de la primera hoja
5	Alargamiento de la primera hoja

4.8.4. Germinación asímbiotica

Las semillas se manipularon según lo descrito en los apartados 4.10.1, 4.10.2 y 4.10.2.1, una vez obtenidas se preparó una suspensión de semillas, para lo cual se tomó una porción pequeña de semillas y se diluyeron en 1 ml de agua. De esta suspensión se tomaron 50 μ l, que contenían aproximadamente 50 semillas y se colocaron en medio 1/2 MS (Murashige y Skoog) adicionado con diferentes concentraciones de ácido giberélico (0, 5, 10 y 15 μ M) (Pedroza-Manrique *et al.*, 2005), cada condición se realizó por triplicado. Las muestras se incubaron $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ en oscuridad por 5 semanas observando el crecimiento dos veces por semana (Aewsakul *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2007). Pasado este periodo las muestras se incubaron por 12 horas de luz/oscuridad (Stewart & Zettler, 2002). Finalmente, el desarrollo de las semillas se monitoreó tomando en cuenta los estadios que se presentan en la tabla 5.

5. Resultados

5.1 Obtención de muestras

En la naturaleza las orquídeas presentan diferentes hábitos de crecimiento, pueden crecer como litófitas, epífitas y terrestres (Ortiz-Arias, 2002; Sathiyadash *et al.*, 2012). *Stanhopea tigrina* presenta dos hábitos principales de crecimiento, ya que puede encontrarse creciendo como epífita o litófito (Soto-Arenas, 2002); en el lugar de toma de muestra la orquídea se encontraba creciendo en ambos hábitos por lo que se recolectaron los dos tipos de plantas. De las seis plantas de *S. tigrina* recolectadas, tres crecían sobre sustratos que incluían fibra de coco y tierra, dos plantas crecían de manera epífita sobre árboles de *Inga vera* y una crecía de manera litófito sobre roca sedimentaria; además, se recolectó una flor de *S. tigrina* (Figura 7) y se tomaron muestras de la rizósfera asociada a las plantas recolectadas. De todas estas plantas, se recuperaron los hongos epífitos y endófitos asociados a los diferentes tejidos.

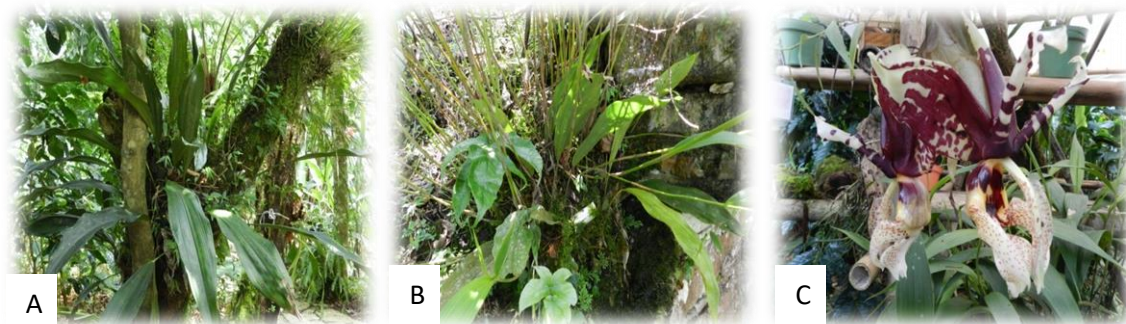


Figura 7. Hábitos de crecimiento de *S. tigrina*. Se muestran los hábitos de crecimiento de las plantas de *S. tigrina* presentes en el jardín botánico Xoxoctic. A) Planta de crecimiento epífita, B) crecimiento litófito y C) flor de *S. tigrina*

5.2 Aislamiento de hongos asociados a plantas de *Stanhopea tigrina*

A partir de las plantas recolectadas se realizó el aislamiento de hongos endófitos y epífitos presentes en los diferentes tejidos de las orquídeas. El aislamiento se realizó empleando dos procedimientos y para cada uno de ellos se trabajó con tres plantas; sólo las muestras de flor se sometieron a ambos procedimientos. La principal diferencia entre ambos procedimientos consiste en el empleo de un antibiótico sólo para el procedimiento 2; la otra diferencia se refiere a los medios empleados para cada caso, mientras que en el procedimiento 1 se emplearon medios ricos, en el procedimiento 2 se incluyó además el empleo del agar malta, utilizado habitualmente para recuperar hongos micorrícicos. El empleo de ambos procedimientos se realizó con la intención de recuperar la mayor cantidad de aislados posibles.

Cuando se empleó el procedimiento uno, se recuperó un total de 456 aislados, de los cuales 134 correspondieron a endófitos, 241 fueron epífitos y 81 fueron aislados a partir de la rizósfera (tabla 6), observando un mayor número de aislados a partir de pseudobulbo, hoja y raíz, mientras que se obtuvo un número menor de aislados fúngicos de la rizósfera.

Tabla 6. Hongos aislados de las plantas de *S. tigrina* utilizando el procedimiento 1.

Tejido	Planta 1		Planta 2		Planta 3	
	Endófito	Epífito	Endófito	Epífito	Endófito	Epífito
Flor	12	23				
Hoja	19	20	9	19	12	28
Pseudobulbo	18	22	6	17	14	29
Raíz	16	30	17	21	11	32
Rizósfera		31		23		27
Subtotal	65	126	32	80	37	116
Subtotal		191		112		153
Total						456

Por otro lado, al emplear el procedimiento dos se obtuvieron 435 aislados; 113 de los cuales fueron endófitos, 250 aislados correspondieron a epífitos y 72 fueron recuperados de la rizósfera (tabla 7). Al emplear este procedimiento, los tejidos con mayor número de aislados fueron también el pseudobulbo, la hoja y la raíz, igual que en el caso anterior.

Tabla 7. Hongos aislados de *S. tigrina* utilizando el procedimiento 2.

Tejido	Planta 4		Planta 5		Planta 6	
	Endófito	Epífito	Endófito	Epífito	Endófito	Epífito
Flor	8	2				
Hoja	4	38	8	30	11	28
Pseudobulbo	11	71	21	17	23	24
Raíz	12	13	4	14	14	13
Rizósfera		28		14		30
Subtotal	35	152	30	75	48	95
Subtotal		187		105		143
Total						435

En total, al emplear ambos procedimientos se obtuvo una población de 891 aislados fúngicos provenientes de 6 plantas; la mayoría de los cuales provinieron del pseudobulbo, raíz y hoja, observándose un menor número de aislados de flor y rizósfera (figura 8). En cuanto a su localización, se obtuvo un número mayor de aislados de origen epífito y menos de origen endófito; ambas poblaciones con un número de aislados total mayor al recuperado de la rizósfera (figura 8 y 9).

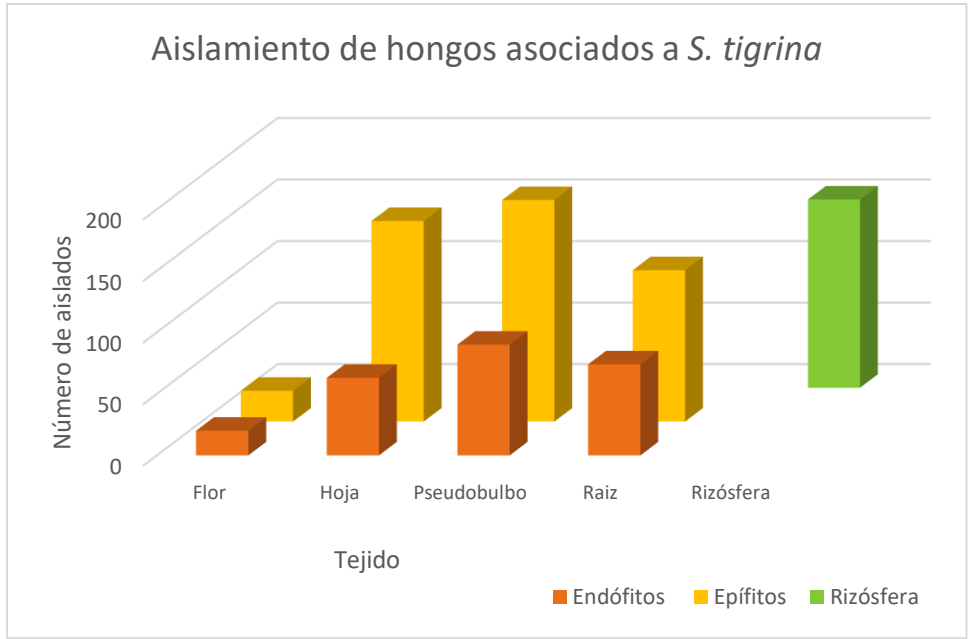


Figura 8. Distribución de aislados fúngicos en los diferentes tejidos de *S. tigrina*. Se presenta el número de aislados de acuerdo al tejido de origen y su distribución en la planta, así como los aislados provenientes de la rizósfera. En naranja se observan los aislados endófitos, en amarillo los epífitos y en verde los aislados recuperados de la rizósfera.

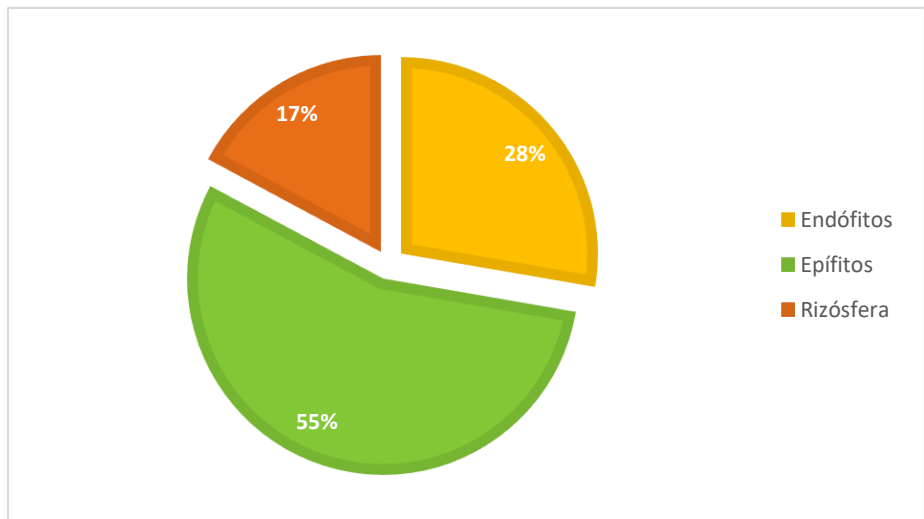


Figura 9. Distribución porcentual de los aislados de acuerdo con su localización. Se presenta la distribución de los aislados, en amarillo el porcentaje de aislados de origen epífito, en naranja el porcentaje de aislados endófitos y en verde los aislados provenientes de rizósfera.

5.3 Purificación y preservación de cepas aisladas

Una vez desarrollado el crecimiento fúngico se realizó la purificación de los aislados, para lo cual los hongos fueron resemebrados (tomando un fragmento de la colonia) en medio de cultivo PDA. Las muestras puras se obtuvieron haciendo los pases necesarios hasta observar que las colonias estaban libres de contaminación. Una vez que los aislados fueron purificados se efectuó el procedimiento de preservación colocando a las muestras en glicerol-YEPS (50:50) y almacenándolos a -80°C, se hicieron gliceroles por triplicado para cada muestra generando un total de 2673 gliceroles.

5.4 Identificación fenotípica y genotípica de los hongos filamentosos aislados

A partir de los aislados obtenidos se trabajó con aquellos que presentaban crecimiento filamentosos. La identificación de los aislados se realizó combinando métodos morfológicos y moleculares (Jin *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2005) lo que permitió identificar la mayor cantidad de aislados.

5.4.1 Identificación fenotípica

En total, se aislaron 891 cepas fúngicas, de las cuales 627 presentaron crecimiento filamentosos (70% de la población inicial), esta característica fue empleada para aplicar la técnica de microcultivo en la identificación fenotípica de los aislados. Se trabajó con los 627 hongos (100% de los aislados filamentosos), los cuales se cultivaron empleando la técnica del microcultivo. Las laminillas obtenidas de los microcultivos fueron teñidas con azul de algodón y se observaron al microscopio. La identificación de los géneros se realizó comparando las estructuras observadas con bibliografía de referencia. Considerando las características macroscópicas y microscópicas observadas en los aislados se identificaron 20 géneros, cuyos rasgos principales se describen a continuación.

Acremonium sp

A nivel macroscópico, la colonia muestra un color blanco-amarillento, aunque en algunas cepas se observan pigmentos naranja o violeta; la forma y aspecto de la colonia es vellosa-húmeda y al reverso por lo general no presenta pigmentación. A nivel microscópico, se observa el micelio septado y hialino. Las estructuras de reproducción anamórfica consisten en microconidios alargados y pequeños con conidióforos delgados (figura 10 A y B) (Bonifaz, 2012; Koneman, 2001).

Alternaria sp

Las características macroscópicas corresponden a una colonia de tamaño ilimitado que tiende a cubrir todo el medio de cultivo en color gris con tonalidades oscuras; la cual es plana, aterciopelada, seca y en ocasiones la cubre un velo vellosos blanco; presentando al reverso un pigmento café oscuro. A nivel microscópico, el micelio se observa macrosifonado, septado y oscuro. Las estructuras de reproducción anamórfica observadas fueron dictioconidios también llamados poroconidios, dispuestos en cadenas (figura 10 C y D) (Arenas, 2008; Koneman, 2001).

Aplosporella sp

Los aislados de este género presentaron colonias oscuras de color gris a gris-oliváceo en el centro, oliváceo hacia el margen, similar al reverso; con el micelio aéreo floco en color gris (Damm *et al.*, 2007). A nivel microscópico, el cultivo posee una conidiomata multilocular abierta por un ostiolo comunal, las hifas son en color café y no presentan septos, conidia verrucosa y paráfisis filiformes (Damm *et al.*, 2007). En la microscopía se observan únicamente las hifas sin septos (figura 10 E y F), La identificación de este género se realizó conjuntando la descripción macroscópica de la colonia y la obtenida de la identificación molecular (apartado 4.5.2)

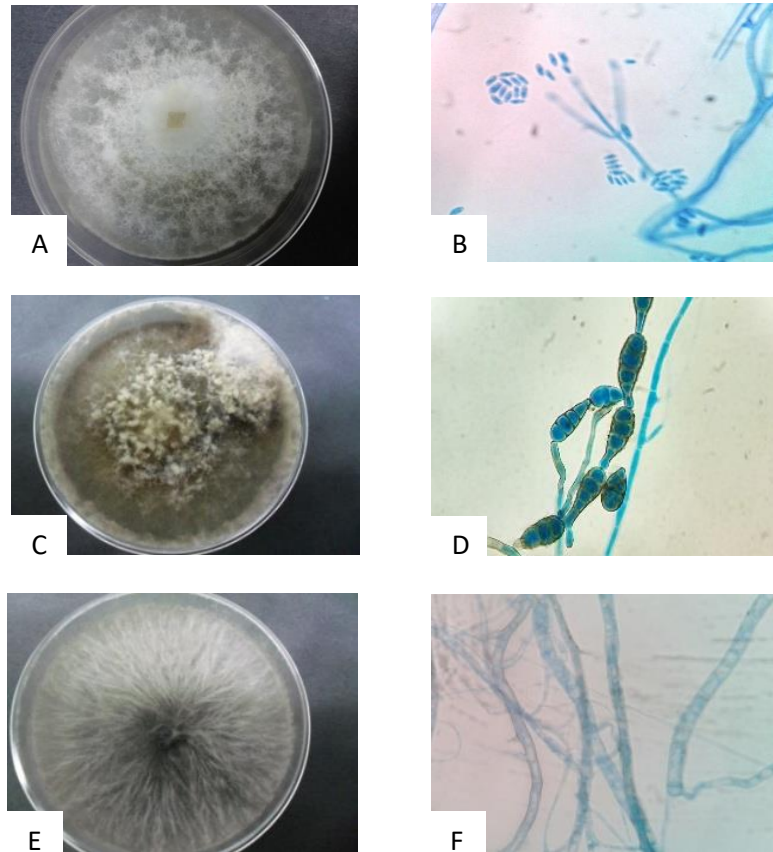


Figura 10. Géneros identificados fenotípicamente. A) Colonia de *Acremonium*; B) microscopia 100X de la colonia de *Acremonium*; C) Colonia de *Alternaria* sp; D) Microscopia 100x de la colonia de *Alternaria*; E) Colonia de *Aplosporella* sp; F) Hifas de *Aplosporella* vistas en objetivo 100X. Todas las colonias fueron crecidas en PDA y la microscopia fue obtenida del filamento crecido en condiciones de microcultivo.

Arthrinium sp

Los aislados de este género presentan colonias planas, dispersas, con micelio aéreo moderado; la superficie de la colonia es gris-hierro con manchas en color blanco sucio, el reverso de la colonia es de color gris-hierro (Crous y Groenewald, 2013). A nivel microscópico, se observa que el micelio consiste en hifas tabicadas, lisas, hialinas y ramificadas. Los conidióforos se reducen a células conidiógenas, las cuales se agregan en racimos sobre las hifas, siendo de color pálido marrón y lisas (figura 11 A y B) (Crous y Groenewald, 2013).

Aspergillus sp

El crecimiento para estos aislados mostró un tamaño ilimitado que tiende a cubrir todo el medio; al inicio formando una colonia blanca que luego se convierte a negra, de aspecto polvoso y sin pigmentos al reverso. A nivel microscópico presenta un micelio reproductivo macrosifonado, septado

y hialino. Sus estructuras de reproducción anamórfica se observan a base de microconidios redondos o elípticos con una estructura especializada; la cabeza aspergilar está compuesta por conidióforos largos, una vesícula redonda de donde nacen alrededor, en un ángulo de casi 360° dos series de fiálides, la primera de gran tamaño mientras que la segunda tiende a ser pequeña (figura 11 C y D) (Arenas, 2008; Bonifaz, 2012; Koneman, 2001)

Chaetomium sp

Para estos aislados, las colonias crecen rápidamente, presentan un aspecto algodonoso, inicialmente son de color blanco, mientras que las colonias maduras pueden tornarse a un color gris u oliva, y algunas veces pueden tomar tonalidades rojo, marrón o negro (Asgari & Zare, 2011). A nivel microscópico tiene ascosporas distintivas pequeñas marrón en forma de “limón” o “balón”, las cuales se forman dentro de los cuerpos fructíferos (figura 11 E y F) (Asgari & Zare, 2011).

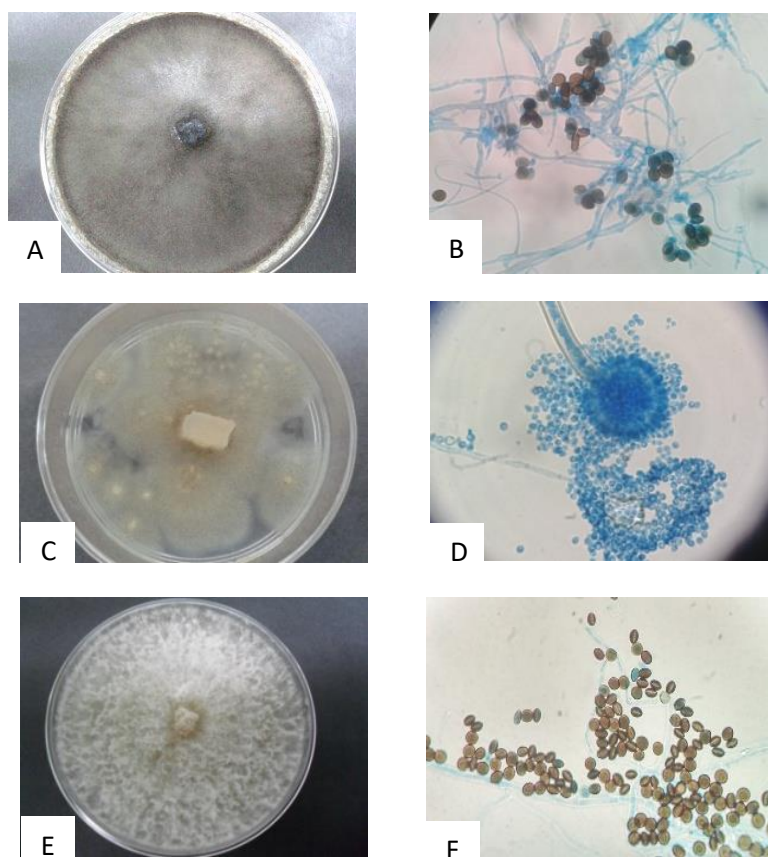


Figura 11. Identificación fenotípica de *Arthrinium* sp, *Aspergillus* sp y *Chaetomium* sp. A) Colonia de *Arthrinium*; B) microscopia de *Arthrinium*; C) Colonia de *Aspergillus*; D) Microscopia de *Aspergillus*; E) Colonia de *Chaetomium*; F) microscopia de *Chaetomium*. Los aislados fueron crecidos en PDA y las microscopias fueron obtenidas de aislados creciendo en condiciones de microcultivo. En las imágenes tomadas a microscopio se puede observar estructuras características de los géneros identificados.

Cladophialophora sp

Estos aislados desarrollaron colonias planas, radiadas, de color verde oscuro-grisáceo; vellosas; al reverso presentan pigmento negro difuso. A nivel microscópico se observó la presencia de micelio microsifonado, septado y pigmentado. Sus estructuras de reproducción consisten en cadenas largas que parten de una célula inicial o fialídica, con conidios formando cadenas de 9 a 10 unidades por lo que se les llama hormodendrum largo y llegan a ramificarse (figura 12 A y B) (Bonifaz, 2012).

Cladosporium sp

La colonia presenta a nivel macroscópico un tamaño ilimitado que cubre todo el medio de cultivo de color verde oscuro, la cual se observa plana, seca, aterciopelada y con algunos surcos; presentando pigmento difuso al medio en el reverso de la colonia (Arenas, 2008; Bonifaz, 2012; Koneman, 2001). A nivel microscópico, se observan hifas libremente ramificadas que dan lugar a largas cadenas de conidios elípticos (figura 12 C y D).

Curvularia sp

La colonia crece de manera ilimitada y tiende a cubrir todo el medio de cultivo, mostrando un color negro con tonalidades oscuras con un aspecto plano y aterciopelado con pigmentos café oscuro por la parte inversa, el cual difunde al medio. A nivel microscópico, se observó un micelio macrosifonado, septado y oscuro así como el desarrollo de macroconidios con 2-4 septos transversales que nacen de un conodíforo corto y recto (figura 12 E y F) (Arenas, 2008; Bonifaz, 2012; Koneman, 2001).

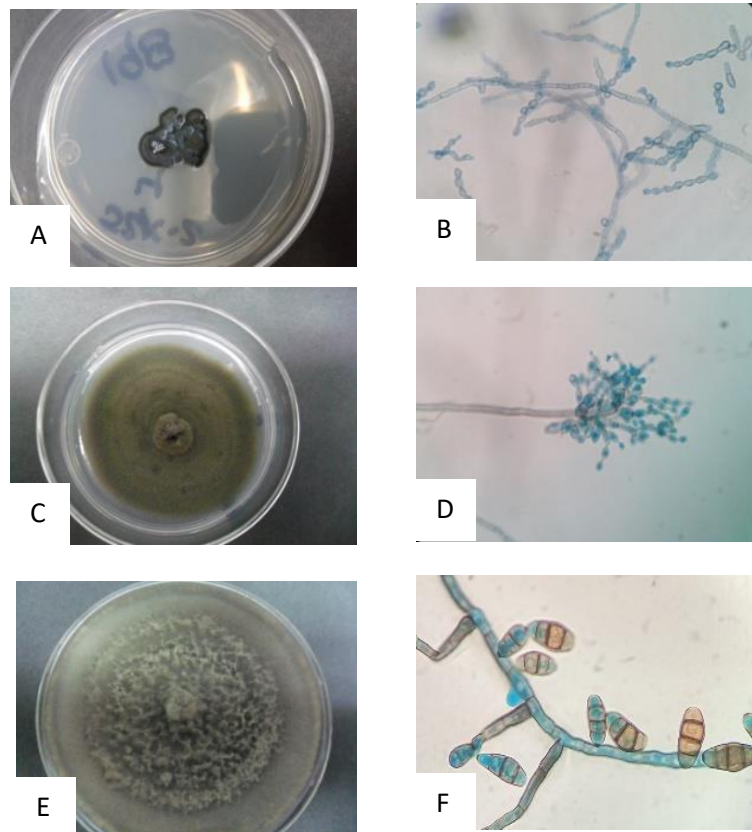


Figura 12. Características fenotípicas de *Cladophialophora* sp, *Cladosporium* sp y *Curvularia* sp. A) Crecimiento en PDA de *Cladophialophora*; B) Conidios característicos del género *Cladophialophora*; C) Colonia de *Cladosporium*, E) Colonia de *Curvularia*; F) Macroconidios de *Curvularia*. Todos los hongos fueron crecidos en PDA, la observación de laminillas se hizo utilizando el objetivo 100X.

Exophiala sp

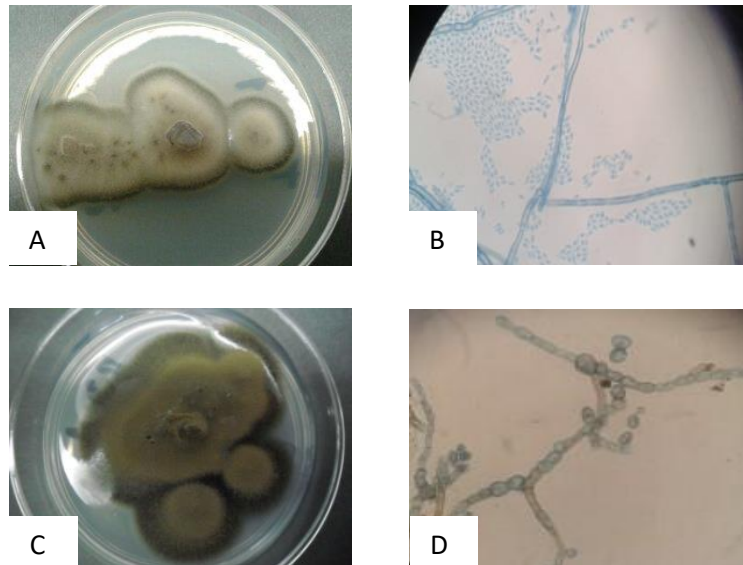
Las colonias que presentan estos aislados son de tipo levaduriforme, cremosas, con bordes bien delimitados poco acuminadas, las cuales después de tres o cuatro semanas se transforman en colonias vellosas, aterciopeladas y oscuras que al reverso liberan un pigmento negro difuso. En el aspecto microscópico presenta numerosos blastoconidios con gemas, las hifas son septadas, las células conidiógenas muestran conidias elipsoidales hialinas en acúmulos (figura 13 A y B) (Bonifaz, 2012).

Fonsecae sp

Los aislados de este género presentan colonias pardas o negras, vellosas, aterciopeladas, limitadas en ocasiones con surcos y radiaciones que al reverso desarrollan un pigmento negro-ocre. Su micromorfología corresponde a un micelio macrosifonado, septado y oscuro. Sus estructuras de reproducción son de tipo "cupuliforme" con una especie de collar en la parte final de donde nacen conidios redondos o un poco alargados (figura 13 C y D) (Bonifaz, 2012; Koneman, 2001).

Fusarium sp

Los aislados asociados a este género presentaron las características macroscópicas siguientes: son de tamaño ilimitado con un color blanco al inicio durante los 3 primeros días, para cambiar posteriormente a tonalidades naranja, café o violeta-lila dependiendo de la especie. Dicha colonia presenta un aspecto vellososo-seco con un pigmento color naranja o violeta que difunde al medio y se observa por el reverso de la colonia. En cuanto a la micromorfología, se observa un micelio macrosifonado, septado y hialino en donde las hifas se organizan en coremium. Como estructuras de reproducción se observaron macroconidios y microconidios fusiformes característicos para este género (figura 13 E y F) (Arenas, 2008; Bonifaz, 2012; Koneman, 2001).



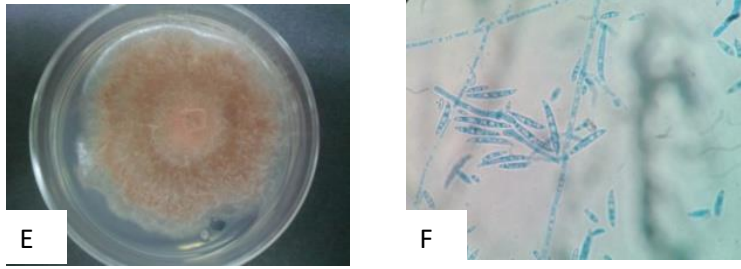


Figura 13. Identificación fenotípica. A) Colonia de *Exophiala* sp en PDA; B).Microscopia de *Exophiala*; C) Colonia de *Fonsecae* sp; D) Conidios redondos y alargados presentes en el género *Fonsecae*; E) Fusarium, colonia filamentososa; F)Macroconidios fusiformes del género *Fusarium*. Los aislados fueron crecidos en medio PDA (izquierda) y la observación microscópica se realizó utilizando el objetivo 100X

Geotrichum sp

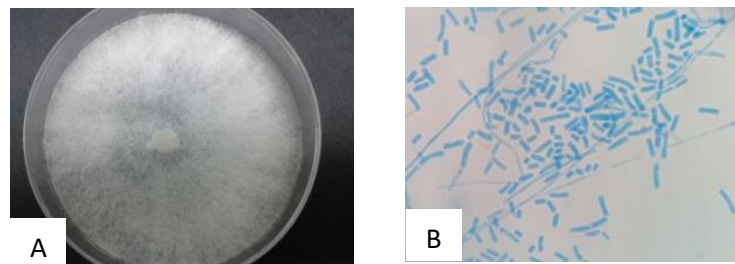
Los aislados de este género mostraron colonias de un tamaño ilimitado, las cuales cubren todo el medio y presentan un color blanco-amarillento y son de forma plana con un aspecto veloso y húmedo sin pigmentos al reverso. Su micromorfología corresponde a un micelio macrosifonado, septado, hialino; las estructuras de reproducción observadas consistieron en artroconidios que se fragmentan de las hifas (figura 14 A y B) (Arenas, 2008; Bonifaz, 2012).

Microsporium sp

Las colonias son radiales y presentan un aspecto veloso, plano, de color amarillo con micelio blanco. A nivel microscópico presentan un micelio abundante con hifas delgadas, tabicadas y ramificadas, que dan el aspecto de un árbol; las hifas también se comparan con raquetas intercalares similares a “huesos de perro” (figura 14 C y D) (Bonifaz, 2012).

Mucor sp.

Los aislados de este género presentan una colonia de tamaño limitado que tendía a llenar las cajas de Petri. Inicialmente, las colonias se observan de color blanco que posteriormente toman una tonalidad blanca-grisácea y que tienen un aspecto veloso-algodonoso y seco, sin pigmentos al reverso. La micromorfología de estos aislados corresponde a un micelio microsifonado, cenocítico y hialino. Las estructuras de reproducción corresponden a esporangiosporas o endosporas redondas. Los esporangióforos se encuentran ramificados mientras que el esporangio tiene una columna pequeña y ovoide (figura 14 E y F) (Arenas, 2008; Bonifaz, 2012; Koneman, 2001).



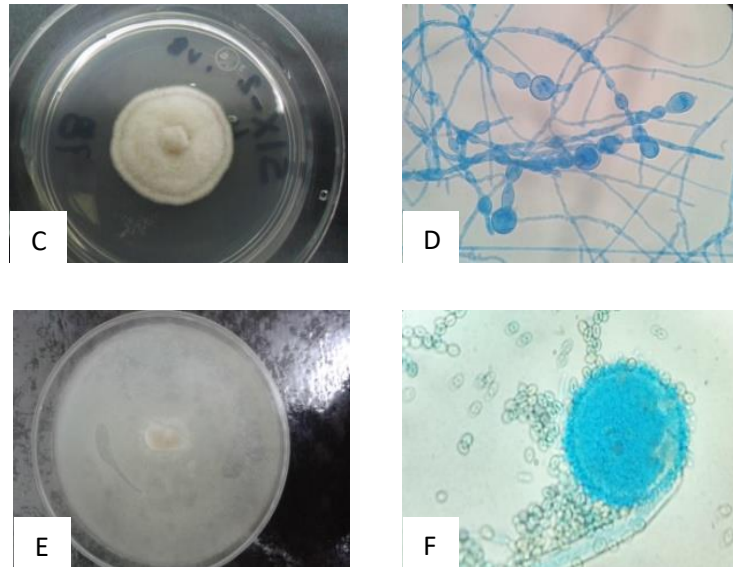


Figura 14. *Geotrichum*, *Microsporium* y *Mucor* identificados genotípicamente. A) Colonia en placa de *Geotrichum* sp; B) Macroconidios representativos del género *Geotrichum*; C) Colonia filamentosa de *Microsporium* sp; D) Microscopia de las hifas de *Microsporium*; E) Colonia en Pda de *Mucor* sp; F) Esporangiosporas y esporangio representativos del género *Mucor* sp. Las colonias fueron crecidas en PDA y las estructuras de reproducción fúngica fueron observadas con el objetivo 100X.

Paecilomyces sp

Para este género se observó una colonia grande que cubre totalmente la placa del medio, la cual se torna en color amarillento y muestra un aspecto polvoriento debido a abundante producción de conidios. A nivel microscópico, las hifas portadoras de conidios se parecen superficialmente al “pincel” de *Penicillium*. Los conidios elípticos se presentan en cadenas no ramificadas que parten del extremo de los esterigmas en forma de redoma; el aspecto del esterigma que nace aisladamente de la hifa tiene un extremo característico que termina en un largo tubo portador de conidios (figura 15 A y B) (Arenas, 2008; Bonifaz, 2012).

Penicillium sp

Este género desarrolla una colonia de tamaño ilimitado y color verde con un halo blanquecino en la periferia; de forma plana y aspecto polvoso y aterciopelado; sin pigmentos que difundan al medio. El micelio observado es macrosifonado, septado y hialino; las estructuras de reproducción corresponden a microconidios redondos, con conidióforos y fiálides en arreglos que semejan a un pincel (figura 15 C y D) (Arenas, 2008; Bonifaz, 2012; Koneman, 2001).

Scedosporium sp

Para este género se recuperaron colonias de crecimiento moderadamente rápido con textura lanuda o algodonosa. Inicialmente, la colonia se observa blanca y después comienza a tornarse grisácea o

café-humo en la superficie. Las hifas son hialinas, septadas, los conidios son unicelulares, ovoides que nacen de las puntas de los conidióforos (figura 15 E y F) (Arenas, 2008; Koneman, 2001).

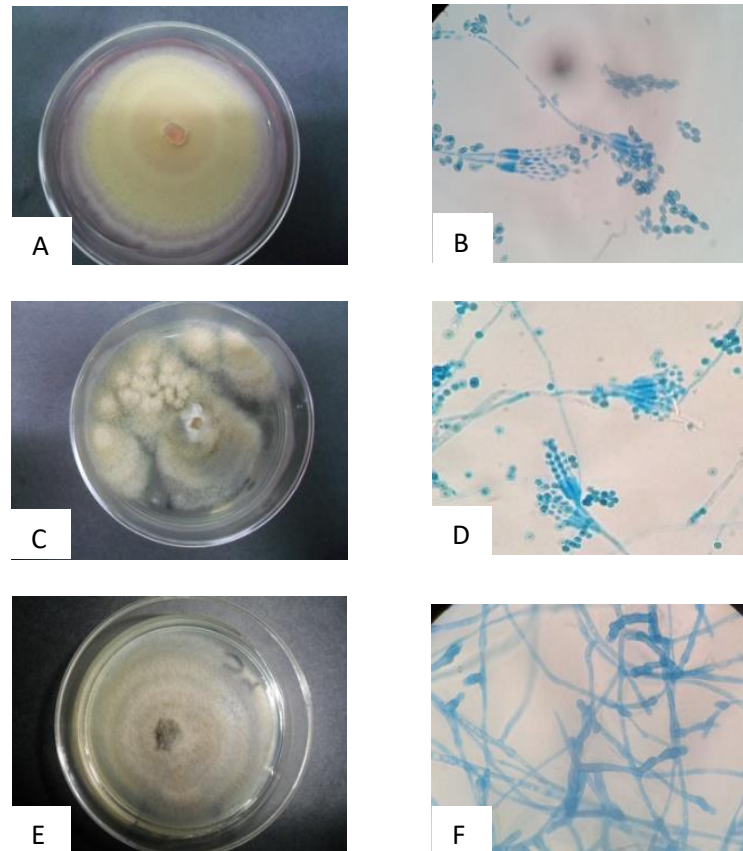


Figura 15. Los géneros *Paecilomyces* sp, *Penicillium* sp, y *Scedosporium* sp. A) Colonia de *Paecilomyces* sp; B) Conidios elípticos en cadenas que no se ramifican característicos del género *Paecilomyces*; C) Colonia del género *Penicillium*; D) Fíalides en arreglos que semejan a un pincel característicos del género *Penicillium*; E) Colonia del género *Scedosporium*; F) Conidios ovoides del género *Scedosporium*. Los aislados fueron crecidos en PDA y las estructuras microscópicas teñidas con azul de algodón, vistas con el objetivo 100X.

Trichoderma sp

Para este género se observaron colonias de crecimiento rápido de tamaño ilimitado, que llena la placa con una película delgada sobre la superficie del agar. Al transcurrir el tiempo aparecen gradualmente penachos lanudos y compactos de micelio blanco, formando una red densa que toma pronto color verde por la producción de conidios. En la micromorfología se observan conidióforos en forma de ramas irregulares cortas procedentes del micelio vegetativo; los conidios son unicelulares y esféricos que forman racimos globosos en los extremos de los conidióforos pero se disocian con

facilidad por lo que se observan varios conidios aislados (figura 16 A y B) (Arenas, 2008; Koneman, 2001).

Verticillium sp

Dentro de las características macroscópicas, se observó una colonia de crecimiento rápido que al principio es blanca en el centro con un crecimiento radiado, delgado que toma aspecto polvoriento y color pardo rosado por producción masiva de esporas. A nivel microscópico se observan conidióforos alargados, dispuestos en espiral a partir del micelio o de los extremos de ramas verticiliadas del mismo; los conidios unicelulares nacen en racimos en los extremos de estos conidióforos. Como en el caso anterior, los conidios elípticos se disocian fácilmente de los extremos de los conidióforos, por lo que encontramos varios conidios aislados (figura 16 C y D) (Arenas, 2008; Koneman, 2001).

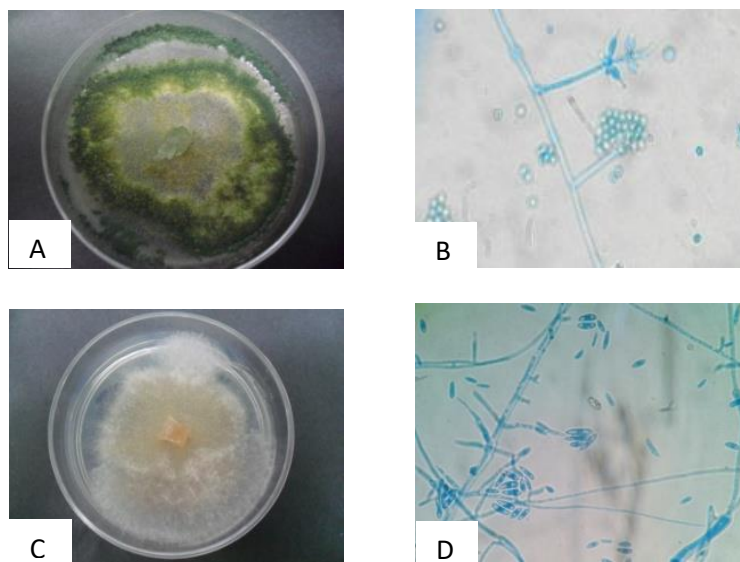


Figura 16. Identificación fenotípica de *Trichoderma* sp y *Verticillium* sp. A) Colonia de *Trichoderma* sp crecida en agar PDA; B) Conidióforos en forma de ramas con conidios unicelulares esféricos representativos del género *Trichoderma* ; C) Colonia filamentosa de *Verticillium* sp; D) Presencia de conidios elípticos unicelulares que nacen de racimos presentes en el género *Verticillium*. Los aislados fueron crecidos en PDA y las estructuras de reproducción fueron teñidas con azul de algodón y vistadas con el objetivo 100X.

Considerando las características macroscópicas y microscópicas previamente descritas para los diferentes aislados, la población se dividió en morfogrupos, los cuales nos ayudaron a manejar de manera más eficiente a la población, según se describe a continuación.

5.4.2 Distribución de la población en Morfogrupos

Desde el punto de vista experimental, el estudio de hongos endófitos y epífitos tiene varios desafíos, uno de los más limitantes es la imposibilidad que presentan muchos de los aislados para esporular en medios de cultivo; por esta razón es común encontrar en los reportes de este tipo de investigaciones, la ocurrencia de una alta frecuencia de hongos categorizados morfológicamente. En

el caso particular de este trabajo se pudo observar la falta de esporulación para aproximadamente el 40% de los aislados, por lo que se procedió a agrupar a la población en morfogrupos en base a las características macroscópicas de su colonia en medio de cultivo PDA. Las características tomadas en cuenta para dicha categorización fueron el color, tipo de filamento (algodonoso, polvoso, cremoso, etc.), anverso de la colonia y la pigmentación en el medio. Tomando en cuenta las características mencionadas, la población quedó agrupada en 139 morfogrupos (anexo 1) enumerados arbitrariamente del 1 al 139. El número de individuos en cada morfogrupo fue variable: algunos morfogrupos incluyeron más de veinte aislados mientras que otros solo contienen un aislado.

5.4.3 Identificación molecular de aislados representativos

5.4.3.1 Extracción de ADN

Para cada morfogrupo se tomaron diferentes aislados para realizar la identificación molecular. La cantidad de aislados empleados por morfogrupo fue variable, siempre considerando el número de aislados que conformaban el morfogrupo. Por ejemplo, para aquellos morfogrupos con más de seis aislados se emplearon tres aislados para realizar la identificación genotípica, mientras que para aquellos que contenían uno, dos o tres aislados se utilizó un aislado para genotipificar el morfogrupo correspondiente. La integridad del ADN genómico extraído se verificó para todas las muestras procesadas antes de realizar la amplificación por PCR; el producto obtenido para algunas extracciones se muestra en la figura 17. Cabe mencionar que en algunos casos fue necesario realizar la extracción de ADN genómico en varias ocasiones hasta obtener una muestra de ADN genómico de buena calidad y concentración que permitiera realizar la amplificación exitosa mediante PCR.

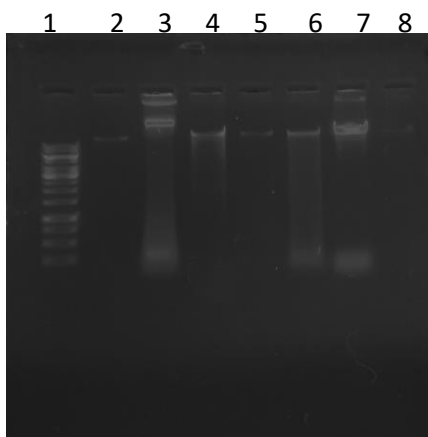


Figura 17. ADN genómico obtenido a partir de cultivos fúngicos. En la línea 1 se observa marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas), en las líneas 2 a la 8 los productos de extracción de diferentes aislados.

5.4.3.2 Amplificación por PCR de la región 18S-ITS-28S

En los hongos, uno de los marcadores moleculares más utilizados para la identificación genotípica corresponde a la región genómica que codifica para el ARN ribosomal, que fue el marcador utilizado en este trabajo. Una vez obtenido el ADN, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el fragmento que corresponde a la región del ADNr empleado para la identificación genotípica. Cabe mencionar que la mayoría de los aislados fúngicos recuperados en este trabajo

presentaron micelio estéril, por lo que la identificación molecular resultó una herramienta útil y práctica para la identificación de este tipo de aislados (Guo et al., 2000; Anderson *et al.*, 2003).

Una vez obtenido el ADN genómico para los aislados fúngicos, se continuó con la amplificación por medio de la técnica de PCR bajo las condiciones descritas en materiales y métodos. Esta amplificación se realizó sobre la región 18S-ITS-28S, la cual permite la identificación de cepas a nivel de género. En la figura 18 se muestran los amplicones obtenidos utilizando el par de oligonucleótidos ITS1F/LR5, con los cuales se obtuvieron productos de alrededor de 1500pb.

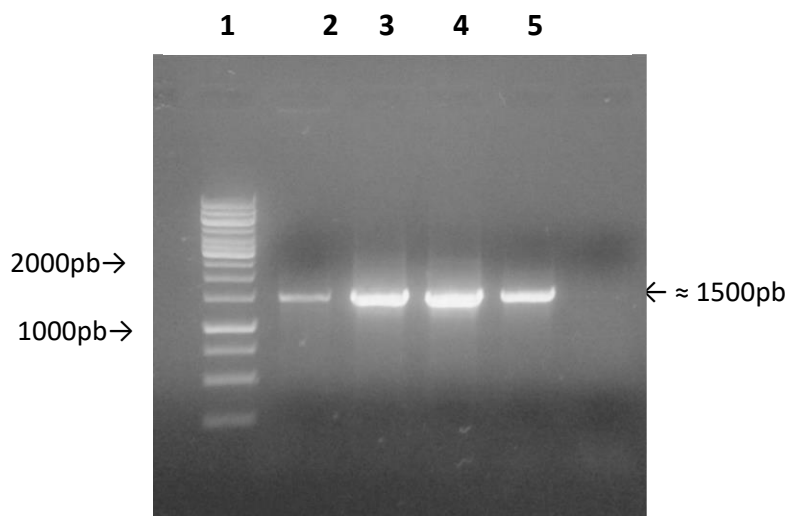


Figura 18. Amplificación de la región 18S-ITS-28S de diferentes aislados. 1 marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas); línea 2 al 5 amplificados usando oligonucleótidos ITS1F/LR5.

5.4.3.3 Secuenciación y análisis bioinformático

El producto de PCR obtenido fue purificado y enviado para su secuenciación siguiendo las especificaciones del proveedor del servicio (Macrogen, Korea). Se realizó la secuenciación de ambas cadenas para contar con resultados sólidos. Las secuencias obtenidas se compararon con los datos anotados en el GenBank. Algunos de los resultados que arrojó el análisis bioinformático se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Identificación genotípica de algunos aislados

Morfogrupo	Clave de aislado	Longitud (nt)	Homólogo más cercano de acuerdo al GenBank	Valor e	Porcentaje de identidad
2	STF367	1389	<i>Trichoderma asperellum</i>	0	88%
12	STF758	1414	<i>Diplodia quercivora</i>	0	95%
18	STF728	1400	<i>Trichoderma asperellum</i>	0	97%
19	STF624	1386	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i>	0	95%
42	STF337	1077	<i>Fusarium oxysporum</i>	0	89%

49	STF518	1465	<i>Penicillium steckii</i>	0	94%
57	STF590	1419	<i>Penicillium steckii</i>	0	91%
62	STF197	1352	<i>Aspergillus aculeatinus</i>	0	97%
65	STF499	1418	<i>Nectria pseudotrichia</i>	0	93%
66	STF203	1127	<i>Aspergillus aculeatus</i>	0	99%
70	STF405	1408	<i>Gibberella fujikuroi</i>	0	90%
75	STF75	1400	<i>Fusarium oxysporum</i>	0	87%
94	STF671	1449	<i>Penicillium</i> sp	0	95%
98	STF526	1319	<i>Fusarium</i> sp	0	96%
99	STF536	1754	<i>Pestalotiopsis maculiformans</i>	0	95%
100	STF538	1560	<i>Penicillium verruculosum</i>	0	95%
109	STF696	1481	<i>Penicillium oxalicum</i>	0	97%
110	STF734	1365	<i>Penicillium melinii</i>	0	99%
112	STF705	1419	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0	99%
115	STF783	1380	<i>Penicillium digitatum</i>	2.00E-97	82%
124	STF563	1572	<i>Penicillium oxalicum</i>	0	97%
127	STF626	1473	<i>Aspergillus japonicus</i>	0	97%

De esta manera, se identificaron 63 géneros asociados a los 139 morfogrupos. Los géneros más representados fueron *Trichoderma* con 124 aislados seguido de *Penicillium* con 103, *Fusarium* con 40 y *Aspergillus* con 33 (Tabla 9). Además, el género con mayor número de morfogrupos asociados fue *Penicillium* con 19 morfogrupos, seguido de *Trichoderma* y *Aspergillus* con 8. Considerando la población total, solamente diez aislados no pudieron ser identificados, los cuales se encontraban agrupados en cinco morfogrupos.

Tabla 9. Géneros y número de aislados asociados con los morfogrupos identificados.

Géneros	Morfogrupos (número)	Número de aislados
<i>Acremonium</i>	4	17
<i>Alternaria</i>	1	1
<i>Annulohypoxylon</i>	1	2
<i>Anthostomella</i>	1	8
<i>Aplosporella</i>	1	16
<i>Arthopyrenia</i>	2	3
<i>Arthrimum</i>	3	28
<i>Aspergillus</i>	8	33

<i>Bionectria</i>	1	4
<i>Bipolaris</i>	2	2
<i>Chaetomium</i>	2	5
<i>Chaunopycnis</i>	1	10
<i>Cladophialophora</i>	1	1
<i>Cladosporium</i>	2	6
<i>Cochliobolus</i>	1	1
<i>Colletotrichum</i>	1	1
<i>Curvularia</i>	1	4
<i>Daldinia</i>	2	15
<i>Diaporthe</i>	1	4
<i>Diplodia</i>	1	4
<i>Elaphocordyceps</i>	1	1
<i>Epichloe</i>	2	3
<i>Eutypa</i>	1	1
<i>Eutypella</i>	2	4
<i>Exophiala</i>	2	2
<i>Fonsecae</i>	1	11
<i>Fusarium</i>	6	40
<i>Fusicolla</i>	1	1
<i>Geotrichum</i>	2	14
<i>Gibberella</i>	1	1
<i>Hypocrea</i>	1	1
<i>Hypoxyton</i>	1	6
<i>Letendraea</i>	1	1
<i>Macrophoma</i>	2	6
<i>Microdiplodia</i>	2	3
<i>Microsporium</i>	1	2
<i>Mucor</i>	4	27
<i>Nectria</i>	2	5
<i>Neopestalotiopsis</i>	1	9
<i>Nigrograna</i>	1	1
<i>Ochlorocladosporium</i>	1	2
<i>Paecilomyces</i>	7	15
<i>Paraconiothyrium</i>	1	4
<i>Penicillium</i>	19	103
<i>Pestalotiopsis</i>	2	10
<i>Phaeosphaeriopsis</i>	1	1
<i>Phialemoniopsis</i>	1	2
<i>Phialemonium</i>	1	2

<i>Phoma</i>	1	1
<i>Pseudobotrytis</i>	1	1
<i>Pyrenochaeta</i>	1	2
<i>Pyrenochaetopsis</i>	1	2
<i>Rousoella</i>	2	3
<i>Scedosporium</i>	7	17
<i>Schizophyllum</i>	1	1
<i>Talaromyces</i>	1	1
<i>Thyridaria</i>	1	1
<i>Trichoderma</i>	8	124
<i>Trichophyton</i>	1	2
<i>Umbelopsis</i>	1	2
<i>Verticillium</i>	1	13
<i>Xylariaceae</i>	2	2
<i>Xylariales</i>	1	9
No identificados	5	10

Por otro lado, se encuentran 17 géneros con baja frecuencia ya que sólo contenían un aislado, los cuales correspondieron a los siguientes: *Alternaria*, *Cladophialophora*, *Cochliobolus*, *Colletotrichum*, *Elaphocordyceps*, *Eutypa*, *Fusicolla*, *Gibberella*, *Hypocrea*, *Letendreaa*, *Nigrograna*, *Phaeosphaeriopsis*, *Phoma*, *Pseudobotrytis*, *Schizophyllum*, *Talaromyces* y *Thyridaria*. A continuación, se presenta la diversidad de los géneros identificados como parte de la población endófito, epífita y rizosférica, así como la distribución de la población en los diferentes tejidos muestreados.

5.4.4 Distribución de géneros fúngicos en los diferentes tejidos de *S. tigrina*

Al analizar la presencia de los diferentes géneros fúngicos en los diversos tejidos de la orquídea *S. tigrina* analizados, se encontró una mayor variedad de géneros en las hojas y el pseudobulbo, mientras que la flor fue el tejido con menor diversidad. Es importante mencionar que en la literatura los trabajos enfocados en el estudio del micobioma asociado a orquídeas mexicanas es escaso, además de que en aquellos estudios enfocados a investigar la población fúngica en orquídeas los tejidos más utilizados son la raíz y la hoja dejando fuera otros tejidos con gran riqueza microbiana.

5.4.4.1 Hoja

De todos los tejidos analizados, la hoja tuvo el mayor número de aislados recuperados (175 aislados), asociados a 45 géneros, de los cuales 12 se encontraron tanto en la población epífita como en la endófito. El género con mayor incidencia en ambas poblaciones fue *Penicillium* seguido de *Fusarium*. También se identificaron 30 géneros de distribución exclusivamente epífita siendo *Trichoderma*, Xylariales y *Aplosporella* los que presentaron la mayor incidencia. Los géneros *Hypoxylon* y *Phaeospariopsis* fueron asociados únicamente a la población endófito y no se logró identificar un aislado exclusivamente endófito (Figura 19).

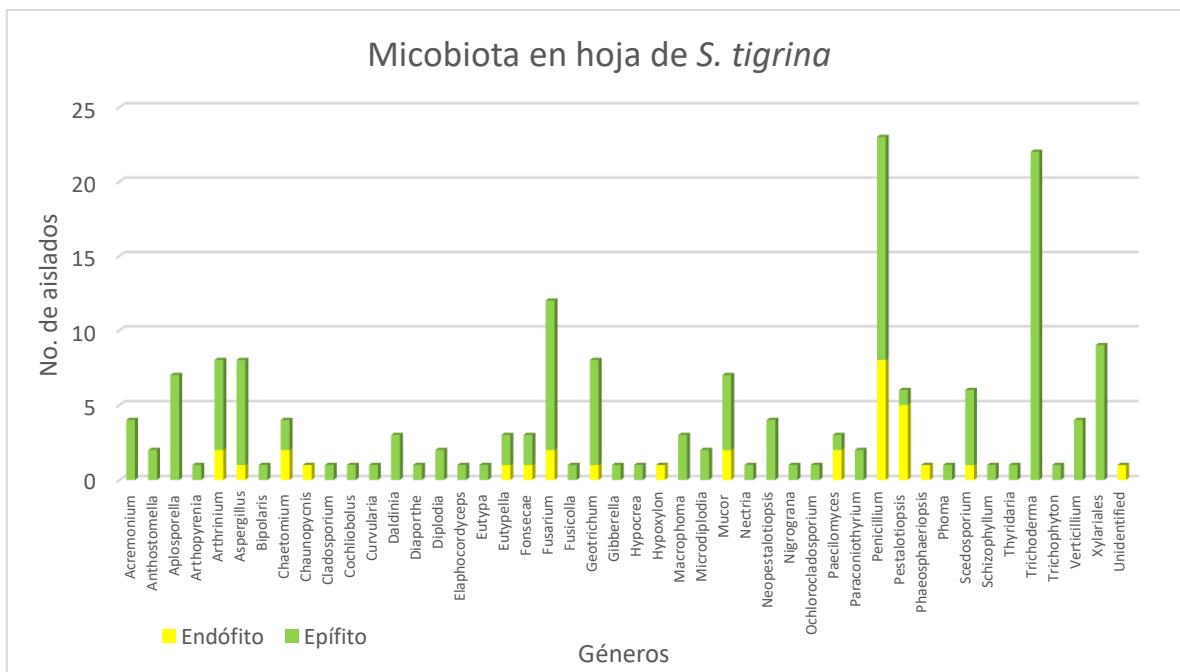


Figura 19. Géneros identificados en hojas de la orquídea *Stanhopea tigrina*, se presentan en verde los que pertenecen a epífitos y en amarillo los endófitos.

5.4.4.2 Raíz

Para el caso de los aislados de raíz, se identificaron 30 géneros, 12 de los cuales se encontraron tanto dentro de los epífitos como de los endófitos. Ocho géneros fueron identificados únicamente en la población endófito, y diez géneros fueron identificados únicamente en aislados epífitos. Los géneros más frecuentes en la población fueron *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Figura 20), además tres aislados epífitos no pudieron ser identificados.



Figura 20. Géneros identificados en raíz de la orquídea *Stanhopea tigrina*, en color amarillo los de procedencia endófito y en verde los epífitos.

5.4.4.3 Pseudobulbo

Después de la hoja, el pseudobulbo fue el tejido con mayor diversidad ya que se identificaron 35 géneros, siendo *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium* los más prevalentes, con un mayor número en los aislados epífitos que en los endófitos. *Annulohyphoxylon*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Letendreaa* y *Phialemoniopsis* se identificaron únicamente en aislados endófitos, mientras que 19 géneros fueron identificados únicamente en aislados epífitos, dentro de los cuales *Aplosporella*, *Diplodia* y *Mucor* fueron los más frecuentes. Para esta población únicamente tres aislados no pudieron ser identificados (Figura 21).

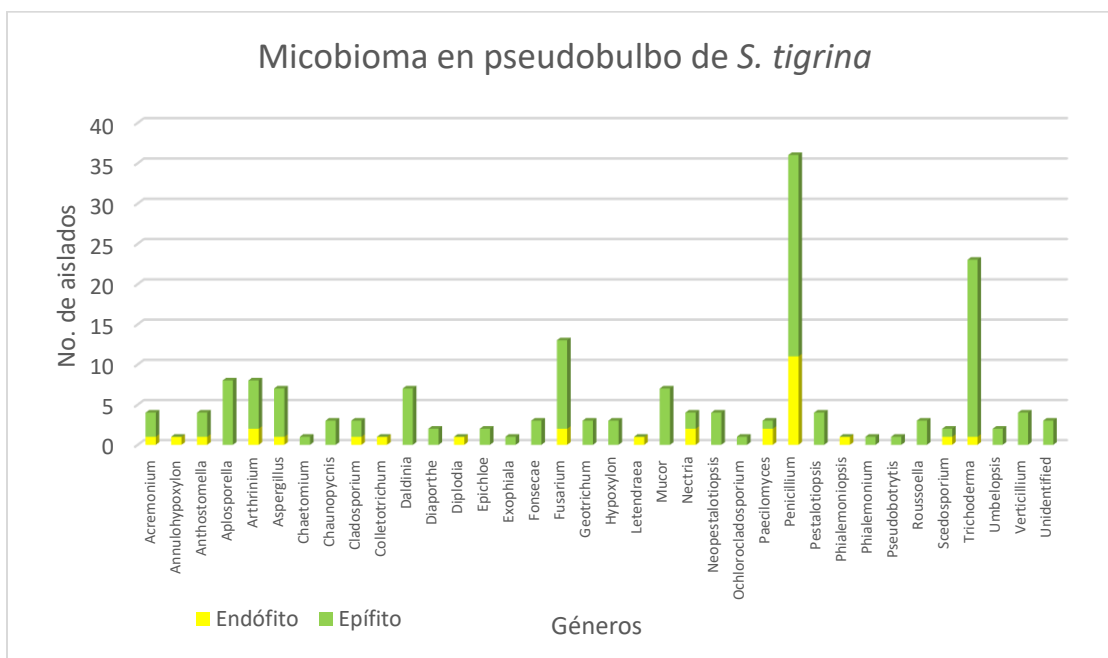


Figura 21. Géneros identificados en pseudobulbo de la orquídea *Stanhopea tigrina*, en color amarillo los provenientes de endófitos y en verde los de epífitos.

5.4.4.4 Flor

Para el caso de la flor se identificaron diez géneros de los cuales *Paecylomyces* fue el único género endófito registrado, además se identificaron nueve géneros epífitos siendo *Acremonium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma* los que presentaron un mayor número de aislados (Figura 22).

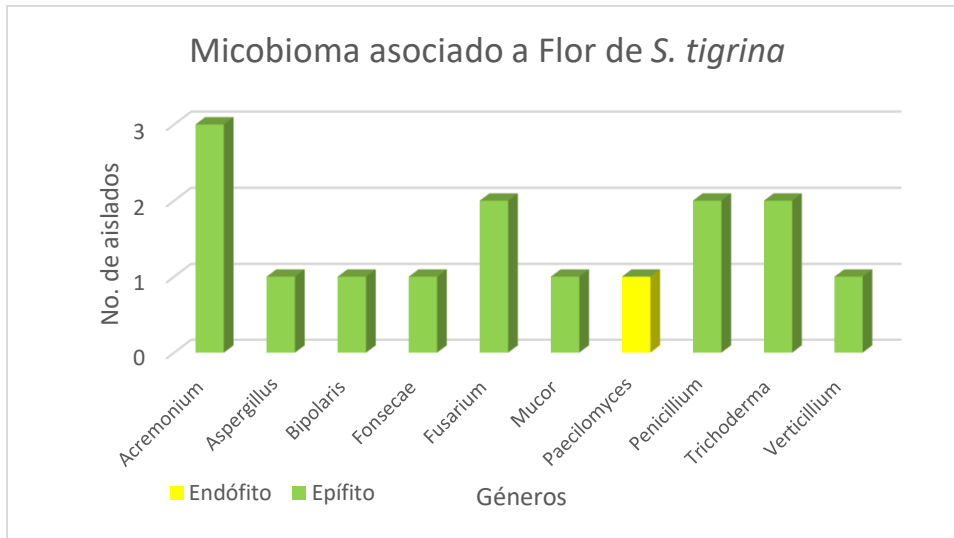


Figura 22. Géneros identificados en flor de la orquídea *Stanhopea tigrina*, en color amarillo los que corresponden a endófitos y en verde los epífitos.

5.4.4.5 Rizósfera

En este estudio, además de la identificación de hongos cultivables presentes en los diferentes tejidos de la orquídea, se identificaron los hongos asociados a la rizósfera de las plantas. Durante la identificación se encontraron 34 géneros, siendo *Trichoderma* el más prevalente, seguido de *Penicillium* y *Mucor* (Figura 23); también se identificaron 19 géneros con un único aislado dentro de los cuales se encuentran *Acremonium*, *Aplosporella*, *Cladophialopora*, *Cladosporium*, *Exophiala*, entre otros; finalmente tres aislados no se lograron identificar.

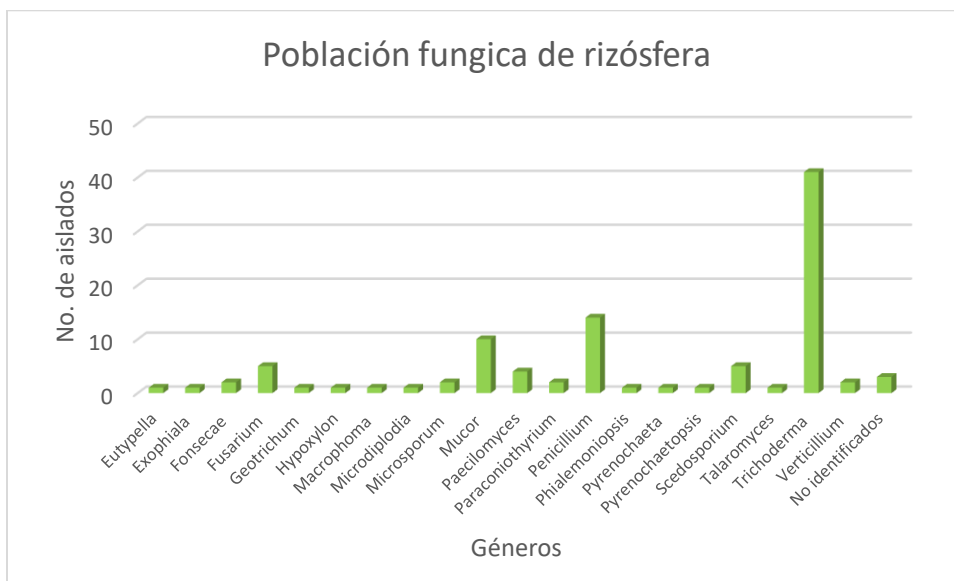


Figura 23. Géneros identificados en rizósfera de la orquídea *Stanhopea tigrina*

5.4.5 Géneros que conforman la población fúngica endófito y epífita en *S. tigrina*

Continuando con el estudio de la distribución de los géneros identificados en *S. tigrina*, se analizó la población epífita y endófito presente en la orquídea. En este sentido, se encontró una mayor

diversidad en la población epífita, en la cual se identificaron 57 géneros, mientras que en la población endófito se identificaron 32 géneros.

Los aislados endófitos presentaron una mayor diversidad de géneros en los tejidos de raíz y pseudobulbo, con 20 y 16 géneros respectivamente. La hoja ocupó el tercer lugar en diversidad con quince géneros asociados mientras que en la flor pudimos identificar únicamente un género. Los géneros que presentaron especificidad por tejido fueron los siguientes: *Alternaria*, *Bionectria*, *Daldinia*, *Macrophoma*, *Phialemonium*, *Pyrenochaeta* y *Xylariaceae* solo se identificaron en raíz; *Chaetomium*, *Eutypella*, *Geotrichum*, *Hypoxylon*, *Mucor*, *Pestalotiopsis* y *Phaeosphaeriopsis* fueron identificados únicamente en hoja; *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Letendreaa*, *Nectria* y *Phialemoniopsis* fueron identificados solo en pseudobulbo (Figura 24; anexo 2).

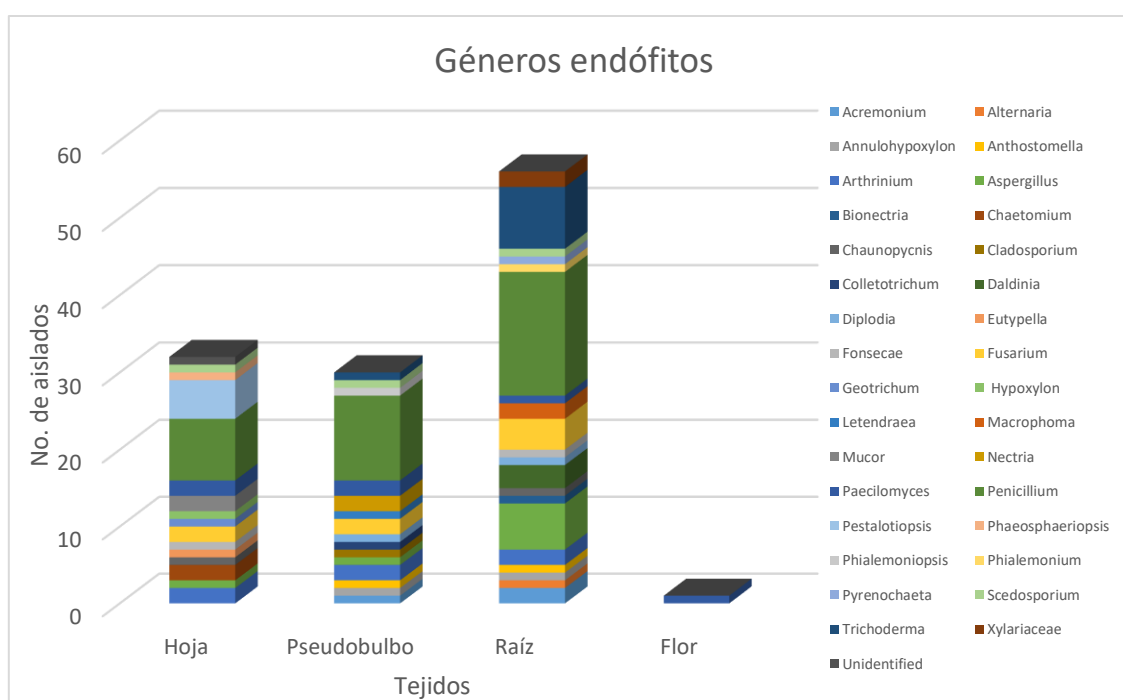


Figura. 24. Géneros fúngicos endófitos asociados a *S. tigrina*. Se presentan los diferentes géneros endófitos identificados en tejido de hoja, pseudobulbo, raíz y flor.

Por otra parte, la mayor diversidad de géneros se encontró en los aislados epífitos, los cuales mostraron una población total correspondiente a 57 géneros. La hoja tuvo la mayor diversidad de géneros asociados al identificarse 42 géneros diferentes, seguido de la rizósfera con 33 géneros; el pseudobulbo fue el tejido que obtuvo el tercer lugar al describirse 30 géneros, finalmente la flor sólo presentó nueve géneros asociados. En cuanto a la especificidad de géneros, *Phialemonium*, *Pseudobotrytis*, *Roussoella* y *Umbeliopsis* se encontraron asociados únicamente a pseudobulbo; *Bionectria*, *Cladophialophora*, *Microsporium*, *Phialemoniopsis*, *Pyrenochaeta* y *Talaromyces* se asociaron únicamente a rizósfera; mientras que *Cochliobolus*, *Diplodia*, *Elaphocordyceps*, *Eutypa*, *Fusicolla*, *Gibberella*, *Hypocrea*, *Nigrograna*, *Phoma*, *Schizophyllum* y *Thyridaria* se encontraron únicamente en la hoja (figura 25; anexo 2). Al comparar la distribución de géneros epífitos y endófitos por tejido, no se encontró ningún género que haya sido identificado de manera exclusiva en algún tejido para cualquiera de las dos poblaciones.

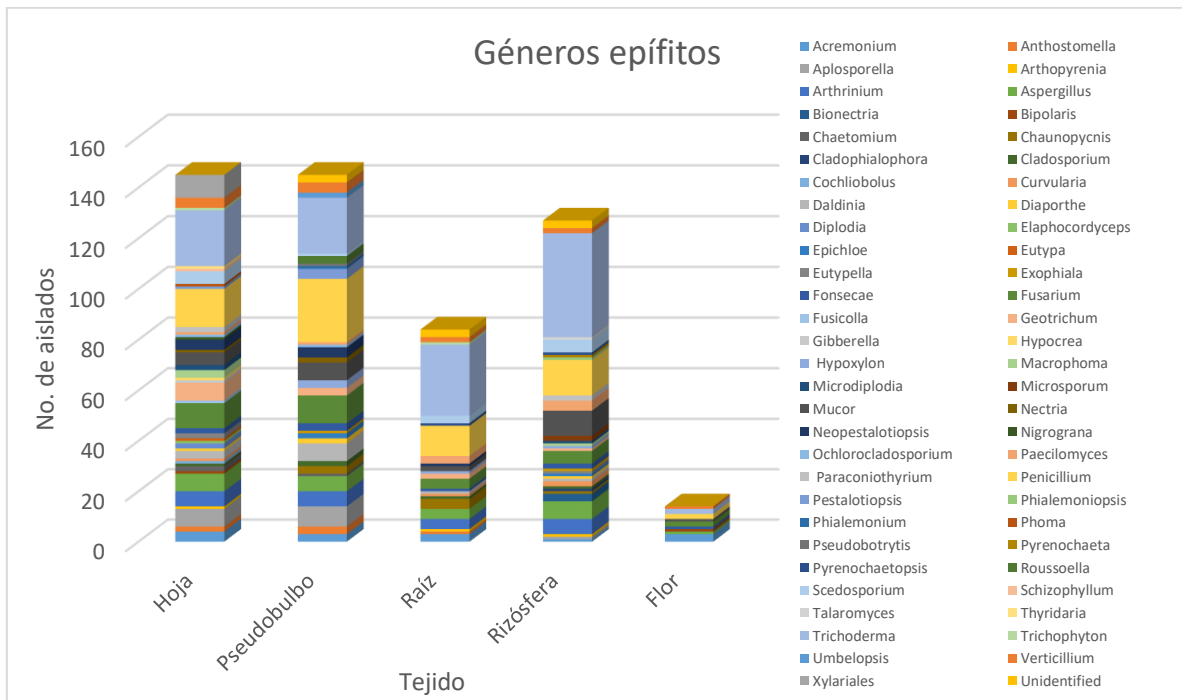


Figura. 25. Géneros fúngicos epífitos asociados a *S. tigrina*. Se presentan los diferentes géneros identificados de manera epífita en tejido de hoja, pseudobulbo, raíz, rizósfera y flor.

5.4.6 Distribución de géneros fúngicos dependiendo del hábito de crecimiento de *S. tigrina*.

Por otra parte, dado que se tenían plantas con diferentes hábitos de crecimiento, se decidió ver la influencia del hábito de crecimiento de las plantas en la riqueza y diversidad del microbioma asociado. Los resultados que arrojó esta comparación se muestran en la figura 26, pudiéndose observar que las plantas que crecen como epífitas y sobre sustrato presentó una mayor diversidad de géneros que las crecidas sobre roca, tanto en la población endófitas como en la epífitas.

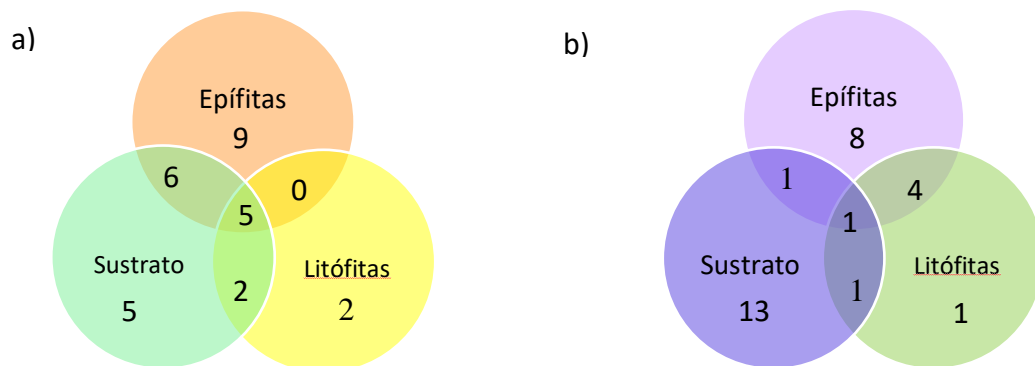


Figura 26. Abundancia de géneros fúngicos en *S. tigrina* de acuerdo al hábito de crecimiento de las plantas. Se muestra el número de géneros compartidos por las plantas con diferente hábito de crecimiento, además de mostrar el número de géneros que cada planta albergó. A) Número de géneros endófitas y b) epífitas.

En la población fúngica endófito, las plantas compartieron los cinco géneros siguientes: *Acremonium*, *Arthrimum*, *Penicillium*, *Scedosporium* y *Trichoderma*. Las plantas con mayor número de géneros exclusivos fueron las epífitas con nueve, mientras que las crecidas en sustrato presentaron cinco géneros no compartidos y la planta litófito solamente dos. Además del *core*, las plantas epífitas compartieron otros seis géneros con las plantas crecidas en sustrato, mientras que las plantas crecidas en sustrato compartieron dos con las plantas litófitas, las plantas litófitas y epífitas sólo compartieron el *core* (Tabla 10).

Tabla 10 Géneros fúngicos endófitos recuperados de *S. tigrina* en diferentes hábitos de crecimiento.

Géneros Endófitos			
Plantas (<i>core</i>)	Plantas Epífitas	Plantas de sustrato	Plantas Litófitas
<i>Acremonium</i> <i>Arthrimum</i> <i>Penicillium</i> <i>Scedosporium</i> <i>Trichoderma</i>	<i>Bionectria</i> <i>Chaetomium</i> <i>Cladosporium</i> <i>Eutypella</i> <i>Hypocrea</i> <i>Hypoxylon</i> <i>Mucor</i> <i>Pestalotiopsis</i> <i>Phaeosphaeriopsis</i>	<i>Alternaria</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Geotrichum</i> <i>Nectria</i> <i>Phialemoniopsis</i>	<i>Macrophoma</i> <i>Pyrenochaeta</i>
Plantas epífitas vs sustrato	Plantas epífitas vs litófitas	Plantas sustrato Vs Litófitas	
<i>Aspergillus</i> <i>Diplodia</i> <i>Fonsecae</i> <i>Fusarium</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Xylariales</i>		<i>Annulohypoxylon</i> <i>Anthostomella</i>	

Para el caso de la población fúngica epífito, todas las plantas compartieron 13 géneros, además las plantas que crecieron en sustrato tuvieron trece géneros exclusivos, la epífito tuvo ocho géneros únicos y la planta litófito sólo a *Giberella*. Las plantas epífitas compartieron doce géneros aparte del *core* con las plantas crecidas en sustrato y cuatro con las plantas que crecían como litófitas; por otra parte las plantas litófitas y las crecidas en sustrato sólo compartieron al género *Annulohypoxylon* (Tabla 11).

Tabla 11. Géneros fúngicos epífitos recuperados de *S. tigrina* en diferentes hábitos de crecimiento.

Géneros Epífitos			
Plantas(core)	Plantas Epífitas	Plantas de sustrato	Plantas Litófitas
<i>Acremonium</i> <i>Arthrinium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Fonsecae</i> <i>Fusarium</i> <i>Geotrichum</i> <i>Mucor</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Penicillium</i> <i>Scedosporium</i> <i>Trichoderma</i> <i>Verticillium</i>	<i>Cladophialophora</i> <i>Coniothyrium</i> <i>Daldinia</i> <i>Eutypella</i> <i>Fusicolla</i> <i>Microsporum</i> <i>Schizophyllum</i> <i>Talaromyces</i>	<i>Aplosporella</i> <i>Bionectria</i> <i>Chaetomium</i> <i>Hypocrea</i> <i>Lasidiplodia</i> <i>Metarhizium</i> <i>Nectria</i> <i>Ochlocladosporium</i> <i>Phialemoniopsis</i> <i>Phoma</i> <i>Pseudobotrytis</i> <i>Pyrenochaeta</i> <i>Xylaria</i>	<i>Gibberella</i>
Plantas epífitas vs sustrato	Plantas epífitas vs litófitas	Plantas sustrato Vs Litófitas	
<i>Anthostomella</i> <i>Arthopyrenia</i> <i>Chaunopycnis</i> <i>Curvularia</i> <i>Diaporthe</i> <i>Diplodia</i> <i>Epichloe</i> <i>Macrophoma</i> <i>Microdiplodia</i> <i>Microsphaeropsis</i> <i>Pestalotiopsis</i> <i>Xylariales</i>	<i>Cochliobolus</i> <i>Exophiala</i> <i>Pyrenochaetopsis</i> <i>Trichophyton</i>	<i>Annulohyphoxylon</i>	

5.5 Identificación fenotípica de levaduras

Continuando con la identificación de hongos asociados a la orquídea *Stanhopea tigrina*, en este apartado se describe la identificación parcial de las levaduras recuperadas durante el proceso de aislamiento y purificación de cepas. Es importante mencionar que la identificación de levaduras es un proceso que al realizarse de manera convencional necesita la evaluación de alrededor de 60 a 90 pruebas, el proceso es complejo, laborioso y consume mucho tiempo (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). En este trabajo se realizó una identificación básica solamente para confirmar la naturaleza fúngica de los aislados recuperados que no presentaron crecimiento filamentosos.

5.5.1 Tinción de Gram

Como primer paso en la identificación de levaduras se realizó la tinción de Gram para 253 cepas de las cuales 103 resultaron ser Gram positivas y el resto se tiñeron como Gram negativas (figura 27). Es

importante mencionar que en la tinción de Gram las levaduras se tiñen como Gram positivas (moradas) por la cantidad de lípidos y esteroides que presentan en la pared celular. Esta característica nos permitió discernir entre toda la población y quedarnos únicamente con 103 cepas Gram positivas como probables levaduras, mientras que las cepas Gram negativas no fueron tomadas en cuenta por ser consideradas bacterias.

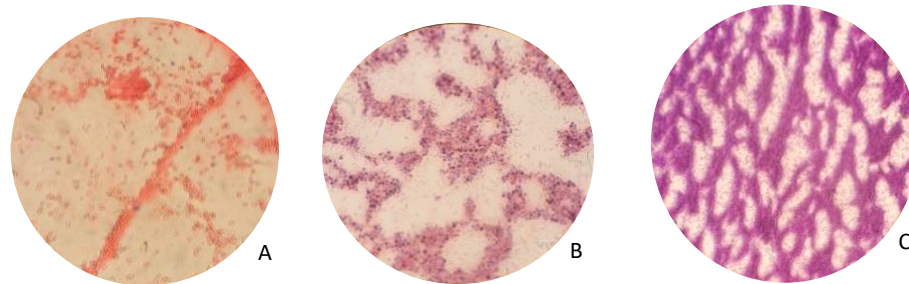


Figura 27. Tinción de Gram. A) Aislado 121 Gram negativo, B y C) Aislado 421 y 701, cepas Gram positivas. Las imágenes fueron tomadas al microscopio usando el objetivo 40X.

5.5.2 Tinción de azul de algodón

Las 103 cepas que resultaron Gram positivas fueron teñidas con azul de algodón, que es un colorante ácido que tiñe el citoplasma y la quitina presente en las células fúngicas, lo que permite el contraste necesario para ver a las células fúngicas teñidas de azul en el microscopio (figura 28).

De las 103 cepas gram positivas sometidas a la tinción con azul de algodón únicamente 80 se teñieron con el azul de algodón, mientras que 23 no se teñieron con este colorante. Las cepas Gram positivas que se teñieron con azul de algodón fueron consideradas levaduras y fueron sometidas a ensayos de asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno (auxonogramas).

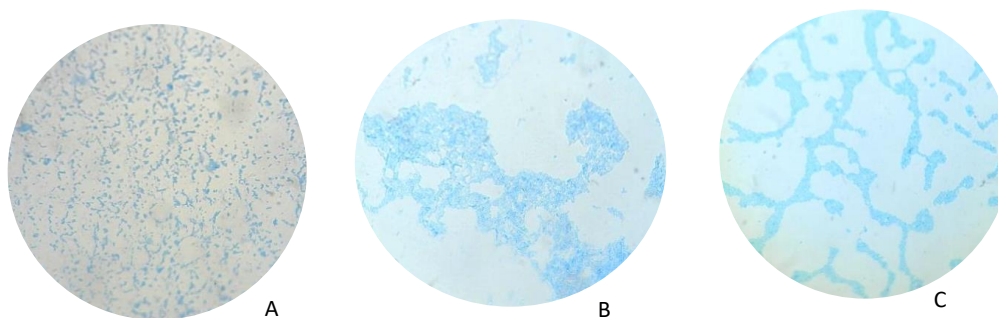


Figura 28. Tinción con azul de algodón. Se muestran cepas teñidas A) Aislado 396, B) aislado 357 y C) aislado 636. Las imágenes fueron tomadas al microscopio objetivo 40X.

5.5.3 Auxonograma

Las propiedades fisiológicas de las levaduras sirven en gran medida para describir e identificar géneros y en menor medida las especies. Las pruebas más usadas para la identificación de levaduras es la fermentación de azúcares o fuentes de carbono y el crecimiento sobre diferentes fuentes de nitrógeno, carbono, vitaminas, resistencia a antibióticos entre otros (Kurtzman, 1999). En este trabajo, con el objetivo de hacer una identificación parcial del metabolismo de las levaduras se realizó la prueba de asimilación de fuentes de carbono y nitrógeno para aquellas muestras identificadas como levaduras de acuerdo con los resultados obtenidos de las tinciones de Gram y azul de algodón.

5.5.3.1 Asimilación de fuentes de carbono

De las fuentes de carbono probadas, la manosa resultó ser la más utilizada por los aislados pues fue utilizada por 71 aislados, la glucosa fue la segunda fuente utilizada por las levaduras con 69 aislados y la galactosa la fuente menos utilizada por los aislados (figura 29).

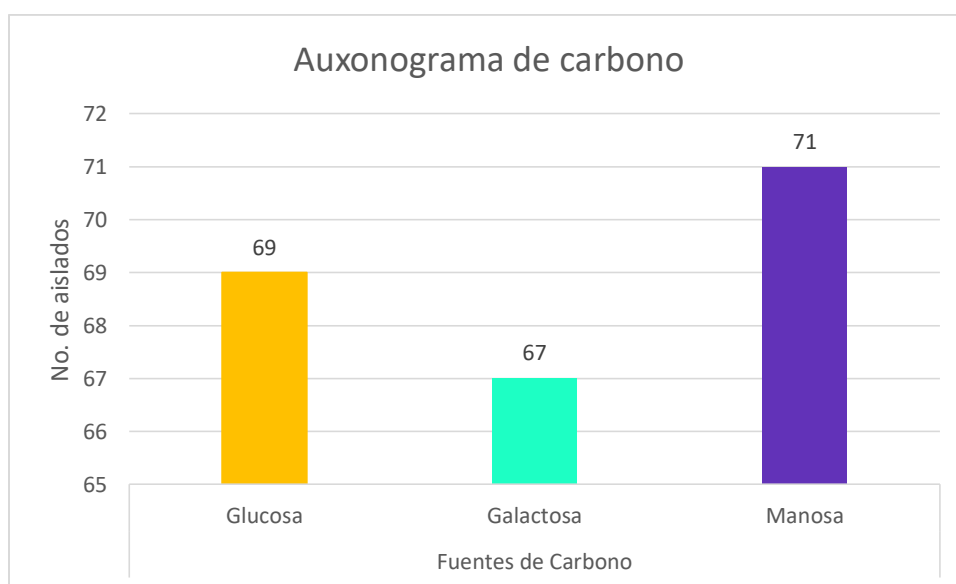


Figura 29. Asimilación de fuentes de carbono. Se muestran las diferentes fuentes de carbono utilizadas y el número de aislados que asimilaron las fuentes utilizadas.

Es importante mencionar que estos resultados muestran un panorama global para una característica metabólica de las cepas levaduriformes aisladas de los tejidos de *S. tigrina*, indicando cual es la fuente de carbono utilizada preferentemente por los aislados. Por otro lado, se puede mencionar que la mayoría de las levaduras aisladas pudieron usar las tres fuentes de carbono probadas en este ensayo.

5.5.3.2 Asimilación de fuentes de nitrógeno

Siguiendo con la identificación parcial del metabolismo básico de las levaduras se probó la capacidad de los aislados de metabolizar diferentes fuentes de nitrógeno. El nitrógeno es un nutriente esencial para todos los seres vivos. Las levaduras son capaces de adaptar su metabolismo de acuerdo a la fuente de nitrógeno disponible en el ambiente. Se probó la asimilación de tres diferentes fuentes de

nitrógeno (urea, fenilalanina y cloruro de amonio) para ver la capacidad que presentan los aislados identificados como levaduras para usar estas fuentes de nitrógeno. De las fuentes de nitrógeno probadas, el cloruro de amonio fue la fuente en la que crecieron la mayoría de los aislados, la urea ocupó el segundo lugar en las fuentes utilizadas, mientras que la fenilalanina fue utilizada por 65 de las cepas probadas (figura 30).

Con estos resultados se puede decir que los aislados tienen la habilidad de usar más de una fuente de nitrógeno, puesto que fueron capaces de crecer en los diferentes medios de cultivo.

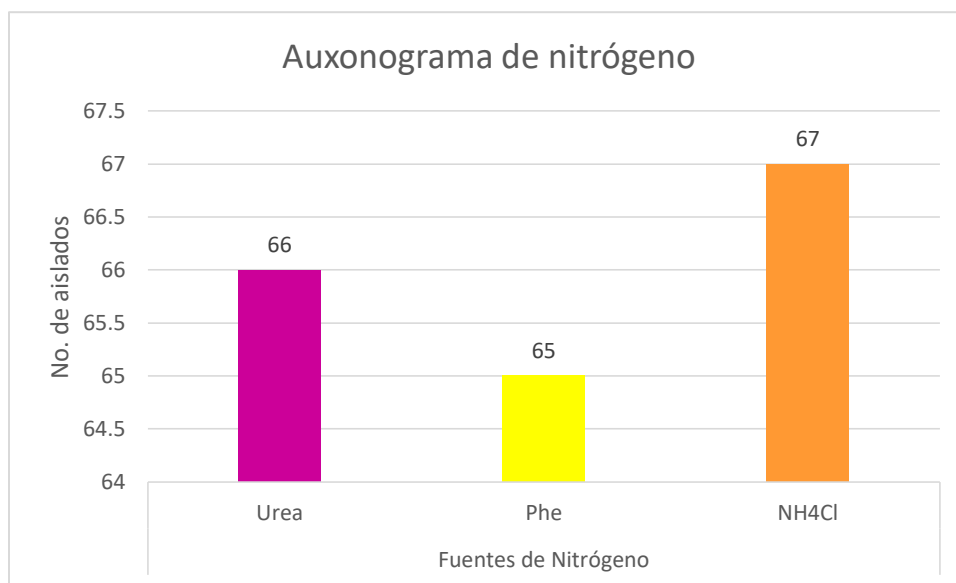


Figura 30. Asimilación de fuentes de nitrógeno. Se muestran las diferentes fuentes de nitrógeno utilizadas y el número de aislados que utilizaron cada fuente de nitrógeno.

De manera general, la caracterización parcial de levaduras realizada en este trabajo comprende dos tinciones y las características metabólicas referentes al empleo de fuentes de carbono y nitrógeno por parte de las levaduras aisladas. Los aislados fúngicos de crecimiento filamentosos, así como aquellos identificados como levaduras se probaron para evaluar la capacidad que presentan para producir giberelinas.

5.6 Producción de Giberelinas

5.6.1 Identificación cualitativa

La identificación cualitativa de cepas productoras de giberelinas se realizó siguiendo el protocolo descrito en la metodología (Apartado 4.6). De esta manera, se evaluaron 891 aislados, de los cuales 627 fueron cepas filamentosas y 264 levaduriformes. Cada cepa pura fue sembrada en medio de cultivo ICI con baja concentración de nitrógeno para favorecer la producción de giberelinas de acuerdo con lo que se encuentra reportado en la literatura. Se realizaron ensayos por duplicado para cada cepa; los cultivos de las cepas que mostraron fluorescencia verde al ponerlas en contacto con luz UV (Figura 31) se consideraron positivas mientras que aquellas cuyo cultivo no mostraron fluorescencia fueron clasificadas como negativas a la producción de GAs; para corroborar este resultado las cepas que dieron positivas a este primer tamiz fueron sometidas nuevamente al ensayo, esta vez poniendo cultivos por triplicado.

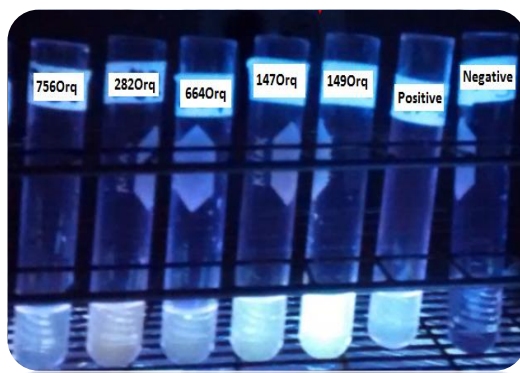


Figura 31. Determinación cualitativa de la producción de giberelinas. Se observa la fluorescencia en las muestras 147, 149, 282, 664 y 756, que resultaron positivas. Se incluyeron un control negativo sin inóculo y uno positivo [2 µg]. En la imagen se observa la diferencia entre las cepas productoras (fluorescencia-verde) y el control negativo (sin fluorescencia).

5.6.1.1 Aislados filamentosos

De las 627 cepas filamentosas en las que se evaluó la capacidad para producir giberelinas, 21 aislados dieron positivos a la prueba (tabla 12). De estas 21 cepas, diez fueron aislados epífitos (cuatro provenientes de pseudobulbo y seis de hoja), mientras que seis aislados fueron endófitos (cinco aislados de raíz y una de hoja) y cinco se recuperaron de la rizósfera.

Tabla 12. Muestras positivas para la producción de giberelinas

<i>Clave</i>	<i>Origen</i>
STF62	Rizósfera
STF147	Epífito-pseudobulbo
STF149	Epífito-pseudobulbo
STF282	Endófito-raíz
STF343	Rizósfera
STF524	Epífito-pseudobulbo
STF526	Epífito-hoja
STF538	Epífito-pseudobulbo
STF591	Rizósfera
STF599	Endófito-raíz
STF624	Rizósfera
STF654	Epífito-hoja
STF664	Endófito-hoja
STF673	Epífito-hoja
STF723	Endófito-raíz
STF753	Epífito-hoja

STF756	Epífito-hoja
STF757	Epífito-hoja
STF859	Endófito-raíz
STF860	Endófito-raíz
STF864	Rizósfera

5.6.1.2 Aislados levaduriformes

Siguiendo con la identificación de productores de GAs se probó la capacidad de los 264 aislados levaduriformes de producir estos metabolitos; sin embargo, ninguno resultó positivo a la producción de giberelinas (figura 32), incluso después de haber sido corroborado el resultado. Puesto que uno de los principales objetivos de este proyecto fue identificar aislados productores de GAs que posteriormente pudieran ser utilizados para favorecer la germinación y crecimiento de *Stanhopea tigrina*, los aislados que no produjeron estos metabolitos no fueron utilizados en experimentos posteriores.

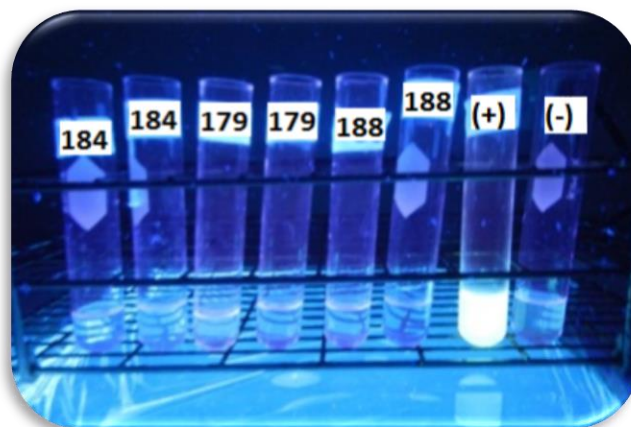


Figura 32. Determinación cualitativa de la producción de giberelinas en levaduras. Se observa la fluorescencia en el control positivo (+) [6 µg]. Las muestras 179, 184 y 188 fueron negativas, se incluyó un control negativo (C-).

En este proyecto se identificó a las cepas productoras de giberelinas de manera cualitativa como una prueba tamiz, en la elección de cepas productoras de GAs.

5.6.2 Condiciones de crecimiento de las cepas productoras de giberelinas

Para implementar las condiciones bajo las cuales las cepas producen una mayor cantidad de giberelinas, se probó el efecto del pH y el tiempo de incubación en la producción de giberelinas usando dos medios de cultivo reportados en la literatura para la producción de giberelinas, los resultados obtenidos se presentan a continuación.

5.6.2.1 pH

Las cepas productoras de giberelinas fueron crecidas en medio ICI y medio Czapek (se utilizaron los valores de pH 5, 6 y 7 en el caso del medio Czapek) e incubadas a 30°C para evaluar el medio y pH en el cual los aislados mostraron una mayor producción de giberelinas. La cantidad de producción se calculó cualitativamente de manera visual calificando con una cruz (+) al pH en el que se observó menor producción de giberelinas (menor fluorescencia verde) y con tres cruces (+++) al pH con mayor producción de giberelinas (mayor fluorescencia verde) (Tabla 13).

Tabla 13. Producción de giberelinas según el pH

Cepas	Medio Czapek			ICI
	pH5	pH6	pH7	pH4
STF62	+++	++	++	+
STF147	+++	+++	+++	++
STF149	+++	+++	+++	++
STF282	+++	+++	++	+
STF343	+++	+++	++	++
STF524	++	+++	++	+
STF526	+++	++	++	+
STF538	+++	+++	+++	+
STF591	+++	+++	++	+
STF599	+++	+++	+++	+
STF624	+++	++	++	+
STF654	++	++	+++	+
STF664	+++	+++	++	++
STF673	+++	++	+	+
STF723	+++	+++	++	++
STF753	+++	+++	+++	+
STF756	+++	+++	+++	+
STF757	+++	+++	+++	+
STF859	+++	+++	+++	+
STF860	+++	++	+++	+
STF864	+++	++	++	+

Según se puede observar en la tabla 13, la mayoría de las cepas tuvieron una producción de giberelinas mayor en el medio Czapek a pH 5 (figura 33, C), solo algunas cepas mostraron una mayor producción a pH 7 como es el caso de la cepa 654 (figura 33, A), además aunque la producción de GAs en el medio de cultivo con pH 5 fue buena, resultó menor que la obtenida en el pH 7; algunas cepas tuvieron una buena producción independientemente del pH y medio en el que se incubaron, aunque si fue evidente una producción mayor de giberelinas en el medio Czapek en comparación con el medio ICI (figura 33, B) para la mayoría de las cepas. Cabe mencionar que algunas cepas crecieron bien en todos los medios y a cualquier pH, como la cepa 149.

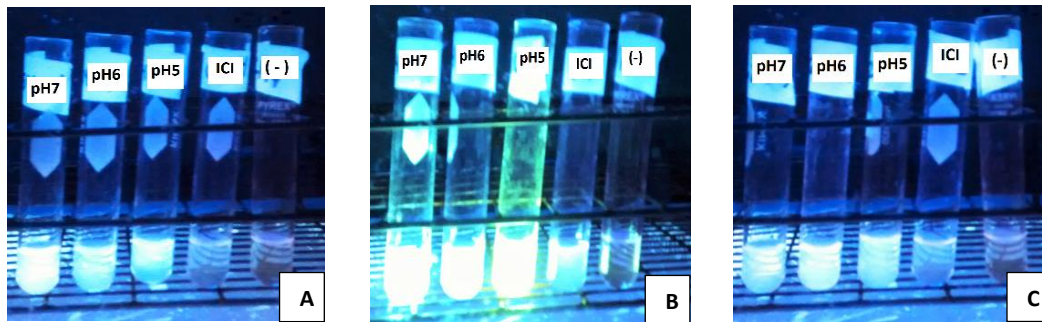


Figura 33. Producción de GAs en medio ICI y Czapek a diez días de incubación (A) cepa 654, (B) cepa 149 y (C) cepa 62. Se muestra la intensidad en la detección de las giberelinas según el pH del medio. (-) control negativo, medio ICI y el medio Czapek fue etiquetado según el pH que tenía el medio.

Cabe mencionar que se encontraron ciertas peculiaridades en la producción de giberelinas a diferentes valores de pH, todas las cepas tuvieron una mayor producción de giberelinas al usar el medio Czapek a un pH 5 al hacer una medición cualitativa de la producción. En la literatura se ha reportado la influencia del pH en la producción de giberelinas, algunos resultados reportados coinciden en que el pH que favorece la producción de las giberelinas va de 5 a 5.5 (Bilkay *et al.*, 2010; Dendooven *et al.*, 2000), siendo éste el valor de pH en el que las cepas también mostraron una mayor producción de giberelinas.

5.6.2.2 Tiempo de incubación

Además de probar cual es el mejor pH y el medio para la incubación de las cepas, se probó el tiempo óptimo de incubación para una mayor producción de giberelinas. Las cepas se cultivaron por 20 días a 30°C y en agitación. Durante el periodo de incubación se realizó el monitoreo de la producción de giberelinas. La medición cualitativa de la producción de giberelinas se realizó a partir del día tres posterior a la siembra de las cepas y hasta el día 20 (figura 34). Las cepas mostraron producción de giberelinas en todos los medios y valores de pH evaluados a partir del día 4 y hasta el día 20. Sin embargo, la producción se hizo evidente en el día 10 post-inoculación y se mantuvo casi constante hasta el día 20. En otros estudios se ha observado que el tiempo en el que se alcanza la mayor producción de GAs es en el día 12 después de la inoculación cuando se cultivan las cepas a 30°C (Bilkay *et al.*, 2010; Kahlon & Malhotra, 1986); en nuestro ensayo la mayor producción se empezó a observar a partir del día 10.

Debido a los resultados obtenidos de la influencia del pH, el medio de cultivo y el tiempo de incubación, las cepas productoras de giberelinas a partir de este ensayo fueron cultivadas en medio Czapek a un pH 5, por diez días, a 30°C y en agitación, condiciones bajo las cuales la mayor parte de la población alcanzó el máximo en la producción.

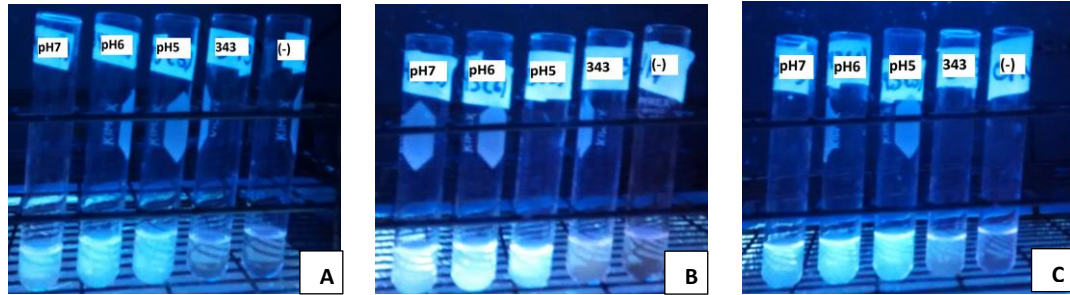


Figura 34. Producción de GAs en varios tiempos de incubación. Se muestra la producción de la cepa 343 en medio Czapek (pH 7, 6 y 5) y en medio ICI a los (A) 4 días, (B) 10 días y (C) 20 días. Además se muestra el control negativo (-), el medio ICI se etiquetó con el número de la cepa (343), mientras que el Czapek fue etiquetado según el pH del medio.

5.6.2.3 Cromatografía en capa fina (CCF)

Dentro de los métodos utilizados para determinar la producción cualitativa de las giberelinas, se intentó utilizar la CCF, por lo que se realizó la cromatografía en capa fina para algunos de los aislados identificados como productores cualitativos de GAs y se obtuvieron diferentes patrones de corrimiento (figura 49). Los factores de retención (Rf) obtenidos se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. Factores de retención (Rf) obtenidos en cultivos de diferentes muestras.

Muestras	Rf1 GA ₃	Rf2	Rf3	Rf4	Rf5
STF147	0.29	0.81	0.68		
STF149	0.29	0.77	0.81		
STF664	0.33	0.28	0.40	0.45	0.75
STF673	0.34	0.45	0.60		
STF756	0.32				

Al comparar los Rf obtenidas en el corrimiento de GA₃ que se utilizó como la giberelina patrón no se observaron resultados similares para ninguna de las muestras utilizadas; si bien se observaron manchas en colores verde y azul esto no asegura la presencia de giberelinas pues existen algunos compuestos aromáticos, grupos nitrilo y carbonilo que son cromóforos. Probablemente este resultado podría ser indicativo de la presencia de este tipo de compuestos o de algunos con características parecidas a las giberelinas o incluso puedan ser otras giberelinas diferentes a GA₃. Para las muestras STF147 y STF149 se observaron manchas verdes barridas a lo largo de los carriles, mientras que en la muestras STF664 todas las manchas tuvieron una fluorescencia azul similar a la observada en GA₃ pero ninguna tuvo el mismo coeficiente de retención, además en la muestra 673 se observaron dos manchas con un Rf₂ de 0.45 y Rf₃ de 0.60 de color carmelita intenso las primeras y ligero las segundas, las cuales probablemente puedan ser GA₄ y GA₇ según lo reportado por Castillo et al., 2007. Finalmente, en la muestra 756 no se observaron manchas fluorescentes al observar la placa bajo luz UV (figura 35).

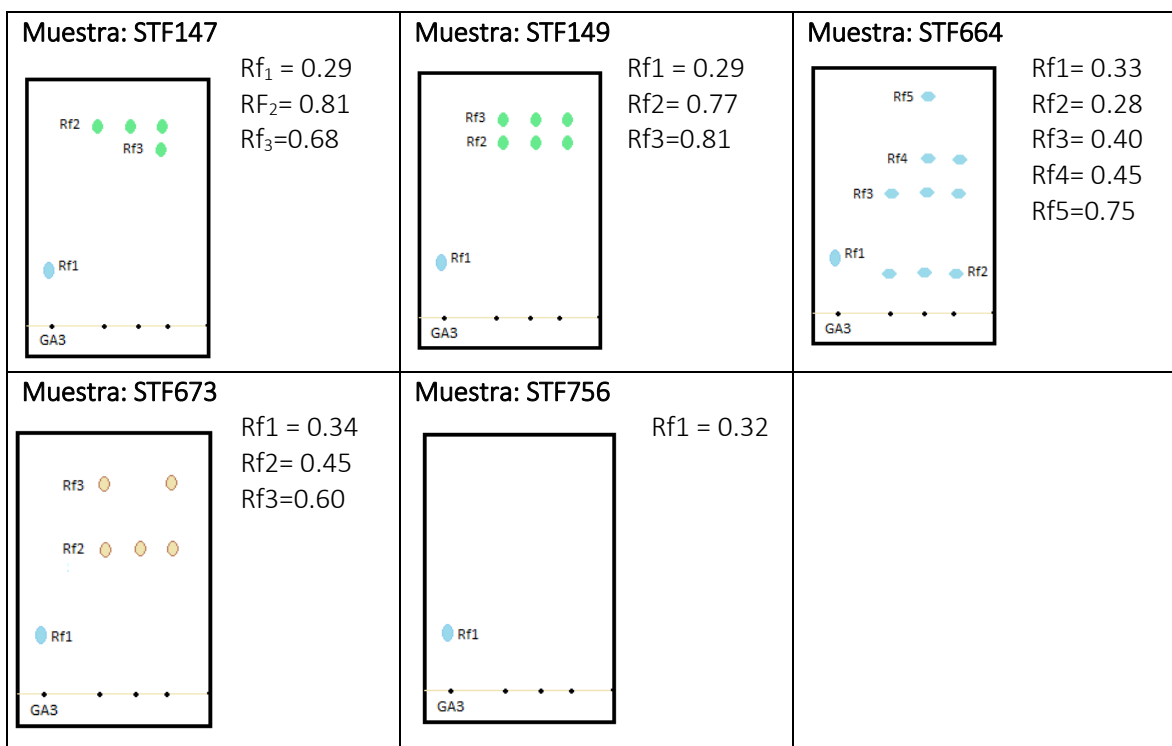


Figura 35. Resultados de la CCF para algunos aislados productores de GAs. Se representan los Rf que se obtuvieron en muestras utilizadas en este ensayo y que incluyeron los aislados STF149, STF147, STF664, STF673 y STF756.

Utilizando este método no se logró observar la presencia de GA₃ en las muestras utilizadas; es posible que los compuestos que desarrollaron los patrones de corrimiento observados correspondan a otros compuestos incluidas algunas otras giberelinas, Además y de acuerdo con lo reportado por Castillo y colaboradores en 2007, los patrones de corrimiento que se observaron en el aislado STF673 podrían sugerir la presencia de las giberelinas bioactivas GA₄ y GA₇.

5.6.3 Determinación cuantitativa de la producción de giberelinas

5.6.3.1 Cuantificación de GAs mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Con la finalidad de corroborar las observaciones de la determinación cualitativa para la producción de giberelinas tanto por el método de Candau como por los ensayos de CCF, se realizó la identificación cuantitativa de GAs mediante la técnica de HPLC para los productos de extracción de las 21 muestras que habían resultado positivas empleando dichos métodos. Inicialmente se probaron diferentes proporciones de solventes en la fase móvil, encontrando mejores resultados para la fase móvil compuesta de acetonitrilo y agua ácida (0.01% H₃PO₄), en una proporción de 70:30 por un periodo de 15 minutos con una velocidad de flujo de 0.6 ml/min. Las diferentes composiciones para la fase móvil evaluadas se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Gradiente de solventes probados en los ensayos de HPLC.

Ensayo	Solventes		Tiempo (minutos)
1°	Acetonitrilo 40%	Agua ácida 60%	15
2°	Acetonitrilo 100%		0 – 5
	Acetonitrilo 60%	Agua ácida 40%	5 – 15
3°	Acetonitrilo 20%	Agua ácida 80%	0 – 15
4°	Acetonitrilo 40%	Agua ácida 60%	0 – 4
	Acetonitrilo 100%		4 – 15
5°	Acetonitrilo 100%		0 – 4
	Acetonitrilo 60%	Agua ácida 40%	4 – 15
6°	Acetonitrilo 50%	Agua ácida 50%	0 – 10
7°	Acetonitrilo 60%	Agua ácida 40%	0 – 6
	Acetonitrilo 100%		6 – 15
8°	Acetonitrilo 70%	Agua ácida 30%	0 – 6
	Acetonitrilo 100%		6 – 15
9°	Acetonitrilo 50%	Agua ácida 50%	0 – 6
	Acetonitrilo 100%		6 – 15
10°	Acetonitrilo 100%		0 – 15
11°	Acetonitrilo 70%	Agua ácida 30%	0 – 15

Bajo estas condiciones de experimentación se cuantificó la producción de giberelinas, empleando las giberelinas GA₃ (Sigma G7645) y GA₄ (Sigma G7276) como estándares y los cromatogramas obtenidos (figura 36; anexo 3) demostraron la producción de giberelinas en los 21 aislados analizados. La giberelina GA₃ fue producida por todos los aislados mientras que la GA₄ únicamente se detectó para el aislado STF723. La concentración de metabolito generado por los diferentes aislados se determinó tal como se describe en la sección de material y métodos, encontrando que el aislado STF62 fue el que produjo la mayor cantidad de GA₃ (4.14 µg), seguido por el aislado STF624 que produjo 2.06 µg. Los aislados STF282, STF524, STF526, STF538, STF599, STF637, STF657, STF756 y STF757 mostraron una buena producción de GA₃ la cual cayó en el rango de 1µg, además el aislado STF723 fue el único identificado como productor de ambas giberelinas; GA₃ (0.13 µg) y GA₄ (2.18 µg) (Tabla 16).

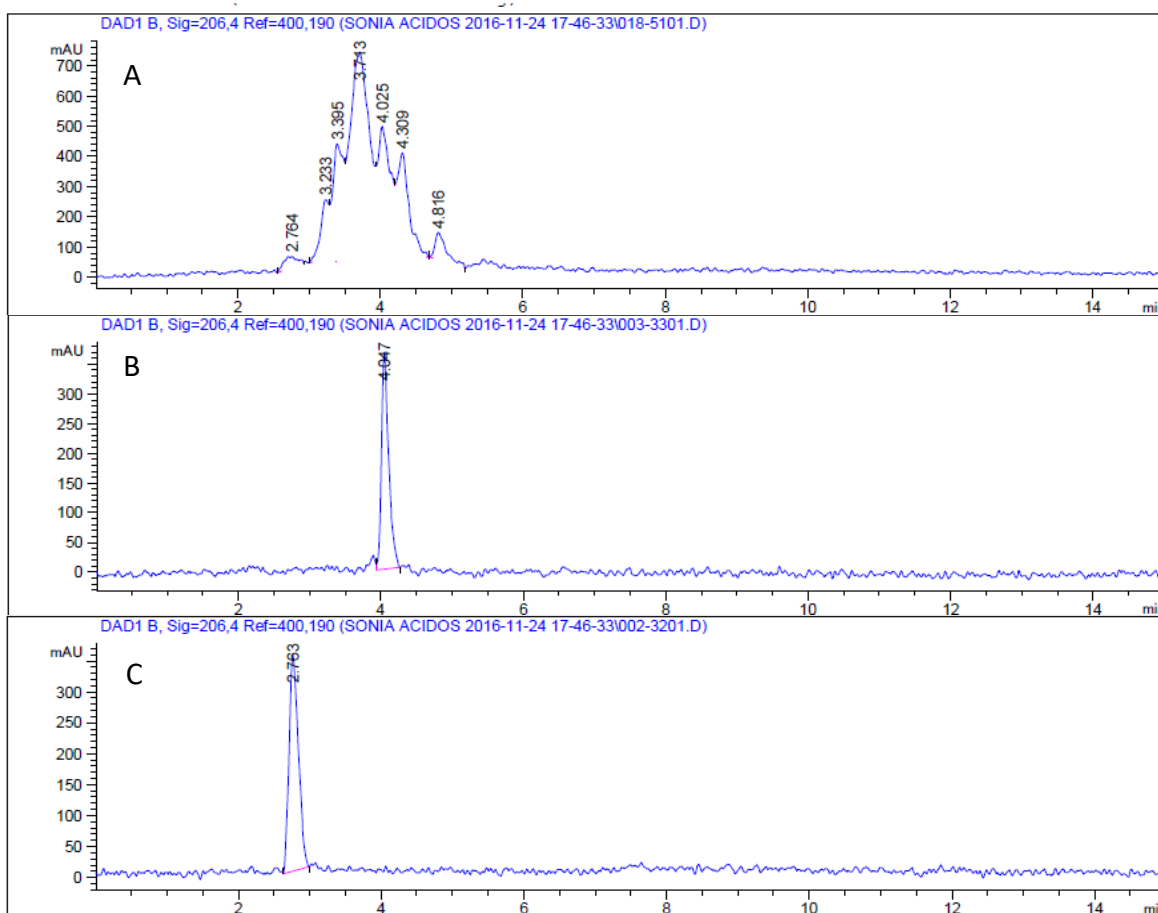


Figura. 36. Producción de giberelinas en aislados fúngicos determinada por HPLC. Se pueden observar los cromatogramas para A) Producción de GA₃ y GA₄ en la cepa STF723, B) Estándar GA₄, 1 µg mL⁻¹, C) Estándar GA₃, 1 µg mL⁻¹.

Tabla 16. Determinación cuantitativa de la producción de GA₃ y GA₄ en aislados fúngicos por HPLC.

Aislados	GA ₃		GA ₄	
	Rt (min)	Concentración (µg)	Rt (min)	Concentración (µg)
Estándar	2.763	1000	4.047	1000
STF62	2.745	4.14		
STF147	2.750	0.87		
STF149	2.743	0.53		
STF282	2.743	1.10		
STF343	2.733	0.60		
STF524	2.775	1.37		
STF526	2.780	1.57		

STF538	2.788	1.29		
STF591	2.731	0.63		
STF599	2.742	1.40		
STF624	2.772	2.06		
STF654	2.727	0.63		
STF664	2.720	0.51		
STF673	2.751	1.67		
STF723	2.764	0.13	4.025	2.18
STF753	2.781	0.71		
STF756	2.760	1.08		
STF757	2.783	1.28		
STF859	2.737	0.45		
STF860	2.478	0.34		
STF864	2.718	0.44		

5.6.4 Identificación molecular de las muestras productoras de giberelinas

5.6.4.1 Extracción de ADN

Para confirmar la identidad de los aislados en los que se confirmó la producción de giberelinas mediante HPLC, se realizó la extracción de ADN de las 21 cepas productoras de giberelinas según lo descrito en materiales y métodos para su posterior amplificación y secuenciación que nos permitiera la identificación genotípica. En la figura 37 se muestran los resultados de la extracción para algunas de las cepas.

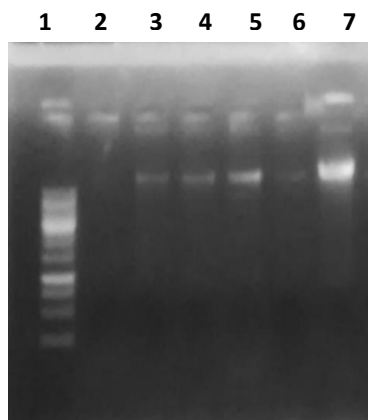


Figura 37. Extracción de ADN de los aislados productores de giberelinas. Línea 1 marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas), línea 2 a la 7 productos de extracción de ADN total.

5.6.4.3 Amplificación por PCR

Como ya se describió anteriormente, la amplificación por PCR se realizó sobre la región 18s-ITS-28s, la cual se encuentra muy conservada en los hongos y permite la identificación de cepas a nivel de género. En la figura 38, se muestran los amplificados que se obtuvieron después del ensayo de PCR utilizando el par de oligonucleótidos ITS1F/LR5, los cuales se enviaron a secuenciar (Macrogen, Korea) para poder sugerir la identidad del género asociado a los aislados productores de giberelinas.

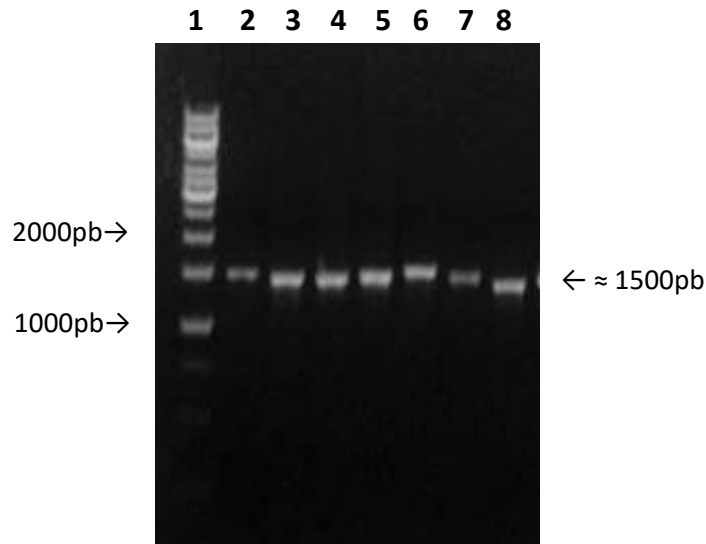


Figura 38. Amplificación de la región 18S-ITS-28S de diferentes aislados; 1 marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas); línea 2 al 8 amplificados usando oligonucleótidos ITS1F/LR5.

5.6.4.3 Análisis bioinformático

Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron purificados y enviados a secuenciar de acuerdo con las especificaciones del proveedor del servicio (Macrogen, Korea). Las secuencias proporcionadas fueron comparadas con los datos reportados en el GenBank y después del análisis para cada caso, se identificó el homólogo más cercano para cada una de las secuencias correspondientes a los aislados productores de giberelinas. Los resultados de dicho análisis se resumen en la tabla 17.

Tabla 17. Identificación genotípica de las cepas productoras de GAs

Clave de aislado	Longitud (nt)	Homólogo más cercano (GenBank)	Valor e	Identidad
STF62	1116	<i>Penicillium oxalicum</i>	0	97%
STF147	1141	<i>Penicillium sp</i>	0	98%
STF149	1395	<i>Penicillium citrinum</i>	0	96%
STF282	1210	<i>Macrophoma theicola</i>	0	97%
STF343	1184	<i>Talaromyces funiculosus</i>	0	98%
STF524	1386	<i>Neopestalotiopsis sp</i>	0	93%
STF526	1319	No identificado	0	0
STF538	1560	<i>Penicillium pinophilum</i>	0	95%
STF591	1589	<i>Penicillium oxalicum</i>	0	97%
STF599	1519	<i>Penicillium oxalicum</i>	0	97%
STF624	1386	<i>Bionectria cf. Ochroleuca</i>	0	95%
STF654	909	<i>Penicillium oxalicum</i>	2E-89	82%
STF664	1534	<i>Xylariales cf</i>	0	95%

STF673	1419	<i>Xylariales cf</i>	0	92%
STF723	1037	<i>Penicillium sp.</i>	0	98%
STF753	1406	<i>Nectria pseudotrachia</i>	0	86%
STF756	1422	<i>Diplodia quercivora</i>	0	93%
STF757	1150	<i>Arthrinium marii</i>	0	99%
STF859	1444	<i>Penicillium oxalicum</i>	0	95%
STF860	1098	<i>Xylariaceae sp</i>	0	97%
STF864	1110	<i>Trichoderma sp</i>	0	98%

De esta manera, las cepas productoras de giberelinas fueron identificadas y asociadas a once géneros. Se observa que nueve de los aislados pertenecen al género *Penicillium*, dos aislados fueron identificados como *Xylariales* y se identificó solo un aislado de los siguientes géneros: *Arthrinium*, *Bionectria*, *Macrophoma*, *Nectria*, *Neopestalotiopsis*, *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Xylariaceae* y *Xylariales*. De los géneros identificados, sólo *Arthrinium* y *Penicillium* han sido previamente reportados como productores de giberelinas (Mitter et al., 2002; Kawaide 2006; Khan et al., 2009; Bhalla et al., 2010; Leitão y Enguita. 2016), por lo que este trabajo constituye el primer reporte para el resto de los géneros como productores de giberelinas.

5.7 Ensayos de germinación de semillas de orquídea

Con la finalidad de evaluar la capacidad de algunos de los aislados fúngicos identificados para incidir de manera positiva sobre el desarrollo de la planta, se evaluó el efecto que tenían sobre la germinación de semillas de orquídea. A continuación se presentan las observaciones obtenidas en dichos ensayos.

5.7.1. Recolección y almacenamiento de semillas

Se recolectaron cápsulas de *Brassia Verrucosa* de plantas con 4 años de vida; una vez en el laboratorio se pusieron a secar a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por una semana en gel de sílice y pasado ese tiempo las cápsulas fueron desinfectadas y cortadas longitudinalmente; las semillas se colocaron en sobres de papel filtro previamente esterilizado y se pusieron a secar por 72 horas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con gel de sílice, una vez secas las semillas se colocaron en tubos falcón estériles de 15 ml y se almacenaron a 4°C por unos días, para después ser utilizadas en el ensayo de germinación

5.7.2 Ensayo piloto de germinación de semillas de orquídea

Para determinar las condiciones experimentales apropiadas para evaluar la capacidad de algunos aislados de promover la germinación en semillas de orquídea, se realizó un ensayo piloto de germinación utilizando semillas de la orquídea epífita *Brassia verrucosa* (figura 39) originaria de América con distribución en Guatemala, Honduras, Venezuela y México (Pupulin *et al.*, 2005). Debido al estado de amenaza en el que se encuentra *S. tigrina*, se consideró conveniente emplear un modelo alternativo al menos para implementar las condiciones óptimas para los ensayos de germinación. De manera adicional, se decidió realizar un ensayo de germinación en condiciones asimbióticas, el cual se tomaría como referencia para evaluar la posible mejora en el proceso de germinación bajo la presencia de los aislados fúngicos seleccionados. Las semillas se monitorearon por 155 días y los resultados obtenidos de dicho ensayo se presentan a continuación.



Figura 39. *Brassia verrucosa*. A) Flores de *B. verrucosa*. B) semillas de la orquídea vistas en objetivo 40X

5.7.2.1 Germinación asimbiótica

Para el caso de la germinación asimbiótica *in vitro*, las semillas comenzaron a hidratarse después de los 15 días de incubación. Sin embargo, en estas condiciones no se observaron cambios morfológicos que indicaran la germinación exitosa de las semillas a lo largo del transcurso del experimento. En la figura 40 se presentan las semillas al día 65 después de la inoculación, pudiéndose observar semillas hidratadas sin ningún cambio aparente en la morfología. En este ensayo se incluyeron semillas que se pusieron en contacto con diferentes concentraciones de giberelinas (5, 10 y 15 μM), las cuales correspondieron al control positivo; también se incluyó el control negativo correspondiente a semillas que crecieron en ausencia de giberelinas. En este ensayo no se observaron diferencias significativas para ninguna de las concentraciones de giberelinas utilizadas, ni tampoco para las placas control (placas sin giberelinas).

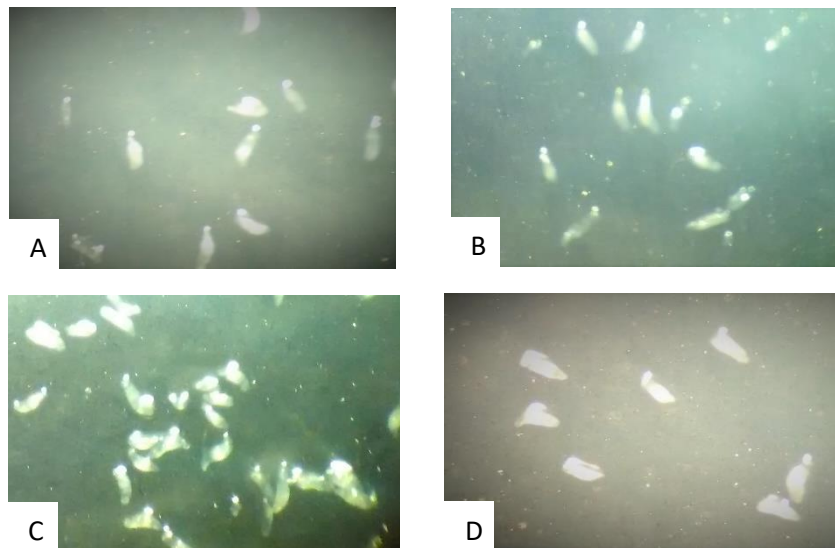


Figura 40. Germinación asimbiótica de semillas en medio MS a diferentes concentraciones de giberelinas. Las concentraciones empleadas fueron cero (a) 5 μM (b), 10 μM (c) y 15 μM (d) de GA₃.

Las semillas se siguieron monitoreando hasta completar 155 días, sin embargo se observaron pocas diferencias morfológicas durante el proceso. Si bien las semillas parecían más hidratadas con el paso de los días, no se observaron cambios morfológicos secundarios al ser observadas en microscopio

estereoscópico. En la figura 41 se presenta un compendio de imágenes tomadas en los últimos días del experimento, en donde se puede observar que las semillas estaban hidratadas aunque en ningún caso se observan cambios morfológicos secundarios como la ruptura de la testa, el desarrollo del primordio y el crecimiento del primordio (Dutra et al., 2008; Stewart & Kane, 2006; Stewart & Zettler, 2002; Johnson & Kane, 2007; Zeng et al., 2012). Por otro lado, durante el transcurso del experimento la contaminación de las placas fue un factor frecuente, pues a pesar de que las placas fueron observadas únicamente bajo condiciones de esterilidad, se encontraron eventos de contaminación. En la literatura se menciona que una de las desventajas de la germinación asimbiótica incluye la tasa de contaminación debido a la riqueza de los medios utilizados.

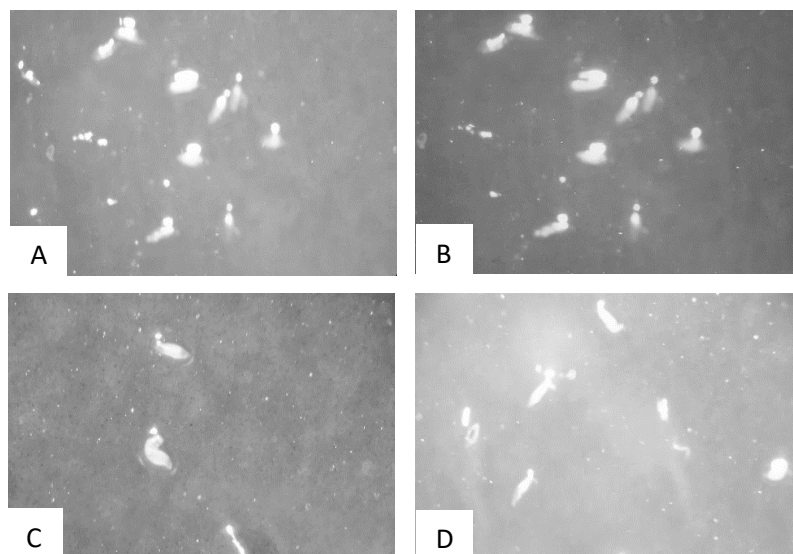


Figura 41. Germinación asimbiótica de semillas en medio MS en presencia de $15\mu\text{M}$ de GA_3 a lo largo de diferentes periodos de incubación. Se muestran los tiempos correspondientes a 100 (a), 120 (b), 150 (c) y 155 (d) días después de la inoculación.

5.7.2.2 Germinación simbiótica

De manera simultánea, se realizaron ensayos de germinación simbiótica para evaluar los cambios de las semillas en presencia de diferentes aislados fúngicos. Para este ensayo se emplearon los aislados STF62, STF147, STF149, STF282, STF343, STF524, STF526, STF538, STF591, STF599, STF624, STF654, STF664, STF673, STF723, STF753, STF756, STF757, STF859, STF860, STF864, todos estos aislados productores de giberelinas, metabolitos relacionados con diferentes estados de crecimiento en las plantas incluyendo el desarrollo de embriones, inducción de germinación de semillas, desarrollo de raíces, expansión de hojas, alargamiento del tallo, floración, desarrollo de semillas (Achard & Genschik, 2009; Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006; Ogawa et al., 2003; Pattanaik et al., 2014; Plackett et al., 2011). En este caso, también se observó una rápida hidratación de las semillas después de 15 días de incubación (figura 42). A pesar de que las semillas mostraron una rápida hidratación, transcurrieron varios días antes de observar los primeros cambios morfológicos, lo cual coincide con los largos tiempos de germinación reportados para las semillas de orquídeas.

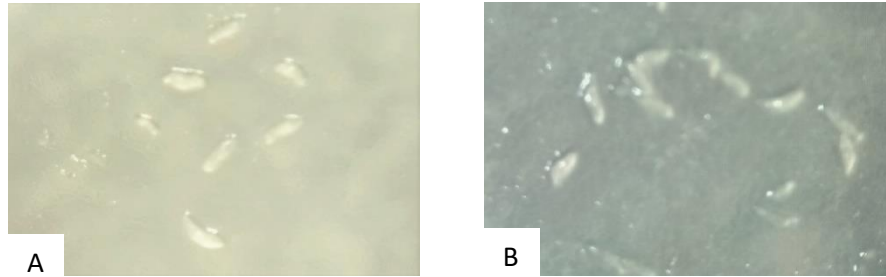


Figura 42. Semillas de *B. verrucosa* en ensayos de germinación simbiótica, se presentan las semillas creciendo en presencia de los aislados A) STF753 y B) aislado STF757. Se observa la hidratación de las semillas 15 días después de ser inoculados con hongos.

Al igual que para el caso de la germinación asimbiótica, las placas fueron monitoreadas por 155 días. A lo largo del ensayo resultó difícil observar las semillas que crecían en presencia de los aislados STF282, STF343, STF599 y STF756, debido a que estos aislados presentan un filamento grande que creó una malla sobre la superficie de la placa (figura 43).

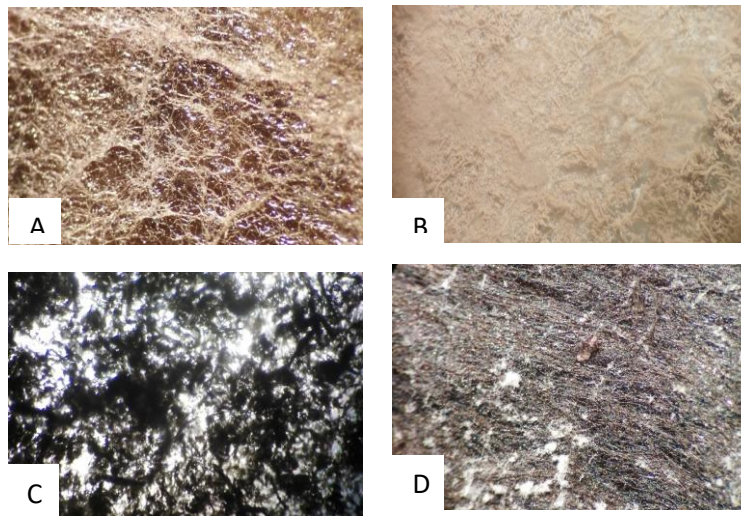


Figura 43. Germinación simbiótica de semillas de *B. verrucosa*. Se muestra la placa en presencia de los aislados STF282 (A), STF599 (B), STF343 (C) y STF756 (D). A y B corresponden a observaciones con el objetivo 5X, mientras que C y D fueron tomadas con el objetivo 10X. Estos aislados presentaron crecimiento abundante por lo que la observación de las semillas no fue posible.

Otro grupo de aislados desarrollaron un micelio denso y al ser evaluados en este ensayo permitieron monitorear el desarrollo de las semillas durante un periodo más largo que en el caso anterior, incluyendo los siguientes: STF62, STF147, STF149, STF591, STF654, STF723 y STF859. Al inicio del experimento estos aislados mostraron un crecimiento que permitió observar claramente la presencia de las semillas, aunque también en este caso con el transcurso del tiempo el filamento se observó

más denso y cubrió la placa al grado de que sólo algunas semillas pudieron observarse. Para estos aislados, las semillas no presentaron cambios morfológicos importantes (figura 44).

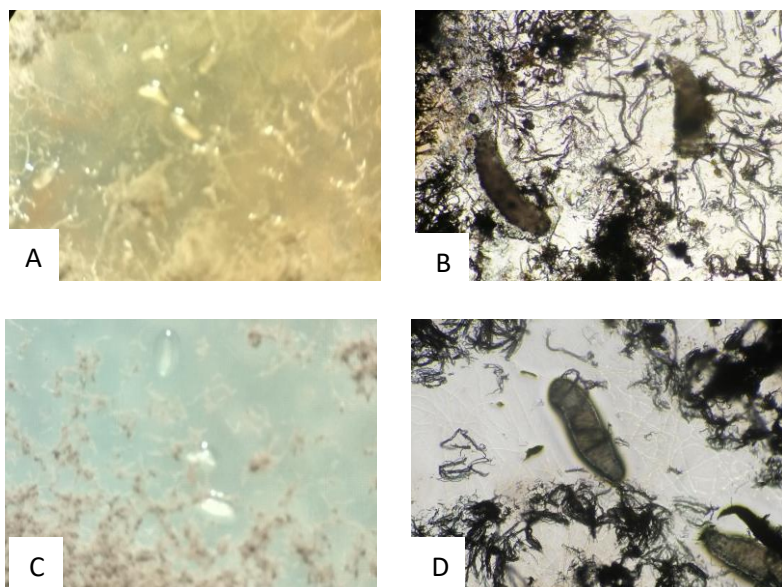


Figura 44. Germinación simbiótica para semillas de *B. verrucosa* en presencia de aislados con crecimiento denso. Se muestran las semillas en presencia de los aislados STF62 (A y B) y (C y D). Las imágenes en A y C fueron corresponden al objetivo 5X diez días posinoculación. Las fotos en B y D fueron tomadas con el objetivo 20X, 155 días después de la inoculación. El crecimiento de los hongos no fue denso y permitió ver algunas semillas.

Por otra parte, los aislados STF524, STF624, STF664 y STF860 presentaron un micelio abundante en las condiciones de crecimiento para los ensayos de germinación simbiótica. Las características macroscópicas de estos aislados permitieron monitorear a las semillas durante la mayor parte del ensayo, aunque al finalizar el experimento el micelio fúngico fue muy abundante y no se pudieron observar claramente el estado de desarrollo de las semillas sobretodo la presencia o ausencia de los rizoides (Figura 45). A pesar de que los aislados STF526 y STF864 presentaron características fenotípicas que permitieron la observación de las semillas, el efecto en la germinación no incluyó cambios secundarios en las mismas.

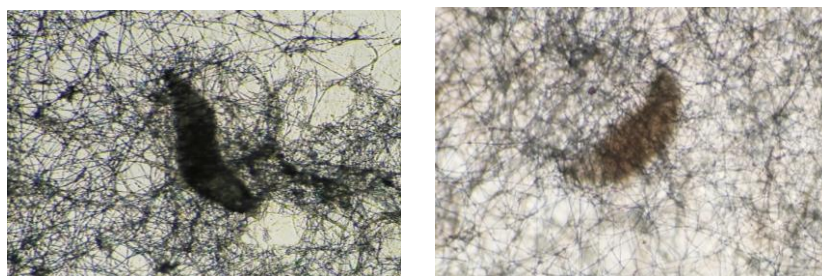


Figura 45. *B. verrucosa* en ensayos de germinación en presencia de hongos con crecimiento abundante. Las imágenes corresponden al aislado STF524 (A) y STF860 (B) registrados con el objetivo 20X, 155 días después de la inoculación.

Finalmente, los aislados STF538, STF673, STF753 y STF757 permitieron la observación de las semillas durante todo el experimento, los cuales además presentaron un efecto positivo sobre la germinación, ya que las semillas crecidas en presencia de estos aislados mostraron estados más avanzados de germinación, los cuales variaron desde cero hasta el dos e incluyeron la ruptura de la testa (figura 46C) y el desarrollo de rizoides (figura 46 A, B y D).

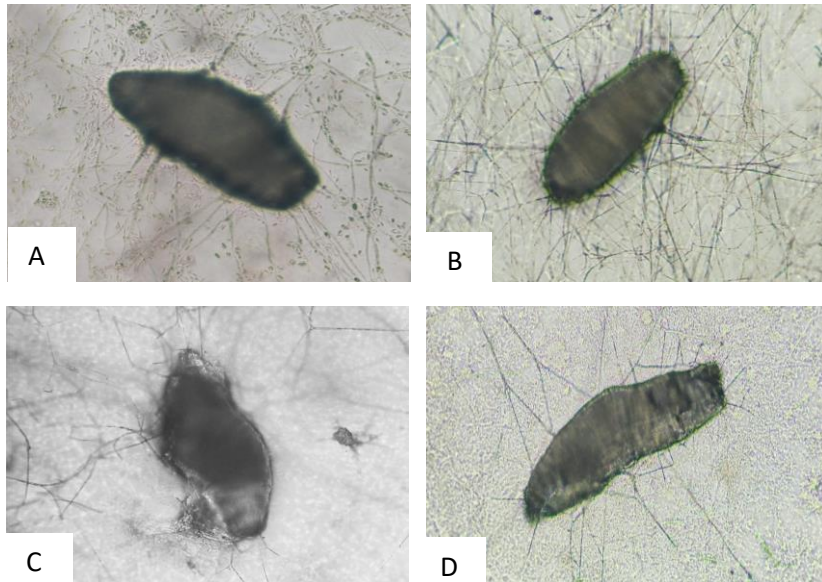


Figura 46. Germinación simbiótica de semillas en medio OMA. Se muestran las semillas en presencia de los aislados STF538 (A), STF673 (B), STF753 (C) y STF757 (D). En estas semillas se observaron cambios morfológicos en las semillas que incluyeron la ruptura de testa y aparición de rizoides.

Estos resultados indican que los aislados productores de giberelinas STF538, STF673, STF753 y STF757 parecen tener un efecto positivo acelerando el proceso de germinación en semillas de orquídea. Si bien el efecto observado no se puede asociar de manera directa a la producción de giberelinas, es interesante confirmar que además de la producción del metabolito secundario, algunos de los aislados fúngicos pudieran tener un efecto positivo sobre la germinación de las semillas de orquídea.

6. Discusión

6.1 Aislamiento de hongos asociados a *S. tigrina*

En este trabajo se recuperó un total de 891 aislados fúngicos utilizando un enfoque cultivo-dependiente para aislar hongos epífitos y endófitos presentes en tejidos de la orquídea *S. tigrina*, lo que reveló la riqueza de la comunidad fúngica presente en las plantas. Los estudios actuales de hongos asociados a orquídeas se centran principalmente en micorrizas (Kristiansen et al., 2001; Yamato et al., 2005; Huang et al., 2014; Oliveira et al., 2014) y hongos endófitos asociados con raíces y hojas (Chen et al., 2010; Chutima et al., 2011; Tan et al., 2012), dejando de lado el estudio de hongos presentes en otros tejidos y a los hongos epífitos. Esta población que poco se ha estudiado ha demostrado ser determinante para la salud y la protección de las plantas (Andrews y Harris 2000, Santamaria y Bayman 2005, Rodriguez et al., 2009) además de contribuir a la diversidad microbiana (Huang et al., 2008; Kharwar et al., 2010).

En este estudio se aislaron e identificaron hongos presentes en hoja, pseudobulbo, raíz y flor, así como en la rizósfera asociada a la orquídea con el fin de detectar la mayor población de hongos cultivables asociada con *S. tigrina*. Como era de esperar, se obtuvo un mayor número de aislados epífitos que de endófitos en todos los tejidos investigados, lo que podría indicar que la población microbiana dentro de la planta tal vez esté controlada por diferentes mecanismos, incluidas las interacciones microbianas, la funcionalidad de la barrera protectora que constituye la pared vegetal y el entorno interno controlado. Este comportamiento coincide con otros trabajos en los que se han aislado poblaciones fúngicas endófitas y epífitas; por ejemplo: Xia y colaboradores (2011) aislaron cepas del género *Trichoderma* en raíces de banana, obteniendo 72 cepas de las cuales 29 fueron endófitas y 43 epífitas; mientras que Osono en 2008, aisló epífitos y endófitos en hojas de *Camellia japonica* y obtuvo un número mayor de especies provenientes de la superficie de la planta (epífitos) que de aquellos que se encontraban en el interior (endófitos). Es importante mencionar que este patrón no siempre se conserva y que la población de microorganismos aislados a partir de una planta puede variar en base a muchos factores dentro de los que se pueden mencionar al hospedero, el tejido, la edad de la planta, la época de toma de muestra, el método de aislamiento y los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de los microorganismos. En esta investigación y bajo las condiciones de trabajo se obtuvo una mayor población de epífitos que de endófitos aislados de las plantas de *S. tigrina*, coincidiendo con otros estudios reportados en la bibliografía.

Por otro lado, para el caso de la rizósfera se esperaba obtener una población mayor a la recuperada, debido a que se sabe que la rizósfera es una zona dinámica y compleja, considerada una de las interfaces más dinámicas en la tierra (Mendes et al., 2013; Philippot et al., 2013). Puesto que las plantas de *S. tigrina* estudiadas no eran de hábito terrestre, es decir que no crecían en el suelo, sino que presentaban hábitos de crecimiento epífito, litófito e inclusive crecían sobre sustrato (fibra de coco y tierra), las condiciones en las que se encontraban los microorganismos eran particulares, lo cual pudo haber influido en el número de aislados recuperados.

Es importante mencionar que en este estudio se incluyeron plantas con diferentes hábitos de crecimiento que se encontraban en el mismo hábitat. En la literatura los estudios con este enfoque son escasos por no decir nulos, de manera que los resultados obtenidos en este trabajo ofrecen una idea de la importancia y diferencia que pudiera existir entre los hábitos de crecimiento de las plantas y las interacciones que establecen con los microorganismos que se encuentran en su medio ambiente. Por otra parte, ya que este estudio es el primero que se ocupa de los hongos cultivables aislados de *S. tigrina* se considera que la información obtenida es valiosa y que abre una posibilidad para el empleo de los hongos aislados e identificados en diferentes aplicaciones que puedan ser

potencialmente valiosas para rescatar en el futuro a esta especie que se encuentra en estado de amenaza.

6.2 Identificación y distribución de géneros fúngicos en *S. tigrina*

Durante el desarrollo del proyecto se obtuvieron 891 aislados, de los cuales 634 fueron filamentosos y el resto crecieron con aspecto levaduriforme. Para el caso de la identificación de los aislados filamentosos se empleó una combinación de técnicas fenotípicas y moleculares que permitieran identificar la mayor población fúngica posible. De acuerdo con las características macroscópicas y microscópicas de los aislados, se identificaron de manera fenotípica diversos géneros principalmente al comparar las estructuras de reproducción desarrolladas empleando la técnica del microcultivo con la bibliografía empleada como referencia. Desafortunadamente el 40% de los aislados no esporularon en los medios utilizados incluso al aplicar diferentes condiciones de temperatura, tiempo de incubación y fotoperíodos. Este comportamiento ya ha sido reportado y se ha observado que los aislados fúngicos recuperados de plantas en ocasiones no son capaces de esporular en condiciones de laboratorio (Arnold et al., 2000; Gamboa y Bayman, 2001; Wang et al., 2005; Huang, 2008). Ante este comportamiento, la población fue agrupada en diferentes morfogrúpos de acuerdo con sus características macroscópicas (tipo de filamento, color, pigmentación al medio) y microscópicas.

Los morfogrúpos en los que se dividió la población fueron posteriormente identificados genotípicamente, con lo que se estableció que la población fúngica total estaba conformada por 63 géneros. De estos 63 géneros fúngicos, 30 ya han sido reportados como endófitos de orquídeas (McCormick et al., 2004; Albores et al., 2005; Chen et al., 2011; Jiang et al., 2011; Sudheep y Sridhar, 2012; Sawmya et al., 2013; Tao et al., 2013); tal es el caso de *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bionectra*, *Chaetomium*, *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Cochilobolus* y *Fusarium*. Aunque el papel de estos géneros en las orquídeas ha sido poco abordado, existen trabajos que han relacionado la presencia de estos hongos con algunos efectos benéficos; por ejemplo, aislados de *Alternaria* sp y *Fusarium oxysporum* en orquídeas en Brasil mostraron inhibición de *Escherichia coli* (Vaz et al., 2009); también la aparición de posibles hongos productores de toxinas, como *Aspergillus flavus* y *A. ochraceus* en *Bulbophyllum neilgherrense* y *Vanda testacea* ha sido relacionada con la probable función de proteger estas orquídeas de herbívoros; mientras que la presencia de *Paecilomyces* sp en tallos de *Vanda* parece servir como hongo con potencial entomopatógeno (Sudheep y Sridhar, 2012).

Además de estos, se encontraron varios géneros que no han sido asociados con las orquídeas, por ejemplo: *Aplosporella*, *Microsporium*, *Mucor*, *Trichophyton*, *Diplodia*, *Fonsecae* y *Scedosporium*. Varios de estos géneros se han encontrado asociados con otros hospederos generalmente como endófitos, patógenos o patógenos latentes (Meletiadis et al., 2002; Becker, 2003; Burgess et al., 2004; Prusky et al., 2004; Cortez et al., 2008; Lazzizzera et al., 2008; Leelasuphakul et al., 2008; Slippers et al., 2009; Twizeyimana et al., 2013; Dreaden et al., 2014; Taylor et al., 2009; Dou et al., 2017). *Microsporium*, *Mucor* y *Trichophyton* han sido aislados del suelo (Mari et al., 2000; Deshmukh, 2003; Moallaei et al., 2006; Munguía-Peréz et al., 2011), *Fonsecae* ha sido aislado a partir de diferentes muestras tales como espinas de *Mimosa púbrica*, troncos podridos y restos vegetales (Salgado et al., 2004; Marques et al., 2006). Curiosamente, algunos de estos géneros han sido reportados como productores de metabolitos secundarios (Malonek et al., 2005; Bi et al., 2013).

En este estudio, los aislados se recuperaron de plantas sanas de *S. tigrina* y muchos de ellos han sido reportados como endófitos de orquídeas, por lo que se podría pensar que son endófitos y epífitos verdaderos de la orquídea *Stanhopea tigrina*. Es importante recalcar que el hecho de encontrar una buena diversidad de géneros asociados a *S. tigrina* puede tener implicaciones en la salud de la

orquídea, puesto que la presencia de los hongos asociados a las plantas tiene fuertes efectos ecológicos, afectan la composición de la comunidad y la diversidad de microorganismos asociados (Omecini et al., 2001), así como la salud y la evolución de las plantas (Brundrett, 2006). Sin embargo, es importante recordar que los cambios ambientales pueden causar que un endófito pueda pasar de ser benéfico o neutral a patógeno (Moricca y Ragazzi, 2008; Alvarez-Loayza et al., 2011).

6.2.1 Géneros fúngicos que conforman la población endófito y epífita en *S. tigrina*

Además de observar la riqueza de géneros identificados en la orquídea, se analizó la distribución de los géneros según el lugar de aislamiento (epífitos o endófitos) y se observó que la población epífita tuvo una mayor diversidad de géneros que la endófito. Se identificaron 25 géneros asociados a ambas poblaciones. Los géneros con más distribución en ambas poblaciones fueron *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* mientras que *Trichoderma* tuvo una mayor distribución en la población epífita, *Fusarium* fue el género con mayor distribución en la comunidad endófito. Estos géneros se han relacionado con diferentes funciones en las plantas; el género *Trichoderma* contiene hongos con aplicaciones en la producción de enzimas para la degradación de la pared celular, además de contener especies utilizadas como agentes de biocontrol (Naher et al., 2014; Schmoll et al., 2016). Los aislados de *Fusarium* han sido descritos como productores de metabolitos secundarios tales como las fitohormonas giberelinas (O'Donnell et al., 1998; Malonek et al., 2005) y se ha observado que los aislados no patógenos de *F. oxysporum* protegen a las plantas de aislados patógenos de *F. oxysporum* (Minerdi et al., 2011). Por otro lado las especies del género *Penicillium* se han descrito como potentes hongos que promueven el crecimiento de las plantas y secretan hormonas vegetales, como el ácido indol-3-acético (AIA) y las GAs (Khan et al., 2011b; Radhakrishnan, Shim et al., 2013). Algunas especies de *Penicillium* son conocidas por su actividad antagonista contra patógenos al producir antibióticos e inducir resistencia activando múltiples señales de defensa en las plantas (Hossain et al., 2007). El género *Aspergillus* comprende un grupo diverso de especies con importante impacto en biotecnología, en la producción de alimentos y en la salud humana (Samson et al., 2014), siendo hongos productores de una gran variedad de metabolitos secundarios; por ejemplo, el antibiótico penicilina es producido por *A. nidulus* (Inglis et al., 2013), *A. flavus* produce muchos metabolitos secundarios incluyendo aflatoxinas, compuestos naturales que causan aflatoxicosis e inducen cáncer en mamíferos, además de ser un patógeno oportunista de muchos cultivos incluyendo el maíz, algodón, cacahuates y nueces de árbol (Yu et al., 2005).

Algunos otros géneros presentes en ambas poblaciones incluyeron *Paecilomyces*, *Scedosporium*, *Cladosporium* e *Hypoxylon*. En el caso del género *Paecilomyces*, *P. lilacinum* es considerado como un hongo antiparasitario nematófago, activo contra el nemátodo del nudo de la raíz *Meloidogyne incognita* y varias otras especies de nemátodos (Kiewnick y Sikora, 2006). Por otra parte, el género *Scedosporium*, que es un género ubicuo presente en el suelo, las aguas residuales y el agua contaminada, se ha descrito como agente causante de un amplio espectro de enfermedades clínicas conocidas como Scedosporiosis (Cortez et al., 2008). *Cladosporium* es un género ampliamente distribuido que se presenta en todo tipo de materiales, desde el suelo hasta las plantas, alimentos, pinturas, textiles y aire, incluso se encuentra causando infecciones humanas (Bensch et al., 2015); muchas de sus especies son biotrofas y a menudo hospedero-específicas, las cuales causan manchas típicas en las hojas, decoloraciones, necrosis o síntomas de agujeros en las hojas vivas o senescentes (Bensch et al., 2012). El género *Hypoxylon* pertenece a la familia Xylariaceae, presenta una etapa endófito en su ciclo de vida y produce varios metabolitos secundarios con actividades interesantes que incluyen el inhibidor de la topoisomerasa 1 denominado hipoxielerona (Piettre et al., 2002) y los agentes antiparasitarios conocidos como ácidos nodulispóricos (Bills et al., 2012), entre otros.

También se encontraron 31 géneros exclusivamente epífitos y aunque no se ha estudiado profundamente el efecto de los epífitos en las plantas, se propone que juegan un papel importante en la salud y la protección de éstas (Santamaria y Bayman 2005, Rodríguez et al., 2009), además de ser fuente potencial de un sin número de metabolitos secundarios. Dentro de los géneros epífitos más frecuentes se encuentran *Aplosporella*, *Neopestalotiopsis* y *Verticillium*. En la población endófito se identificaron seis géneros exclusivamente endófitos, incluyendo *Alternaria* y *Phaeosphaeriopsis*. Para el caso de *Alternaria*, la mayoría de sus especies son saprófitas pero también contiene varias especies fitopatógenas que causan manchas foliares y roya en muchos cultivos agrícolas de importancia económica (Chou y Wu, 2002); mientras que *Phaeosphaeriopsis* ha sido reportado como agente causal de manchas foliares y necrosis en *Ruscus* (Golzar y Wang, 2012) y *Yucca recurvifolia* (Lee et al., 2005).

6.2.2 Distribución de la población fúngica en los diferentes tejidos de *S. tigrina*

En cuanto a la distribución de géneros, se encuentra que la rizósfera fue el tejido con mayor diversidad, mientras que la raíz fue el tejido que presentó la mayor diversidad de géneros endófitos, de acuerdo con las interacciones microbianas significativas que ocurren en estos tejidos vegetales y con reportes previos (Vendramin et al., 2010; Sudheep y Sridhar, 2012; Bunch et al., 2013; Chen et al., 2013). Sin embargo, también se encontraron que otros tejidos como la hoja mostraron una diversidad considerable tanto en aislados epífitos como en endófitos, lo que apoya la idea de que incluso cuando la mayoría de los estudios se han centrado en la identificación de hongos endófitos asociados con tejidos como raíces, sería interesante analizar la microbiota presente en otros tejidos vegetales. Además, se encontró una mayor cantidad de aislados y por lo tanto abundancia de géneros en la población epífita en comparación con la comunidad endófito, que corresponde al grupo de hongos más estudiados. De acuerdo con las observaciones realizadas, se cree que sería relevante examinar las poblaciones de hongos endófitos y epífitos asociados a las orquídeas para considerar plenamente la gran riqueza microbiológica asociada a estas plantas. La aparente capacidad que presentó *S. tigrina* para relacionarse con muchos socios fúngicos podría representar una ventaja biológica y de supervivencia para esta orquídea (Otero et al., 2004).

6.2.2.1 Hoja

Es frecuente encontrar reportes en los cuales la población fúngica asociada a la hoja de la orquídea es mayor a la de otros tejidos; por ejemplo, Yuan y colaboradores (2009) encontraron tasas de colonización altas de endófitos fúngicos en tejidos foliares al compararlos con otros órganos de la orquídea epífita *Dendrobium nobile*. Por otro lado, en el trabajo de Sawmya y colaboradores (2013) se presenta la misma tendencia con tasas mayores de colonización de hongos endófitos en tejidos de hojas que en cualquier otro tejido de las orquídeas *Bulbophyllum neilgherrense* y *Pholidota pallida*, en este trabajo la hoja resultó ser uno de los tejidos con mayor número de géneros endófitos asociados respecto a los demás tejidos utilizados.

En cuanto a la abundancia de géneros, se identificaron 42 géneros asociados, de los que veintidos ya han sido asociados a diferentes géneros de orquídeas, en el caso de *Chaetomium* se ha encontrado en orquídeas del género *Dendrobium*, *Grammatophyllum* y *Pholidota* (Chen et al., 2011; Salifah et al., 2011, Sawmya et al., 2013). Por otro lado, el género *Penicillium* se ha identificado en hojas de las orquídeas *Bulbophyllum neilgherrense* y *Pholidota pallida* (Yuan et al., 2009, Sawmya et al., 2013).

Los géneros *Acremonium*, *Fusarium* (Vujanovic *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2012; Behera *et al.*, 2015), *Verticillium* (Chen *et al.*, 2011) y *Trichoderma* (Sawmya *et al.*, 2013), también han sido reportados asociados a orquídeas, mientras que el género *Geotrichum* se ha asociado a la orquídea epífita *Grammatophyllum* (Salifah *et al.*, 2011). En este sentido, la mayoría de los géneros hasta ahora identificados en las hojas de la orquídea *Stanhopea tigrina* ya se han descrito para otras especies de orquídeas, lo que podría sugerirnos una amplia distribución de estos géneros en la familia Orchidaceae.

En cuanto a los géneros que no han sido reportados asociados a las orquídeas se encuentra *Aplosporella*, *Diplodia*, y *Mucor* los cuales se identificaron en la población epífita. Recordando que la mayoría de la información disponible corresponde a hongos asociados de manera endófito a orquídeas, se puede decir que la población epífita ha sido poco explorada, por lo que su distribución en la familia orchidaceae, al menos como epífitos es desconocida.

6.2.2.2 Pseudobulbo

La mayoría de los géneros identificados en los pseudobulbos de *Stanhopea tigrina* fueron encontrados también en hojas a excepción de *Epichloe*, *Exophiala*, *Phialemonium*, *Pseudobotrytis*, *Roussoella* y *Umbelopsis* que no se aislaron en hojas y que en pseudobulbo fueron identificados como géneros epífitos. Cuando se comparó la población encontrada con lo reportado en la literatura se hallaron muy pocos estudios que exploraran la población fúngica en pseudobulbos de orquídeas, por lo que los resultados obtenidos se compararon con estudios relacionados con otros de los tejidos más estudiados en orquídeas, como la hoja y la raíz.

Treinta y cinco géneros fueron identificados en este tejido algunos de los cuales ya se han reportado asociados a otras orquídeas. *Arthrinium* ha sido aislado de semillas y raíces de *Dendrobium nobile* (Chen *et al.*, 2012), el género *Exophiala* ha sido recuperado esporádicamente de raíces de la orquídea terrestre *Himantoglossum adriaticum* (Pecoraro *et al.*, 2013) y encontrado en las orquídeas *Grammatophyllum* y *Thelymitra benthamiana* (Chen *et al.*, 2011; Sommer *et al.*, 2012), *Chaetomium* en *Grammatophyllum* (Salifah *et al.*, 2011). *Mucor* y *Fonsecae* son descritos como patógenos generalmente oportunistas de humanos (Summerbell *et al.*, 2006) que no han sido reportados asociados a orquídeas, en este estudio se encontraron en su mayoría asociados a aislados epífitos, aunque también fueron encontrados como endófitos en baja frecuencia.

6.2.2.3 Raíz

Los géneros identificados en las raíces de *S. tigrina* fueron similares a los encontrados en las hojas y pseudobulbo de esta orquídea, Bayman *et al.* en 1997 reportaron un comportamiento similar en aislados fúngicos de orquídeas del género *Lepanthes*. Dentro de los géneros que se identificaron *Arthrinium*, *Aspergillus* y *Cladosporium* ya se han reportado asociados a raíces, hojas y tallos de varias especies de orquídeas (Chen *et al.*, 2011; Ovando *et al.*, 2005; Sommer *et al.*, 2012). También se han identificado aislados del género *Curvularia* en las raíces de la orquídea epífita *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz *et al.*, 2013) y en raíces de la orquídea *Grammatophyllum* (Salifah *et al.*, 2011). En el caso del género *Alternaria* se ha reportado como género endófito de raíces de la orquídea *Spiranthes spiralis* (Tondello *et al.*, 2012), también se ha reportado asociado a las orquídeas *Dendrobium* (Chen *et al.*, 2011) y *Holcoglossum* (Tan *et al.*, 2012); *Curvularia* y *Alternaria*, además de reportarse como endófitos para algunas orquídeas (Tondello *et al.*, 2012; Vujanovic *et al.*, 2000; Ávila-Díaz *et al.*, 2013) también se han reportado como patógenos en la familia Orchidaceae (Yadav, 2010; Štěředa *et al.*, 2013); este comportamiento se observa a menudo en los microorganismos asociados a plantas, ya que mientras un género fúngico puede beneficiar o no dañar a determinada especie vegetal, este mismo

hongo puede ser patógeno para otra especie vegetal del mismo género, al grado de que la interacción planta-hongo se vuelve especie-específica. Debido a que los aislados en este trabajo fueron obtenidos de tejido aparentemente sano, se puede pensar que los géneros *Curvularia* y *Aternaria* no son fitopatógenos en la orquídea *Stanhopea tigrina*.

6.2.2.4 Flor

La flor fue el tejido que presentó menor número de géneros asociados, sin embargo es importante mencionar la diferencia de muestras con respecto al resto de los tejidos, pues sólo se utilizó una muestra, mientras que para los demás tejidos y la rizósfera se utilizaron seis muestras. Se identificaron diez géneros asociados, de los cuales *Fonsecae* no se ha encontrado asociado a orquídeas, pero sí se ha reportado su presencia en plantas de *Mimosa pudica* (Salgado et al., 2010). Por otro lado, *Paecilomyces* ha sido aislado de la orquídea *Epipogium aphyllum* (Roy et al., 2009) y en la orquídea *Vanda testacea*, donde también se relaciona como entomopatógeno (Sudheep and Sridhar, 2012), el género *Mucor* se ha identificado en la orquídea *Cymbidium* (Sen et al., 2006), mientras que *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* y *Verticillium* se han encontrado asociados a diferentes plantas (Vujanovic et al., 2000; Chen et al., 2011), dentro de las que se encuentran varios géneros de orquídeas (Salifah et al., 2011; Ovando et al., 2009; Sudheep y Sridhar, 2012).

Este tejido en orquídeas prácticamente no se ha utilizado para identificar el microbioma asociado, sin embargo y como se pudo constatar, en este trabajo, es una fuente rica en microorganismos. Ya que aun cuando se trabajó sólo con un tejido obtuvimos un buen número de hongos asociados, dentro de los cuales se identificaron diez géneros.

6.2.2.5 Rizósfera

Además de los tejidos se exploró la riqueza fúngica presente en la rizósfera asociada a las plantas. Si bien la rizósfera ha sido definida como un elemento rico en nutrientes (De Boer et al., 2006) y por lo tanto con una actividad microbiológica elevada (Mendes et al., 2013) que cuenta con una riqueza importante de microorganismos dentro de ellos los hongos, no existen reportes enfocados en el estudio microbiológico de la rizósfera asociada a orquídeas. La falta de estudios en este rubro puede tener relación con el estilo de vida de esta familia, pues además de crecer en suelo usan otros sustratos para crecer (árboles y rocas).

De los treinta y tres géneros que se identificaron en la población asociada a rizósfera diecisiete se han reportado asociados a orquídeas estos incluyen a los géneros *Acremonium* reportado en *Dendrobium* (Chen et al., 2011); *Aspergillus* en *Cattleya* (Ovando et al., 2005); *Cladophialophora*, *Exophiala*, y *Nectria* en *Corybas*, *Pyrorchis*, *Spiculaea*, *Thelymitra*, *Disa* y *Diuris* (Sommer et al., 2012); *Cladosporium* en *Holcoglossum* (Tan et al., 2012); *Fusarium* en *Acampe* (Behera et al., 2013); *Gibberella* en *Bletilla ochracea* (Tao et al., 2008); *Paecilomyces* en *Epipogium aphyllum* (Roy et al., 2009). Los géneros no relacionados con orquídeas incluyen a *Aplosporella*, *Diplodia*, *Fonsecae*, *Microsporium*, *Mucor* y *Scedosporium*, algunos de estos géneros se han relacionado con otras plantas *Aplosporella* ha sido reportado como epífita de *Eucalyptus gomphocephala* (Taylor et al., 2009),

Mucor además de describirse como patógeno es considerado un hongo de suelo (Werner y Zadworny, 2003).

6.3 Especificidad de géneros en *S. tigrina*

Hasta donde se sabe, la mayoría de los reportes existentes relacionados con el microbioma en orquídeas están generalmente orientados a un grupo particular de hongos o a un tejido vegetal restringido y existen pocos estudios con una descripción que comprenda los diferentes tejidos de una orquídea. En este trabajo, se incluyeron todos los tejidos de la planta para analizar la posible especificidad entre géneros de hongos y tejidos particulares. Curiosamente, se encuentra cierta tendencia en la población epífita, dado que *Cochliobolus*, *Diplodia*, *Elaphocordyceps*, *Eutypa*, *Giberella*, *Hypocrea*, *Nigrograna*, *Phoma*, *Schizophyllum* y *Thyridaria* se encontraron sólo en la hoja, *Phialemonium*, *Pseudobotrytis* y *Rousella* fueron encontrados exclusivamente en pseudobulbo, *Bionectria*, *Cladophialophora*, *Microsporium*, *Phialemoniopsis*, *Pyrenochaeta* y *Talaromyces* asociados a la rizósfera. Mientras que para la población endófito se encontró a *Chaetomiu*, *Eutypella*, *Geotrichum*, *Hypoxylon*, *Mucor*, *Pestalotiopsis* y *Phaeosphaeriopsis* exclusivamente en la hoja, a *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Letendraea*, *Nectria* y *Phialemoniopsis* en el pseudobulbo. *Alternaria*, *Bionectria*, *Daldina*, *Macropoma*, *Phialemonium*, *Pyrenochaeta* y *Xylariaceae* en raíz. Sin embargo y aun cuando algunos de los géneros son más prevalentes en un tejido en particular, no se observó una especificidad completa, es decir no hubo algún género que estuviera presente únicamente en un tejido como endófito y epífita. Estas observaciones contrastan con otro estudio en el que no se encontró una evidente especificidad de tejido para los géneros identificados en raíces y hojas cuando se comparó la comunidad fúngica presente en dos orquídeas (Sawmya et al., 2013). La diferencia entre los dos estudios podría surgir a partir de varios factores dentro de los que el número de tejidos e individuos muestreados en cada caso, el lugar de toma de muestra, la estación del año, podrían estar relacionados.

6.4 Distribución de géneros según el hábito de crecimiento en las plantas

Teniendo en consideración la capacidad de *S. tigrina* para crecer en diferentes sustratos, surge la pregunta de si los diferentes hábitos de crecimiento de las plantas podrían influir en la población fúngica presente en la orquídea y en los resultados se ve que las plantas que crecían como epífitas y las cultivadas en sustrato mostraron la mayor diversidad de hongos, siendo la orquídea litófito la que mostró la menor diversidad. Este comportamiento se observó tanto en la población epífita como en la endófito. Las diferencias en la población podrían estar relacionadas con las características nutricionales del sustrato donde la planta crece, lo que probablemente proporcione un microambiente particular, incluso cuando las plantas crecen en el mismo ecosistema. Otro factor relacionado podría ser la riqueza microbiana presente en cada sustrato y que por lo tanto estarán en contacto con las plantas, alterando tanto la interacción benéfica como la competencia entre los microorganismos. En general, las observaciones establecen una clara influencia del hábito de crecimiento de la orquídea sobre la población microbiana en *S. tigrina*, lo cual probablemente influya en el desarrollo y la supervivencia de las especies de hongos, incluso si coexisten en el mismo hábitat. Finalmente, se observa al género *Eutypella* asociado únicamente a plantas de hábito epífita y a *Nectria*, *Phialemoniopsis* y *Phialemonium* asociados a plantas creciendo únicamente en sustrato. Sin embargo, esta especificidad fue baja al compararla con todo los géneros identificados, lo que confirma que la capacidad de esta orquídea para relacionarse con diferentes especies de hongos es

independiente de las condiciones particulares del sustrato en el que la planta crece, dicha capacidad puede proveer a la orquídea de una ventaja durante el periodo de adaptación al medio.

6.5 Producción de giberelinas

En la búsqueda de posibles alternativas para revertir el estado de amenaza de *S. tigrina*, se probó la capacidad de los aislados fúngicos de producir giberelinas. Se sabe que los microorganismos que producen metabolitos secundarios como las fitohormonas podrían ayudar a las plantas a adaptarse a diferentes ambientes, como ambientes hostiles (Bourgaud et al., 2001; Nadeem et al., 2014; Nair and Padmavathy., 2014; Fahad et al., 2015). En este trabajo, se probó la capacidad de los aislados de producir giberelinas, fitohormonas que se han asociado con varios procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo el desarrollo embrionario, la inducción de la germinación de las semillas, el desarrollo de las raíces, la expansión de las hojas, el alargamiento del tallo, la floración, el desarrollo de semillas, el desarrollo de tricomas y la maduración del polen (Achard and Genschik, 2009; Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006; Ogawa et al., 2003; Bilkay et al., 2010; Pattanaik et al., 2014; Plackett et al., 2011), estos beneficios podrían ser útiles para mejorar la adaptación de *S. tigrina* a diferentes hábitats, particularmente en etapas tempranas.

En este estudio, se identificaron 21 aislados productores de giberelinas, los cuales produjeron GAs en rendimientos adecuados según las concentraciones que han mostrado actividad biológica en diferentes plantas (Hamayun et al., 2009; Hamayun et al., 2010b; Khan et al., 2011c; Waqas et al., 2012), lo que sugiere que estos aislados podrían tener potencialmente un efecto biológico positivo para *S. tigrina*. Cuando se identificaron genótipicamente, se asociaron a diferentes géneros dentro de los que *Arthrinum* y *Penicillium*, ya han sido reportados como productores de giberelinas (Mitter et al., 2002; Kawaide, 2006; Bhalla et al., 2010; Leitão y Enguita, 2016), además se ha observado que la asociación de hongos productores de giberelinas con sus plantas hospederas pueden mejorar el crecimiento de las plantas y ayudar a las plantas a contrarrestar diferentes estreses abióticos (Hamayun et al., 2010a, Khan et al., 2011a, 2011b, Khan et al., 2015b). Por otra parte se reporta por primera vez que aislados de los géneros *Bionectria*, *Diplodia*, *Macrophoma*, *Nectria*, *Neopestalotiopsis*, *Talaromyces*, *Trichoderma* y *Xylariales* son capaces de producir giberelinas biológicamente activas en concentraciones suficientes para ser detectadas por el método de HPLC. No obstante, las implicaciones biológicas de la producción de giberelinas en estos hongos así como los efectos que puedan tener los aislados en *S. tigrina* es algo que necesita ser elucidado.

6.6 Germinación de semillas *Brassia Verrucosa*

6.6.1 Germinación asimbiótica de *B. verrucosa*

Según lo reportado en la literatura los porcentajes de germinación para orquídeas epífitas sobre un medio asimbiótico son mayores al 50% (Arditti, 1992), y se ha encontrado que el rango de germinación in vitro de las orquídeas está entre siete y 235 días después de haberlas colocado en un medio de cultivo, mientras que la obtención de plántulas tarda entre 50 y 724 días (Arditti, 1992). Ensayos de germinación in vitro con *Laelia albida* reportan la aparición de plántulas con pelos radiculares después de 106 días de incubación (Santos-Hernández et al., 2005), mientras que en *Cyrtopodium punctatum* la germinación se reportó pasados 8 semanas de incubación (Dutra, et al., 2009). En *Brassia Verrucosa* se ha reportado la germinación de semillas in vitro en medio de cultivo

Murashige y Skoog adicionado con mio-inositol, glicina y sacarosa (Flores-Escobar et al., 2011), sin embargo, en nuestro estudio se pudo observar la falta de germinación de las semillas de *Brassia verrucosa* pasando 150 días. Es importante destacar que la germinación de semillas de orquídeas es difícil (Arditti, 1979), pues tienen requerimientos específicos de nutrientes y necesitan de condiciones ambientales idóneas (Vujanovic et al., 2000), por lo que el éxito de la germinación en las semillas se encuentra afectado por un gran número de elementos dentro de los que las características de las semillas juegan un papel importante. Además en este estudio se utilizaron semillas provenientes de cápsulas inmaduras lo que probablemente, junto con otros factores, influyó en el resultado obtenido. Durante el desarrollo del ensayo se utilizaron medios de cultivo adicionados con diferentes concentraciones de ácido giberélico (5, 10 y 15 μm), fitohormonas relacionadas con efectos benéficos o inhibitorios en la germinación de orquídeas (Hadley and Harvais, 1968; Pedroza-Manrique et al., 2005; Pierce & Cerabolini, 2011). En este experimento se observó la falta de germinación tanto en medio de cultivo adicionados con giberelinas como en aquellos utilizados como controles negativos, medios de cultivo a los que no se les adiciono esta fitohormona, lo que hace suponer que las giberelinas no tuvieron un efecto directo en la inhibición de la germinación pero tampoco pudieron ayudar a romper la dormancia de las semillas. Esta dormancia se ha relacionado con algunos cambios indefinidos durante el desarrollo y maduración de la semilla, algunos de los cuales se han relacionado con la acumulación de sustancias inhibitorias como son compuestos fenólicos en *Cymbidium goeringii* (Yamazaki & Miyoshi, 2006), ácido abscísico en *Dactylorhiza maculata* y *Epipactis helleborine* (van der Kinderen, 1987), la inducción de un estado fisiológicamente dormido en embriones (Arditti et al., 1982a), o el aumento de la impermeabilidad de los embriones durante la maduración de la semilla (Miyoshi y Mii, 1988; Yamazaki and Miyoshi, 2006).

6.6.2 Germinación simbiótica de *B. verrucosa*

La germinación simbiótica *in vitro* resulta ser una herramienta útil en el rescate de especies en peligro, algunas de las ventajas que presenta el uso de la germinación simbiótica *in vitro* es el uso de medios de cultivo simples y el que las plantas micorrizadas suelen ser más fuertes y resistentes a infecciones que sus contrapartes cultivadas asimbióticamente (McKendrick, 2000). En este trabajo experimento de germinación de semillas de *Brassia verrucosa* se observó una ventaja al utilizar la germinación simbiótica respecto a la asimbiótica, pues en esta última las semillas fueron incapaces de germinar mientras que en el caso de las semillas inoculadas con aislados fúngicos se observaron cambios morfológicos que incluyeron la hidratación de las semillas, ruptura de testa y crecimiento de rizoides, parámetros que indicaron el avance de la germinación con algunas de las cepas (STF538, STF673, STF753 y STF757) que presentaron características idóneas para interactuar con la semilla y que a la vez permitieron monitorear el crecimiento.

Además varios estudios comparativos también han mostrado ventajas de la germinación simbiótica sobre la asimbiótica, puesto que los protocormos simbióticos se desarrollaron más rápidamente y las plántulas simbióticas podrían inocular el suelo con hongos benéficos (Johnson et al., 2007; Nontachaiyapoom et al., 2011; Rasmussen et al., 1990). Es importante destacar que sólo se obtuvieron resultados preliminares, al no continuar el monitoreo de las semillas hasta el momento de obtener plántulas, sin embargo estos resultados permitieron conferirle una ventaja al uso de la germinación simbiótica en semillas inmaduras de *Brassia verrucosa* respecto a la germinación asimbiótica, donde no se observaron cambios en las semillas.

El éxito de este tipo de germinación resulta de la correcta elección de un hongo compatible que permita la interacción y germinación de la semilla utilizada, por lo que dicha interacción se ve influenciada por la naturaleza de los interactuantes así como de la relación que establezcan. En este

ensayó de los 21 aislados utilizados únicamente cuatro parecen presentar efectos parcialmente benéficos para la orquídea, mientras que el resto no provocó cambios en las semillas e inclusive algunos de ellos no permitieron la observación de éstas. Uno de los factores más importantes durante el desarrollo de este tipo de experimentos es la elección de un hongo apropiado para dicha interacción. Las orquídeas reclutan hongos micorrízicos en su mayoría de basidiomicetos saprófitos de un complejo heterogéneo y polifilético de hongos de las familias Tulasnellaceae, Ceratobasidiaceae y Sebacinaceae, llamadas colectivamente rizoctonias (Dearnaley et al., 2012), sin embargo, no son las únicas familias reportadas en la germinación de semillas por ejemplo aislados del género *Fusarium*, familia Nectriaceae se han reportado como inductores de germinación y formación de protocormos en la orquídea *Cypripedium reginae* (Vujanovic et al., 2000). En la literatura el estudio de estas interacciones ha permitido documentar casos exitosos de germinación simbiótica en orquídeas de diferente especie dentro de las que se encuentran; *Bipinnula fimbriata* (Steinfort et al., 2010), *Chloraea riojana* (Fracchia et al., 2016), *Corallorhiza trifida* (McKendrick et al., 2012); *Dendrobium pulchellum*, *D. crepidatum*, y *D. findlayanum* (Swangmaneecharern et al., 2012), *Grammatophyllum speciosum* (Nontachaiyapoom et al., 2011), *Habenaria macroceratitis* (Stewart y Kane, 2006), entre muchas otras más.

En general, este estudio muestra nueva información sobre la composición del microbioma asociado a *S. tigrina*, una especie endémica de México que se encuentra en estado de amenaza. Se obtuvieron resultados interesantes relacionados con la composición de las comunidades epifíticas y endofíticas. Su distribución en la planta mostró una gran riqueza fúngica para esta orquídea, lo que le da una ventaja inminente durante el proceso de aclimatación. Además, la descripción del microbioma natural asociado a *S. tigrina* y la capacidad de algunos de los aislados para producir metabolitos secundarios podrían aplicarse en diferentes estrategias biotecnológicas orientadas a aumentar la población de *S. tigrina* en México. Finalmente la implementación de estudios similares para obtener información sobre el microbioma fúngico asociado a otras plantas, incluidas las especies amenazadas, podría ser una herramienta en la búsqueda de estrategias para incrementar estas poblaciones que se encuentran en peligro, además de ser una forma de contribuir en el conocimiento de la diversidad microbiológica, campo en el que hoy por hoy existen muchos enigmas por descubrir.

7. Conclusiones

- La cantidad total de aislados fúngicos asociados a diferentes tejidos de la orquídea *Stanhopea tigrina* fue de 897.
- El microbioma presente en la población muestreada de *S. tigrina* está conformado por 63 géneros
- La mayor diversidad de géneros se encontró en la población de hongos epífitos.
- La abundancia de aislados recuperados depende del hábito de crecimiento de las orquídeas.
- Veintiún aislados fúngicos que se encuentran presentes de manera natural en *S. tigrina* fueron caracterizados como productores de giberelinas.
- Los géneros *Bionectria*, *Diplodia*, *Macrophoma*, *Nectria*, *Neopestalotiopsis*, *Talaromyces*, *Trichoderma* y *Xylariales* fueron identificados por primera vez como productores de giberelinas.
- Los aislados STF538, STF673, STF753 y STF757 tuvieron un efecto positivo en las etapas iniciales del proceso de germinación de semillas de la orquídea *Brassia verrucosa*.

8. Bibliografía

- Adam, G., Wiesenberger, G., & Güldener, U. (2015). Fusarium Mycotoxins and Their Role in Plant–Pathogen Interactions. In *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*, Volume 2 (pp. 199-233). Springer New York.
- Ahmad, N., Hamayun, M., Khan, S. A., Khan, A. L., Lee, I. J., & Shin, D. H. (2010). Gibberellin-producing endophytic fungi isolated from *Monochoria vaginalis*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(12), 1744-1749.
- Arditti J, Michaud JD, Oliva AP. (1982a). Practical germination of North American and related orchids: *Epipactis atrorubens*, *E. gigantea* and *E. helleborine*. *American Orchid Society Bulletin*, 51: 162–171.
- Arditti J. (1979). Aspects of physiology of orchids. *Advances in Botanical Research*, 7:421-655. Academic-Press.
- Arditti, J., & Ghani, A. K. A. (2000). Tansley Review No. 110. *New Phytologist*, 145(3), 367-421.
- Arenas, R. (2008). *Micología Médica Ilustrada*. 3ra edición, Mcgrawn-Hill. P.423.
- Asgari, B., & Zare, R. (2011). The genus *Chaetomium* in Iran, a phylogenetic study including six new species. *Mycologia*, 103(4), 863-882.
- Ávila-Díaz, I., Garibay-Orijel, R., Magaña-Lemus, R. E., & Oyama, K. (2013). Evidencia molecular revela hongos asociados dentro de la orquídea epífita *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. *Botanical Sciences*, 91(4), 523-529.
- Bartholomew, J. W., & Mittwer, T. (1952). THE GRAM STAIN. *Bacteriological Reviews*, 16(1), 1–29.
- Basker, S., & Bai, V. N. (2010). In vitro propagation of an epiphytic and rare orchid *Eria bambusifolia* Lindl. *Research in Biotechnology*, 1(1), 15-20.
- Bayman, P., & Otero, J. T. (2006). Microbial endophytes of orchid roots. In *Microbial root endophytes* (pp. 153-177). Springer Berlin Heidelberg.
- Bayman, P., Lebron, L. L., Tremblay, R. L., & Lodge, D. (1997). Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytologist*, 135(1), 143-149.
- Becker, W. F. (2003). *Nectria pseudotrichia*, como agente causal de cancro de ramos, ocorrendo em pereira japonesa no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 107.
- Behera D., Tayung, K. and Mohapatra, U. B. (2013). PCR-based identification of endophytes from three orchid species collected from Similipal Biosphere Reserve, India. *AJRFANS*, 3(1), 10–17.
- Bhalla, K., Singh, S. B., & Agarwal, R. (2010). Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium* strains. *Environmental monitoring and assessment*, 167(1-4), 515-520.
- Bhattacharya, A., Kourmpetli, S., Ward, D. A., Thomas, S. G., Gong, F., Powers, S. J., ... & Phillips, A. L. (2012). Characterization of the fungal gibberellin desaturase as a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase and its utilization for enhancing plant growth. *Plant physiology*, 160(2), 837-845.

- Bi, J., Ji, Y., Pan, J., Yu, Y., Chen, H., & Zhu, X. (2013). A new taxol-producing fungus (*Pestalotiopsis malicola*) and evidence for taxol as a transient product in the culture. *African Journal of Biotechnology*, 10(34), 6647-6654.
- Bilkay, I. S., Karakoc, S., & Aksoz, N. (2010). Indole-3-acetic acid and gibberellic acid production in *Aspergillus niger*. *Turk J Biol*, 34, 313-318.
- Birch, P. R. J., & S. Kamoun. (2000). Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant-microorganism interactions, p. 77-82. In R. Wood (ed.), *New technologies for life sciences: a trends guide*. Elsevier Science, New York, N.Y.
- Bonfante P, Anca IA (2009) Plants mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 363–383.
- Bulpitt, C.J. (2005). The uses and misuses of orchids in medicine. *QJM: An Intern. J. Medicine* 98: 625-631.
- Bustam, B. M., Dixon, K. W., & Bunn, E. (2014). In vitro propagation of temperate Australian terrestrial orchids: revisiting asymbiotic compared with symbiotic germination. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 176(4), 556-566.
- Candau, Reyes, Javier Avalos, and Enrique Cerdá-Olmedo. "Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*." *Plant physiology* 100.3 (1992): 1184-1188.
- Chase, M. W., Freudenstein, J. V., Cameron, K. M., Barrett, R. L. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. Pp. 69-89 en: Dixon, K. W., S. P. Kell, R. L. Barrett y P. J. Cribb (eds.). *Orchid conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah
- Chen, J., Hu, K. X., Hou, X. Q., & Guo, S. X. (2011). Endophytic fungi assemblages from 10 *Dendrobium* medicinal plants (Orchidaceae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1009-1016.
- Chen, J., Wang, H., & Guo, S. X. (2012). Isolation and identification of endophytic and mycorrhizal fungi from seeds and roots of *Dendrobium* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 22(4), 297-307.
- Crous, P. W., & Groenewald, J. Z. (2013). A phylogenetic re-evaluation of *Arthrinium*. *IMA fungus*, 4(1), 133.
- Damm, U., Fourie, P. H., & Crous, P. W. (2007). *Aplosporella prunicola*, a novel species of anamorphic Botryosphaeriaceae. *Fungal Diversity*, 27, 35-43.
- De Vos, L., Steenkamp, E. T., Martin, S. H., Santana, Q. C., Fourie, G., van der Merwe, N. A., Wingfield, M.J., Wingfield, B. D. (2014). Genome-wide macrosynteny among *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex revealed by amplified fragment length polymorphisms. *PLoS one*, 9(12), e114682.
- Dearnaley, J. D. (2007). Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17(6), 475-486.
- Dendooven, L., Magaña, I. P., & De la Torre, M. (2000). Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors. *Journal of biotechnology*, 76(2), 147-155.

- Dreaden, T. J., Black, A. W., Mullerin, S., & Smith, J. A. (2014). First Report of *Diplodia quercivora* Causing Shoot Dieback and Branch Cankers on Live Oak (*Quercus virginiana*) in the United States. *Journal of Natural Products*, 77, 2352-2360.
- Dutra, D., Johnson, T. R., Kauth, P. J., Stewart, S. L., Kane, M. E., & Richardson, L. (2008). Asymbiotic seed germination, in vitro seedling development, and greenhouse acclimatization of the threatened terrestrial orchid *Bletia purpurea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94(1), 11-21.
- Dutra, D., Kane, M. E., & Richardson, L. (2009). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 96(3), 235-243.
- Ekanayake, P. N., Rabinovich, M., Guthridge, K. M., Spangenberg, G. C., Forster, J. W., & Sawbridge, T. I. (2013). Phylogenomics of fescue grass-derived fungal endophytes based on selected nuclear genes and the mitochondrial gene complement. *BMC evolutionary biology*, 13(1), 270.
- Espejo, A., López-Ferrari, A. R., García-Cruz, J., Jiménez Machorro, R. & Sánchez. (2002). Orquídeas del Estado de Morelos. Orquídea (Méx.). 16: 1-332
- Esteve-Zaroso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 329-337.
- Fahad, S., Hussain, S., Bano, A., Saud, S., Hassan, S., Shan, D., ... & Tabassum, M. A. (2015). Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(7), 4907-4921.
- Flores-Escobar, G., Gil-Vásquez, I., Colinas-León, M. T., & Mata-Rosas, M. (2011). Propagación in vitro de la orquídea *Brassia verrucosa* Bateman ex. Lindl. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(1), 5-8.
- Fracchia, S., Aranda-Rickert, A., Rothen, C., & Sede, S. (2016). Associated fungi, symbiotic germination and in vitro seedling development of the rare Andean terrestrial orchid *Chloraea riojana*. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 224, 106-111.
- Freeman S, Rodriguez RJ. (1993). Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science* 260: 75–78.
- Gavassi, M. A., Fernandes, G. C., Monteiro, C. C., Peres, L. E. P., & Carvalho, R. F. (2014). Seed Germination in Tomato: A Focus on Interaction between Phytochromes and Gibberellins or Abscisic Acid. *American Journal of Plant Sciences*, (14), 2163.
- Gerlach, G. 2010. Stanhopeinae Mesoamericanae, V. El aroma floral de las Stanhopeas de México. *LANKESTERIANA* 9(3): 431-442
- Ghimire, S. R., Charlton, N. D., Bell, J. D., Krishnamurthy, Y. L., & Craven, K. D. (2011). Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. *Fungal Diversity*, 47(1), 19-27.
- Guo, L. D., Hyde, K. D., & Liew, E. C. Y. (2000). Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New phytologist*, 147(3), 617-630.

- Hadley, G., & Harvais, G. (1968). The effect of certain growth substances on asymbiotic germination and development of *Orchis purpurella*. *New Phytologist*, 67(2), 441-445.
- Hągsater, E; M. Soto Arenas, G. Salazar, R. Jiménez, M. López y R. Dressler. (2005). Las Orquídeas de México. Instituto Chinoín, México. pp. 302
- Hamayun, M., Khan, S. A., Khan, M. A., Khan, A. L., Kang, S. M., Kim, S. K., ... & Lee, I. J. (2009). Gibberellin production by pure cultures of a new strain of *Aspergillus fumigatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(10), 1785-1792.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). Trichoderma species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 43-56.
- Hirsch, A.M. (2004). Plant-microbe symbioses: A continuum from commensalism to parasitism. *Symbiosis* 37: 345–363.
- Horton, T. R., & Bruns, T. D. (2001). The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular ecology*, 10(8), 1855-1871.
- Hou, X., Lee, L. Y. C., Xia, K., Yan, Y., & Yu, H. (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Developmental cell*, 19(6), 884-894.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Hyde, K. D., Corke, H., & Sun, M. (2008). Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Divers*, 33(1560-2745), 61-75.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Surveswaran, S., Hyde, K. D., Corke, H., & Sun, M. (2009). Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diversity*, 36, 69.
- Hyde, K. D., & Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers*, 33, 163-173.
- Inglis, D. O., Binkley, J., Skrzypek, M. S., Arnaud, M. B., Cerqueira, G. C., Shah, P., Wymore, F., Wortman, J., & Sherlock, G. (2013). Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. *BMC microbiology*, 13(1), 91.
- Jiang, W., Yang, G., Zhang, C., & Fu, C. (2011). Species composition and molecular analysis of symbiotic fungi in roots of *Changnienia amoena* (Orchidaceae). *Afr J Microbiol Res*, 5(3), 222-228.
- Jin, H., Yan, Z., Liu, Q., Yang, X., Chen, J., & Qin, B. (2013). Diversity and dynamics of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Stellera chamaejasme* L. in northwestern China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(6), 949-963.
- Johnson, T.R., Stewart, S.L., Dutra, D., Kane, M.E., Richardson, L., (2007). Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae) – preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 90, 313–323.
- Juárez, M. S. T., & Rosas, M. M. (2007). Adquisición de competencia para la micropagación de *Stanhopea tigrina*, *Laelia anceps*, *Epidendrum veroscriptum* y *Cattleya x Esbetts* (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 7(1-2).
- Kahlon, S. S., & Malhotra, S. (1986). Production of gibberellic acid by fungal mycelium immobilized in sodium alginate. *Enzyme and microbial technology*, 8(10), 613-616.
- Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N., & Lugtenberg, B. (2006). Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on

stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(3), 250-256.

- Kanugula, K. A., Kotamraju, S., Karunakaran, C., & Rajendran, A. (2014). Cytotoxic and antibacterial activities of secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* VN2. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 4(1), 107-115.
- Kaul, S., Ahmed, M., Zargar, K., Sharma, P., & Dhar, M. K. (2013). Prospecting endophytic fungal assemblage of *Digitalis lanata* Ehrh.(foxtail) as a novel source of digoxin: a cardiac glycoside. *3 Biotech*, 3(4), 335-340.
- Kauth, P. J., Dutra, D., Johnson, T. R., Stewart, S. L., Kane, M. E., & Vendrame, W. (2008). Techniques and applications of in vitro orchid seed germination. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues*, 5, 375-391.
- Kawaide, H. (2006). Biochemical and molecular analyses of gibberellin biosynthesis in fungi. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(3), 583-590.
- Khan, A. L., Hamayun, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., Jung, H. Y., Lee, J. H., & Lee, I. J. (2012). Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC microbiology*, 12(1), 3.
- Khan, A. L., Hamayun, M., Kim, Y. H., Kang, S. M., Lee, J. H., & Lee, I. J. (2011). Gibberellins producing endophytic *Aspergillus fumigatus* sp. LH02 influenced endogenous phytohormonal levels, isoflavonoids production and plant growth in salinity stress. *Process Biochemistry*, 46(2), 440-447.
- Khan, S. A., Hamayun, M., Kim, H. Y., Yoon, H. J., Seo, J. C., Choo, Y. S., Lee, I. J., Kim, S.D., Rhee, I.K., & Kim, J. G. (2009). A new strain of *Arthrinium phaeospermum* isolated from *Carex kobomugi* Ohwi is capable of gibberellin production. *Biotechnology letters*, 31(2), 283-287.
- Ko, T. W. K., Stephenson, S. L., Bahkali, A. H., & Hyde, K. D. (2011). From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes?. *Fungal Diversity*, 50(1), 113-120.
- Kogel, K. H., Franken, P., & Hüchelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite—what decides?. *Current opinion in plant biology*, 9(4), 358-363.
- Koneman, E. 2001. Diagnóstico Microbiológico: Texto y atlas a color. Editorial Médica Panamericana. Buenos aires, Argentina; Bogotá. 1432 pg.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W. L., Mendes, R., Geraldi, I. O., Pizzirani-Kleiner, A. A., & Azevedo, J. L. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 6(12), 1244-1251.
- Leaw, S. N., Chang, H. C., Sun, H. F., Barton, R., Bouchara, J. P., & Chang, T. C. (2006). Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 693-699.
- Leelasuphakul, W., Hemmanee, P., & Chuenchitt, S. (2008). Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 113-121.
- Leitão, A. L., & Enguita, F. J. (2016). Gibberellins in *Penicillium* strains: Challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. *Microbiological Research*, 183, 8-18.

- Leung, T. L. F., & Poulin, R. (2008). Parasitism, commensalism, and mutualism: exploring the many shades of symbioses. *Vie et Milieu*, 58(2), 107.
- Li, G. H., Yu, Z. F., Li, X., Wang, X. B., Zheng, L. J., & Zhang, K. Q. (2007). Nematicidal metabolites produced by the endophytic fungus *Geotrichum* sp. AL4. *Chemistry & biodiversity*, 4(7), 1520-1524.
- Linaldeddu, B. T., Franceschini, A., Alves, A., & Phillips, A. J. (2013). *Diplodia quercivora* sp. nov.: a new species of *Diplodia* found on declining *Quercus canariensis* trees in Tunisia. *Mycologia*, 105(5), 1266-1274.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., & Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), 471-471.
- Ma, X., Kang, J., Nontachaiyapoom, S., Wen, T., & Hyde, K. D. (2015). Non-mycorrhizal endophytic fungi from orchids. *Current Science*, 108, 1.
- Malonek, S., Bömke, C., Bornberg-Bauer, E., Rojas, M. C., Hedden, P., Hopkins, P., & Tudzynski, B. (2005). Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Phytochemistry*, 66(11), 1296-1311.
- Márquez, S. S., Bills, G. F., Acuña, L. D., & Zabalgoceazcoa, I. (2010). Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus*. *Fungal Diversity*, 41(1), 115-123.
- Martin, K. J., & Rygielwicz, P. T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC microbiology*, 5(1), 28.
- Martínez, D. M., & García, R. A. M. (2007). Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación in vitro de *Stanhopea tigrina bateman* (Orchidaceae). *Foresta Veracruzana*, 9(2), 27-32.
- Mata M.R & Salazar V.M. (2009). Propagation and Establishment of Three Endangered Mexican Orchids from Protocorms. *HORTSCIENCE* 44(5):1395–1399
- McCormick, M. K., Whigham, D. F., & O'Neill, J. (2004). Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*, 163(2), 425-438.
- McKendrick, S. (2000). Manual para la germinación in vitro de orquídeas. *Ceiba Fundación para la Conservación Tropical. Universidad San Francisco de Quito*.
- McKendrick, S. L., Leake, J. R., & Read, D. J. (2000). Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *The New Phytologist*, 145(3), 539-548.
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 634-663.
- Mitter, N., Srivastava, A. C., Ahamad, S., Sarbhoy, A. K., & Agarwal, D. K. (2002). Characterization of gibberellin producing strains of *Fusarium moniliforme* based on DNA polymorphism. *Mycopathologia*, 153(4), 187-193.
- Miyoshi K, Mii M. (1988). Ultrasonic treatment for enhancing seed germination of terrestrial orchid, *Calanthe discolor*, in asymbiotic culture. *Scientia Horticulturae* 35: 127–130

- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., & Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology advances*, 32(2), 429-448.
- Nair, D. N., & Padmavathy, S. (2014). Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Nakamura, S. J. (1982). Nutritional conditions required for the non-symbiotic culture of an achlorophyllous orchid galeola sep ten trio n alis. *New Phytologist*, 90(4), 701-715.
- Narula, N., Kothe, E., & Behl, R. K. (2012). Role of root exudates in plant-microbe interactions. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 82(2), 122-130.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N. P., & Jones, J. D. (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology*, 18(9), 650-655.
- Niehaus, E. M., von Bargen, K. W., Espino, J. J., Pfannmüller, A., Humpf, H. U., & Tudzynski, B. (2014). Characterization of the fusaric acid gene cluster in *Fusarium fujikuroi*. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(4), 1749-1762.
- NOM-059-SEMARNAT-2010
- Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S., & Manoch, L. (2011). Symbiotic seed germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume and *Dendrobium draconis* Rchb. f., native orchids of Thailand. *Scientia horticulturae*, 130(1), 303-308.
- Novak, S. D., Luna, L. J., & Gamage, R. N. (2014). Role of Auxin in orchid development. *Plant signaling & behavior*, 9(10).
- O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., ... & Altmüller, J. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature genetics*, 44(9), 1060-1065.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., & Nirenberg, H. I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 465-493.
- Ortiz-Arias, B. (2002). Identificación de tres especies de potyvirus en orquídeas nativas.
- Osono, T. (2008). Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of *Camellia japonica*: seasonal and leaf age-dependent variations. *Mycologia*, 100(3), 387-391.
- Otero, J. T., Ackerman, J. D., & Bayman, P. (2002). Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American Journal of Botany*, 89(11), 1852-1858.
- Otero, J. T., Ackerman, J. D., & Bayman, P. (2004). Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, 13(8), 2393-2404.
- Ovando, I., Damon, A., Bello, R., Ambrosio, D., Albores, V., Adriano, L., & Salvador, M. (2005). Isolation of endophytic fungi and their mycorrhizal potential for the tropical epiphytic orchids *Cattleya skinneri*, *C. aurantiaca* and *Brassavola nodosa*. *Asian Journal of Plant Sciences*.
- Paracer, S., & V. Ahmadjian. 2000. *Symbiosis: an introduction to biological associations*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Pecoraro, L., Girlanda, M., Kull, T., Perini, C., & Perotto, S. (2013). Fungi from the roots of the terrestrial photosynthetic orchid *Himantoglossum adriaticum*. *Plant Ecology and Evolution*, 146(2), 145-152.

- Pedroza-Manrique, J., Fernandez-Lizarazo, C., & Suarez-Silva, A. (2005). Evaluation of the effect of three growth regulators in the germination of *Compartmentia falcata* seeds under in vitro conditions. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41(6), 838-843.
- Pérez-Bravo, R., Salazar, G.A., Mora-Guzmán, E. (2010). Orquídeas de las Lomas La Manzanilla, Sierra Madre Oriental, Puebla, México. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 87: 125- 129
- Pickens, K. A., Affolter, J. M., Wetzstein, H. Y., & Wolf, J. H. (2003). Enhanced seed germination and seedling growth of *Tillandsia eizii* in vitro. *HortScience*, 38(1), 101-104.
- Pierce, S., & Cerabolini, B. E. L. (2011). Asymbiotic germination of the White Mountain Orchid (*Pseudorchis albida*) from immature seed on media enriched with complex organics or phytohormones. *Seed Science and Technology*, 39 (1), 199-203.
- Porras-Alfaro, A. & Bayman, P. (2007). Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia* 99: 510-525
- Prats, G. (2006). Microbiología clínica. Editorial Médica panamericana. 399p.
- Prusky, D., McEvoy, J. L., Saftner, R., Conway, W. S., & Jones, R. (2004). Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. *Phytopathology*, 94(1), 44-51
- Pupulin, F., & Bogarín, D. (2005). The genus *Brassia* in Costa Rica: a survey of four species and a new species. *Lindleyana in Orchids*, 74(3), 202-207.
- Qin, J. C., Zhang, Y. M., Gao, J. M., Bai, M. S., Yang, S. X., Laatsch, H., & Zhang, A. L. (2009). Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(6), 1572-1574.
- Rands, M. R., Adams, W. M., Bennun, L., Butchart, S. H., Clements, A., Coomes, D., ... & Sutherland, W. J. (2010). Biodiversity conservation: challenges beyond 2010. *Science*, 329(5997), 1298-1303.
- Rasmussen, H. N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil* 244: 149–163
- Rasmussen, H., Andersen, T.F., Johansen, B. (1990). Temperature sensitivity of in vitro germination and seedling development of *Dactylorhiza majalis* (Orchidaceae) with and without a mycorrhizal fungus. *Plant Cell Environ.* 13, 171–177.
- Rodriguez RJ, Redman R (2008) More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: Plant stress tolerance via fungal symbiosis. *J Exp Bot* 59:1109–1114
- Rodriguez-Salamanca, L. M., Enzenbacher, T. B., Byrne, J. M., Feng, C., Correll, J. C., & Hausbeck, M. K. (2015). First Report of *Colletotrichum acutatum* sensu lato Causing Leaf Curling and Petiole Anthracnose on Celery (*Apium graveolens*) in Michigan. *Plant Disease*, 99(12), 1832-1840.
- Roy, M., Yagame, T., Yamato, M., Iwase, K., Heinz, C., Faccio, A., Bonfante, P., & Selosse, M. A. (2009). Ectomycorrhizal *Inocybe* species associate with the mycoheterotrophic orchid *Epipogium aphyllum* but not its asexual propagules. *Annals of Botany*, 104(3), 595-610.
- Salgado, C. G., Silva, J. P. D., Diniz, J. A. P., Silva, M. B. D., Costa, P. F. D., Teixeira, C., & Salgado, U. I. (2004). Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 46(1), 33-36.

- Salifah, H. A. B., Muskhazli, M., Rusea, G. and Nithiyaa, P (2011). Variation in mycorrhizal specificity for in vitro symbiotic seed germination of grammatophyllum speciosumBlume. *Sains Malaysiana*, 40(5), 451-455.
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraeken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., ... & Varga, J. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78, 141-173. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.
- Santos-Hernández, L., Martínez-García, M., Campos, J. E., & Aguirre-León, E. (2005). In vitro propagation of *Laelia albida* (Orchidaceae) for conservation and ornamental purposes in Mexico. *HortScience*, 40(2), 439-442.
- Sanz-Martín, J. M., Postigo, V., Mateos, A., Albrecht, B., Munkvold, G. P., Thon, M. R., & Sukno, S. A. (2015). First report of *Colletotrichum graminicola* causing maize anthracnose stalk rot in the Alentejo region, Portugal. *Plant Disease*, (ja).
- Sathiyadash, K., Muthukumar, T., Uma, E., & Pandey, R. R. (2012). Mycorrhizal association and morphology in orchids. *Journal of Plant Interactions*, 7(3), 238-247.
- Sawmya, K. O. T. I. A. N., Vasudevan, T. G., & Murali, T. S. (2013). Fungal endophytes from two orchid species pointer towards organ specificity. *Czech Mycology*, 65, 89-101.
- Schulz, B & Boyle C. 2005. Review The endophytic continuum. *Mycol. Res.* 109 (6): 661–686
- Sen, S., Acharya, R., Saha, A., & Acharya, K. (2006). A New Report of *Cymbidium* spp. Pseudobulb Rot Orchestrated by *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum*, and *Mucor hiemalis* f. sp. *hiemalis*. *Plant Disease*, 90(11), 1460-1460.
- Singh S.K., G.A. Strobel., B. Knighton., B. Geary., J. Sears, & D. Ezra. (2011). An Endophytic *Phomopsis* sp. Possessing Bioactivity and Fuel Potential with its Volatile Organic Compounds. *Microbial Ecology* 61:729–739
- Sommer, J., Pausch, J., Brundrett, M. C., Dixon, K. W., Bidartondo, M. I., & Gebauer, G. (2012). Limited carbon and mineral nutrient gain from mycorrhizal fungi by adult Australian orchids. *American Journal of Botany*, 99(7), 1133-1145.
- Soto, M. A., Hágater, E., Jiménez, R., Salazar, G.A., Solano, R., Flores, R., Contreras, E.I. (2007). Las Orquídeas de México: Catálogo digital. Instituto Chinoín, A.C., México, D.F.
- Soto-Arenas, M.A. (2002). *Stanhopea tigrina*. Lam 678. En: Hágater E. y M. Soto (eds). *Orchid of México*, part 2. Ic. Orchid. Fasc. 5-6. Asociación Mexicana de Orquideología A.C. México D.F
- Steinfort, U., Verdugo, G., Besoain, X., & Cisternas, M. A. (2010). Mycorrhizal association and symbiotic germination of the terrestrial orchid *Bipinnula fimbriata* (Poepp.) Johnston (Orchidaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205(12), 811-817.
- Stewart, S. L., & Kane, M. E. (2006). Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(2), 147-158.
- Stewart, S. L., & Kane, M. E. (2006). Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant cell, tissue and organ culture*, 86(2), 159-167.

- Středa, T., Krédli, Z., Pokorný, R., & Sangchote, S. (2013). Effect of wetting period on infection of orchid flowers by *Alternaria alternata* and *Curvularia eragrostidis*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 41(1), 1-8.
- Strobel G.A. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5(6):535–544
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491-502.
- Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R. S., & Hess, W. M. (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, 142(2), 435-440.
- Sudheep, N. M., & Sridhar, K. R. (2012). Non-mycorrhizal fungal endophytes in two orchids of Kaiga forest (Western Ghats), India. *Journal of Forestry Research*, 23(3), 453-460.
- Summerbell, R. C., Weitzman, I., Padhye, A. A., Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., ... & Pfaller, M. A. (2006). Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton, and agents of superficial mycoses. *Manual of clinical microbiology: Volume 2*, (Ed. 9), 1874-1897.
- Swangmaneecharern, P., Serivichyaswat, P., & Nontachaiyapoom, S. (2012). Promoting effect of orchid mycorrhizal fungi *Epulorhiza* isolates on seed germination of *Dendrobium* orchids. *Scientia horticulturae*, 148, 55-58.
- Swarts, N. D., Sinclair, E. A., Francis, A., & Dixon, K. W. (2010). Ecological specialization in mycorrhizal symbiosis leads to rarity in an endangered orchid. *Molecular Ecology*, 19(15), 3226-3242.
- Tan X. Ming., Chen X.M., Wang C.L., Jin X.H., Cui J.L., Chen J., Guo S.X., Zhao L.F. (2012). Isolation and Identification of Endophytic Fungi in Roots of Nine *Holcoglossum* Plants (Orchidaceae) Collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan Provinces of China. *Curr Microbiol.* 64:140–147
- Tang, Y., Kuang, J. F., Wang, F. Y., Chen, L., Hong, K. Q., Xiao, Y. Y., Xie, H., Lu, W.J & Chen, J. Y. (2013). Molecular characterization of PR and WRKY genes during SA-and MeJA-induced resistance against *Colletotrichum musae* in banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 79, 62-68.
- Tao, G., Liu, Z. Y., Hyde, K. D., Lui, X. Z., & Yu, Z. N. (2008). Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). *Fungal Divers*, 33(1), 101-122.
- Tao, G., Liu, Z. Y., Liu, F., Gao, Y. H., & Cai, L. (2013). Endophytic *Colletotrichum* species from *Bletilla ochracea* (Orchidaceae), with descriptions of seven new speices. *Fungal Diversity*, 61(1), 139-164.
- Taylor, K., Barber, P. A., Hardy, G. E. S. J., & Burgess, T. I. (2009). Botryosphaeriaceae from tuart (*Eucalyptus gomphocephala*) woodland, including descriptions of four new species. *Mycological research*, 113(3), 337-353.
- Thompson, J. N. (1994). The coevolutionary process. – Univ. of Chicago Press.
- Tondello, A., Vendramin, E., Villani, M., Baldan, B., & Squartini, A. (2012). Fungi associated with the southern Eurasian orchid *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. *Fungal biology*, 116(4), 543-549.

- Tsavkelova, E. A., Bömke, C., Netrusov, A. I., Weiner, J., & Tudzynski, B. (2008). Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain. *Fungal genetics and Biology*, 45(10), 1393-1403.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2005). Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology*, 74(1), 46-53.
- Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Botina, S. G., & Netrusov, A. I. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological research*, 162(1), 69-76.
- Tsavkelova, E. A., Lobakova, E. S., Kolomeitseva, G. L., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2003). Associative cyanobacteria isolated from the roots of epiphytic orchids. *Microbiology*, 72(1), 92-97.
- Tudzynski, B. (2005). Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(6), 597-611.
- Twizeyimana, M., Förster, H., McDonald, V., Wang, D. H., Adaskaveg, J. E., & Eskalen, A. (2013). Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado in California. *Plant Disease*, 97(12), 1580-1584
- Urbanova, T., & Leubner-Metzger, G. (2016). Gibberellins and seed germination. *Annual Plant Reviews, Volume 49: Gibberellins, The*, 253-284.
- Van der Kinderen G. 1987. Absisic acid in terrestrial orchid seeds: a possible impact on their germination. *Lindleyana* 2: 84–87
- Vejsadova, H. A. N. A. (2006). Factors affecting seed germination and seedling growth of terrestrial orchids cultured in vitro. *Acta Biologica Cracoviensia. Series; Botanica*, 48, 109-113.
- Velho, A. C., Alaniz, S., Casanova, L., Mondino, P., & Stadnik, M. J. (2015). New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. *Fungal biology*, 119(4), 229-244.
- Villaseñor, J. L. (2003). Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. INCI 28: 160-167
- Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barabé, D., & Thibeault, G. (2000). Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination. *Annals of Botany*, 86(1), 79-86.
- Wang, Y. U., Guo, L. D., & Hyde, K. D. (2005). Taxonomic placement of sterile morphotypes of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in northeast China based on rDNA sequences. *Fungal Divers*, 20, 235-260.
- Werner, A., & Zadworny, M. (2003). In vitro evidence of mycoparasitism of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* against *Mucor hiemalis* in the rhizosphere of *Pinus sylvestris*. *Mycorrhiza*, 13(1), 41-47.
- Wilkinson, K. G., Dixon, K. W., Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. L. (1994). Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant and soil*, 159(2), 291-295.
- Wu, J., Qian, J., & Zheng, S. (2002). [A preliminary study on ingredient of secretion from fungi of orchid mycorrhiza]. *Ying yong sheng tai xue bao= The journal of applied ecology/Zhongguo*




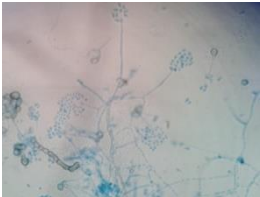

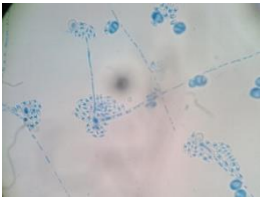
sheng tai xue xue hui, Zhongguo ke xue yuan Shenyang ying yong sheng tai yan jiu suo zhu ban, 13(7), 845-848.



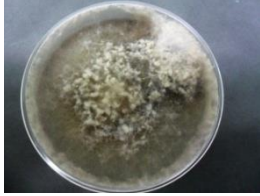
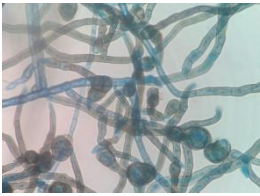




- Xia, X., Lie, T. K., Qian, X., Zheng, Z., Huang, Y., & Shen, Y. (2011). Species diversity, distribution, and genetic structure of endophytic and epiphytic *Trichoderma* associated with banana roots. *Microbial ecology*, 61(3), 619-625.
- Xing Y.M., J. Chen., J.L. Cui., X.M Chen, & S.X. Guo. (2011). Antimicrobial Activity and Biodiversity of Endophytic Fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thysiflorum* from Vietman. *Current Microbiology* 62: 1218–1224.
- Xu, J., Yang, X., & Lin, Q. (2014). Chemistry and biology of *Pestalotiopsis*-derived natural products. *Fungal Diversity*, 66(1), 37-68.
- Yadav, Á. B. (2010). A new record of leaf spot caused by *Alternaria alternate* on Orchids in Uttarakhand. *Annals of Plant Protection Sciences*, 18(2), 551-552.
- Yamazaki, J., & Miyoshi, K. (2006). In vitro asymbiotic germination of immature seed and formation of protocorm by *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 98(6), 1197-1206.
- Yang, C. K., & Lee, Y. I. (2014). The seed development of a mycoheterotrophic orchid, *Cyrtosia javanica* Blume. *Botanical Studies*, 55(1), 1-7.
- Yang, X. L., Zhang, J. Z., & Luo, D. Q. (2012). The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. *Natural product reports*, 29(6), 622-641.
- Yu, J., Cleveland, T. E., Nierman, W. C., & Bennett, J. W. (2005). *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. *Revista iberoamericana de micología*, 22(4), 194-202.
- Yuan, Z. L., Chen, Y. C., & Yang, Y. (2009). Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 295-303.
- Zettler, L. W., & McInnis, T. M. (1994). Light enhancement of symbiotic seed germination and development of an endangered terrestrial orchid (*Platanthera integrilabia*). *Plant Science*, 102(2), 133-138.
- Zhang, H. W., Song, Y. C., & Tan, R. X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Natural product reports*, 23(5), 753-771.
- Gutiérrez, R. M. P. (2010). Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. *J. Med. Plants Res*, 4(8), 592-638.

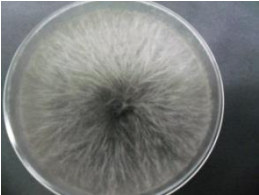
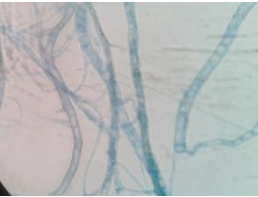


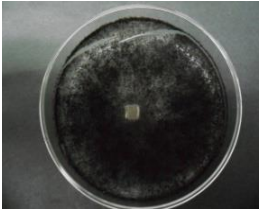
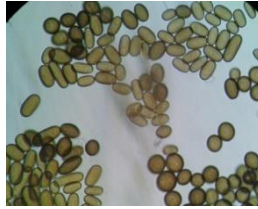

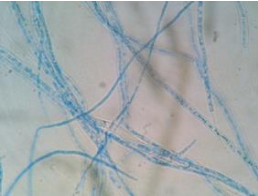
9. Anexos

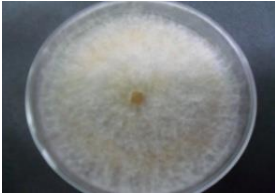
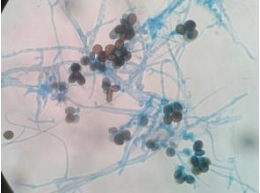





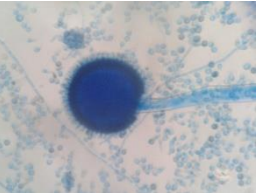
Anexo 1

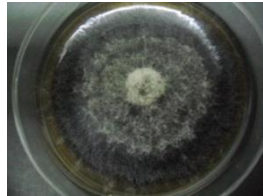

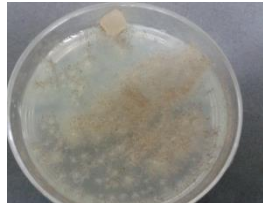
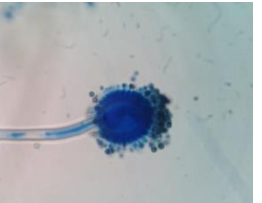

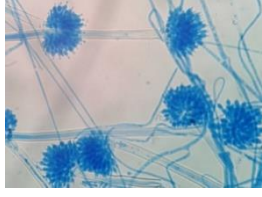

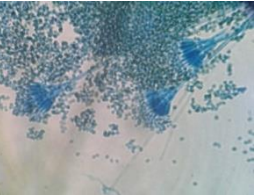
Tabla S1. Descripción de los morfogrupos identificados.

Géneros	Morfogrupos	Características	N° aislados		
<i>Acremonium</i>	1	Las colonias de textura filamentosa con crecimiento ligero en color blanco, no presenta pigmentación en el medio.	4		
	2	Colonias crecimiento lento, filamentosa en el contorno en suave color crema.	7		
	3	Las colonias de textura filamentosa crecimiento ligero, el color de los micelios son ligeramente crema.	5		



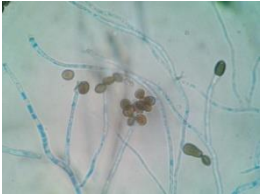


	4	Colonia limitada, color naranja ligero; forma y aspecto; cremosa, convexa y plegada.	1		
<i>Alternaria</i>	5	Colonia ilimitada, de aspecto vellosa-granular en el centro en color gris	1		
<i>Annulohyphoxylon</i>	6	Colonia ilimitada, de aspecto vellosogranular en color café claro	2		
<i>Anthostomella</i>	7	Colonia limitada, circular vellosa, radial, en color blanco.	8		

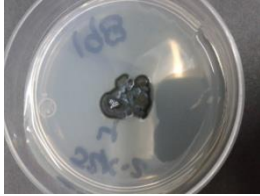
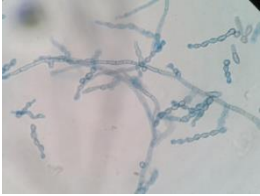


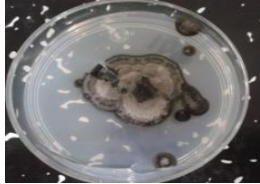
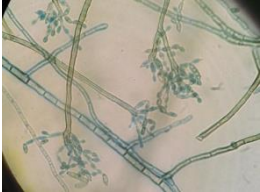

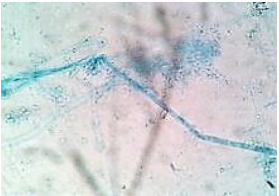
<i>Aplosporella</i>	8	Colonia ilimitada, vellosa-filamentosa en color gris.	16		
<i>Arthopyrenia</i>	9	Colonia limitada, color rosa; forma y aspecto; cremosa, convexa y plegada	1		
	10	Colonia ilimitada, aterciopelada-polvosa en color negro, que no pigmenta al medio	2		
<i>Arthrimum</i>	11	Colonia ilimitada, cubre toda la placa, de aspecto vellosa-granular centro café con periferia en color blanco.	8		

	12	Colonia ilimitada, crece en toda la placa, de aspecto veloso-granular en color blanco	15		
	13	Colonia ilimitada, llena la placa, de aspecto vellosa, forma plana, color gris.	5		
<i>Aspergillus</i>	14	Colonia verde aterciopelada, limitada, con radiaciones.	1		
	15	Colonia ilimitada, blanca; forma y aspecto: plana, polvosa, sin pigmentos.	7		

	16	Colonia limitada, velllosa en color gris, con pigmentación verde en el medio.	1		
	17	Colonia ilimitada, blanca; forma y aspecto: plana, polvosa, sin pigmentos.	13		
	18	Colonia ilimitada, aterciopelada, color café, pigmentación al medio amarilla.	2		
	19	Colonia limitada, de aspecto vellosa en color salmón, en la periferia blanca.	1		


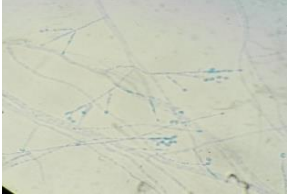
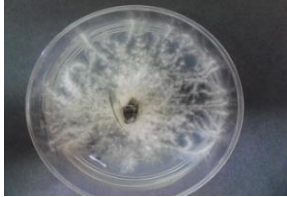



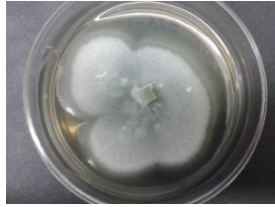
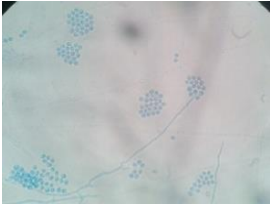
	20	Colonia limitada, filmentosa blanca con fondo naranja.	2		
	21	Colonia limitada, cremosa, dura y convexa en color crema, reverso beige.	6		
<i>Bionectria</i>	22	Colonia limitada de aspecto veloso color crema.	4		
<i>Bipolaris</i>	23	Colonia limitada, filamentosa-vellosa, inmersa en el medio, color café.	1		

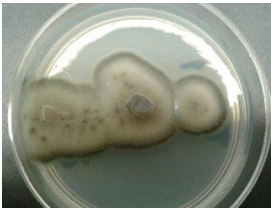
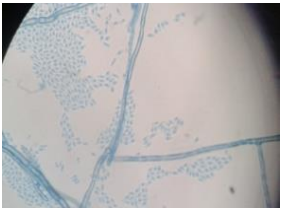
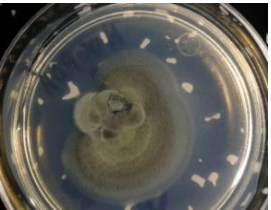


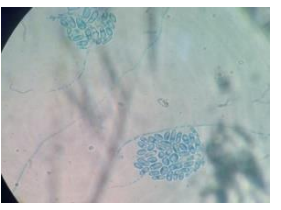


	24	Colonia filamentososa color blanco, ilimitada	1		
<i>Chaetomium</i>	25	Colonia ilimitada, tiende a llenar la placa, color crema-amarilla, aspecto filamentososo.	2		
	26	Colonia ilimitada, llena toda la placa con aspecto algodonoso de color blanca, que no presenta pigmentación en el medio.	3		
<i>Chaunopycnis</i>	27	Colonia limitada, de aspecto cremoso, convexa en color crema.	10		





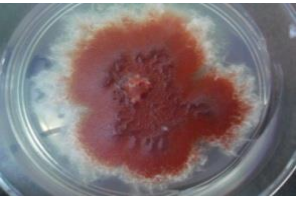
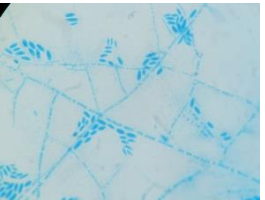

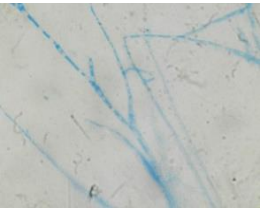
<i>Cladophialophora</i>	28	Colonia limitada, rugosa, convexa, color negro.	1		
<i>Cladosporium</i>	29	Colonia limitada, color verde, bellosa, plana con enl centro abultado.	5		
	30	Colonia color verde oscuro, plana, aterciopelada.	1		
<i>Cochliobolus</i>	31	Colonia limitada, color blanca centro amarillo, aspecto rugoso.	1		

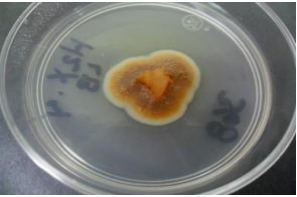
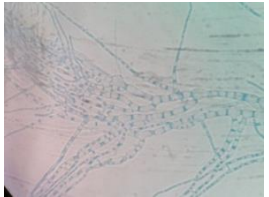

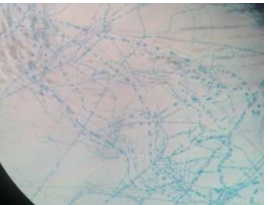
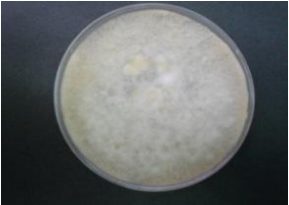
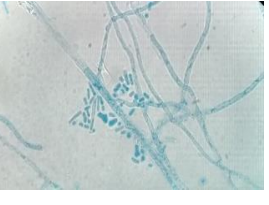
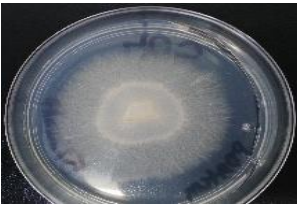
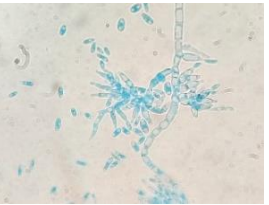
<i>Colletotrichum</i>	32	Colonia filamentosa ilimitada, crece en toda la placa, de aspecto veloso y color gris.	1		
<i>Curvularia</i>	33	Colonia color verde oscuro, plana, aterciopelada.	4		
<i>Daldinia</i>	34	Colonia limitada, aterciopelada de color café tenue.	14		
	35	Colonia limitada, aspecto veloso-granular, color salmón.	1		


<i>Diaporthe</i>	36	Colonia ilimitada, vellosa-granular, plana, color blanca con gris.	4		
<i>Diplodia</i>	37	Colonia limitada, aspecto vellosa y color blanco.	4		
<i>Elaphocordyceps</i>	38	Colonia limitada, cremosa, plana convexa.	1		
<i>Epichloe</i>	39	Colonia limitada, cremosa, convexa, dura en color blanco.	1		

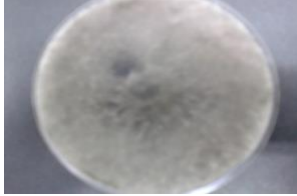

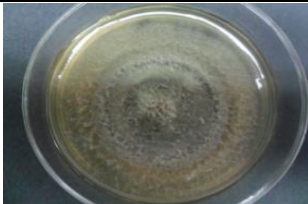

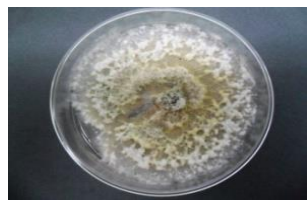


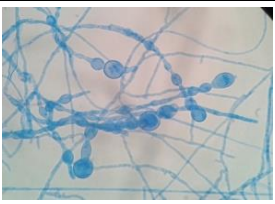

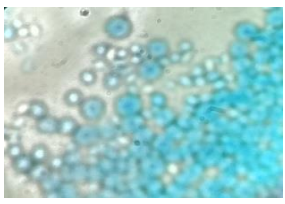
	40	Colonia limitada de aspecto, veloso, plano en color blanco y presenta pigmentación café en el medio.	2		
<i>Eutypa</i>	41	Colonia ilimitada, color blanca, radial.	1		
<i>Eutypella</i>	42	Colonia ilimitada, color blanca, radial.	4		
<i>Exophiala</i>	43	Colonia limitada, vellosa, color verde.	1		


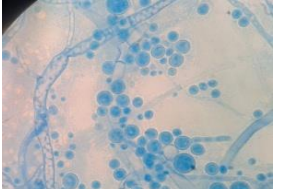

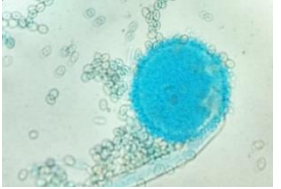
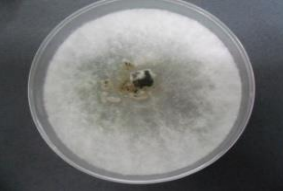
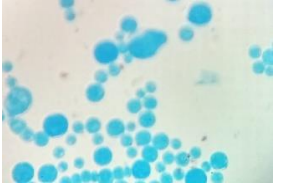

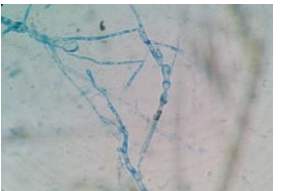
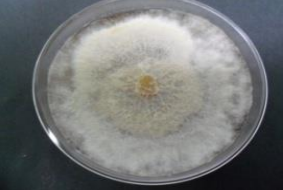

	44	Colonia limitada, cremosa, convexa, lisa de color verde olivo.	1		
<i>Fonsecae</i>	45	Colonia verde aterciopelada, limitada, radial.	11		
<i>Fusarium</i>	46	Colonia limitada, de aspecto filamentososo-granular en color blanco	24		
	47	Colonia ilimitada, de aspecto; velloso, color naranja-zanahoria.	2		





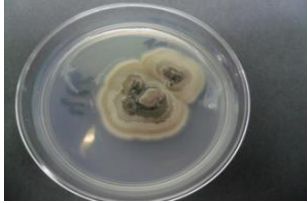


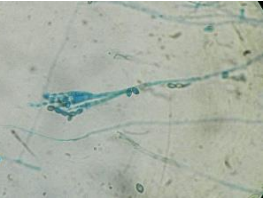
	48	Colonia ilimitada, vellosa, plana, color blanca	8		
	49	Colonia ilimitada de aspecto velloso-granular delicado en color gris.	2		
	50	Colonia ilimitada, vellosa en tono rojo en el centro, periferia blanca, no se observa pigmentación en el medio.	2		
	51	Colonia limitada de aspecto velloso, color blanca con el centro abultado, con una coloración gris en la periferia.	2		


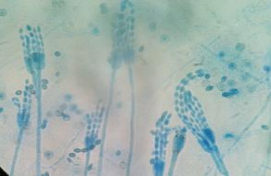
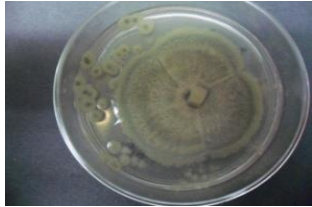
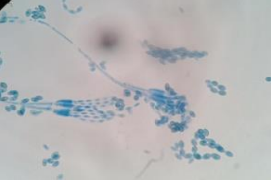

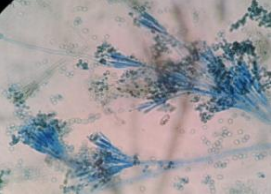
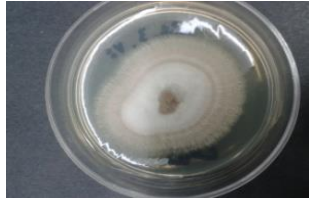
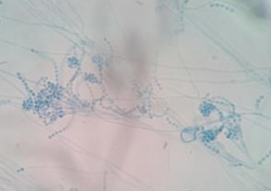

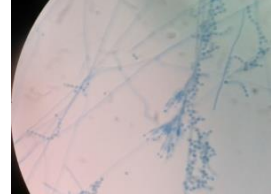
<i>Fusicolla</i>	52	Colonia limitada, dura, convexa, lisa color naranja-café.	1		
<i>Geotrichum</i>	53	Colonia limitada, color blanco, vellosa, plana con en el centro abultado.	5		
	54	Colonia ilimitada, de aspecto; veloso-seco, color blanco.	9		
<i>Gibberella</i>	55	Colonia limitada, vellosa en color blanca.	1		

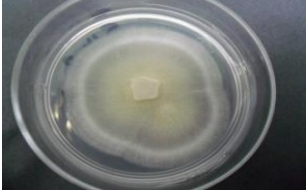

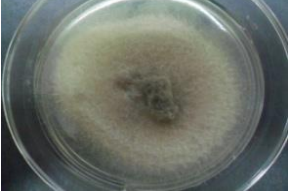







<i>Hypocrea</i>	56	Colonia limitada, vellosa en color blanco.	1		
<i>Hypoxyton</i>	57	Colonia limitada, color blanca de aspecto vellosa y con presencia de pigmentación café en el medio.	6		
<i>Letendreaa</i>	58	Colonia limitada, vellosa, plana, color blanco.	1		
<i>Macrophoma</i>	59	Colonia ilimitada, aspecto velloso-granular, en color cafe, con pigmentación uva al medio.	2		

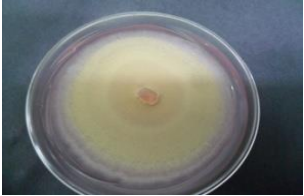
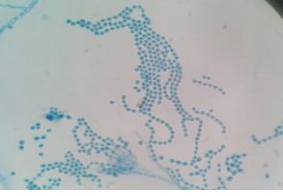
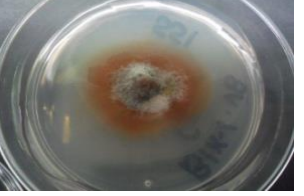

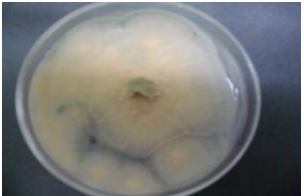



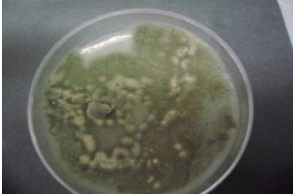
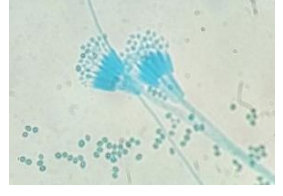
	60	Colonia irregular, llena toda la placa, de aspecto algodonoso-veloso en color gris, no presenta pigmentación al medio.	4		
<i>Microdiplodia</i>	61	Colonia de tamaño limitado, color gris concéntrico; aspecto veloso, difunde al medio color café.	1		
	62	Colonia ilimitada, de aspecto vellosa-granular en color café-amarillo.	2		
<i>Microsporum</i>	63	Colonia tamaño limitado, color blanco; aspecto veloso, centro abultado.	2		
<i>Mucor</i>	64	Colonia filamentosa ilimitada, aspecto veloso-filamentoso fino en color blanco.	8		

	65	Colonia ilimitada; filamentosa, amarillo	13		
	66	Colonia limitada, color verde oscuro, aterciopelada, rugoso.	1		
	67	Colonia ilimitada, vellosa, plana, en color blanco.	5		
<i>Nectria</i>	68	Colonia limitada, de aspecto vellosito en color blanco con fondo café.	1		
	69	Colonia ilimitada, aspecto vellosito concéntrico, en color blanco, no presenta pigmentación en el medio.	4		

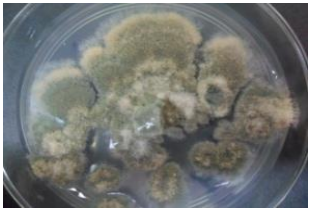
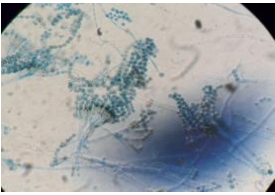


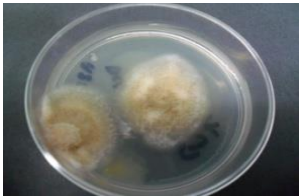
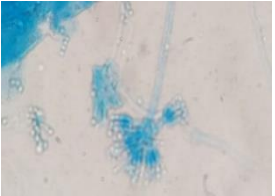

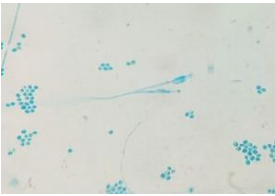
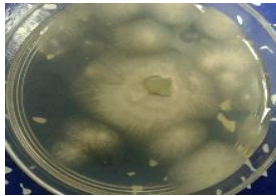
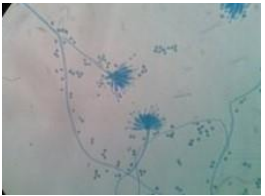
<i>Neopestalotiopsis</i>	70	Colonia ilimitada, llena toda la placa, de aspecto vellosa, concéntrico en color blanco.	9		
<i>Nigrograna</i>	71	Colonia limitada, vellosa en color blanco.	1		
<i>Ochlocladosporium</i>	72	Colonia limitada, cremosa, convexa y rugosa en color café.	2		
<i>Paecilomyces</i>	73	Tamaño ilimitado, color verde oscuro; forma y aspecto: plana, seca, aterciopelada.	1		

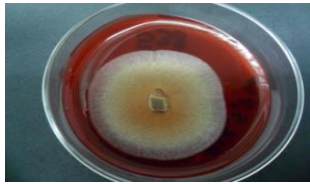
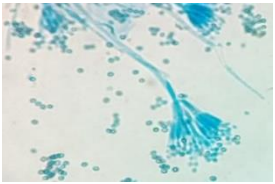







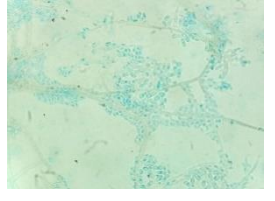
	74	Colonia limitada, vellosa-polvosa, color crema.	1		
	75	Colonia limitada, polvosa color verde.	4		
	76	Colonia limitada, de aspecto vellosito, color blanca, centro rugoso de color crema, pigmenta al medio Amarillo.	1		
	77	Colonia limitada, de aspecto vellosito, coloración rosa en el contorno y blanca en el centro.	4		
	78	Colonia limitada, de aspecto vellosito, coloración rosa.	1		


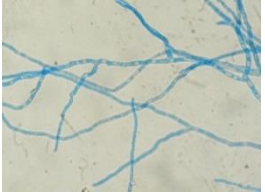




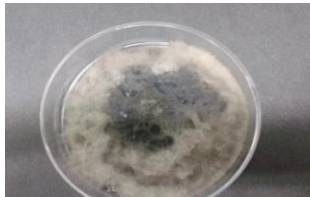

	79	Colonia limitada, de aspecto polvoso en color amarillo en el centro con gris alrededor, no presenta pigmentación en el medio.	3		
<i>Paraconiothyrium</i>	80	Colonia limitada, vellosa, de color café.	4		
	81	Colonia limitada, de aspecto vellosito en color zanahoria.	1		
	82	Colonia ilimitada, polvosa, aterciopelada, color café claro (crema) con verde olivo.	5		
	83	Colonia limitada, de aspecto vellosa-granular en color crema.	6		




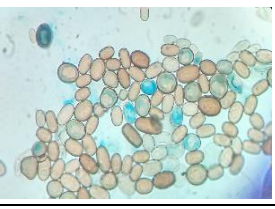
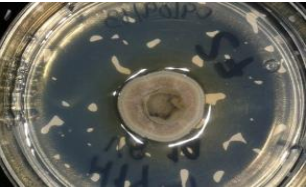
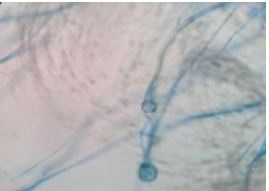
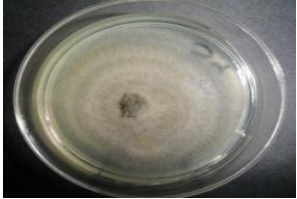
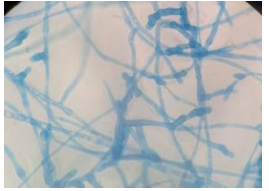
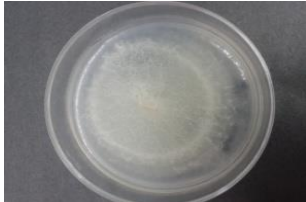
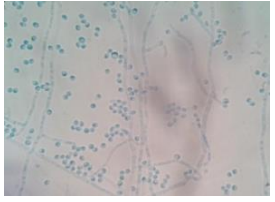
	84	Colonia limitada, de aspecto polvoso en color amarillo y pigmentación al medio en color rosa.	2		
	85	Colonia filamentosa, inversa en el medio en color café.	1		
	86	Colonia limitada, aterciopelada-polvosa en color café-naranja.	23		
	87	Colonia limitada, de aspecto veloso abultado en color blanco.	9		
	88	Colonia ilimitada, aspecto polvoso en color verde con crema, no se observa pigmentación en el medio.	10		


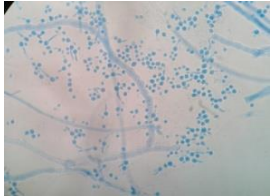

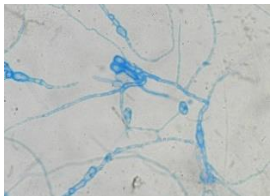
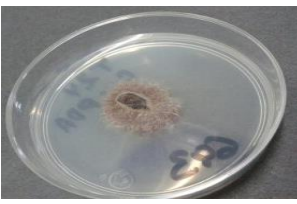



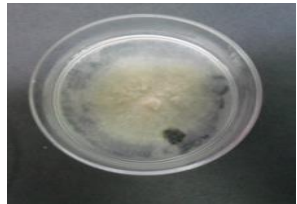

<i>Penicillium</i>	89	Colonia limitada, cremosa, convexa, color salmón.	1		
	90	Colonia ilimitada, de aspecto vellosa- algodonosa, granular en color blanca.	4		
	91	Colonia limitada, lisa, cremosa, rugosa, convexa en color blanco.	3		
	92	Colonia ilimitada, vellosa, color gris.	2		
	93	Colonia limitada, cremosa, convexa, lisa en color crema.	10		


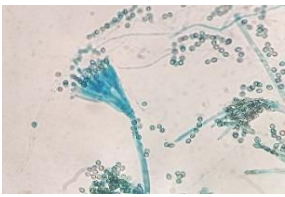
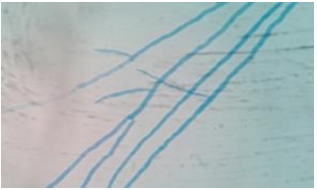
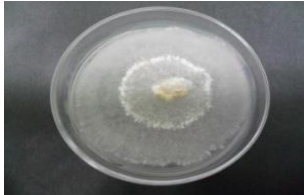

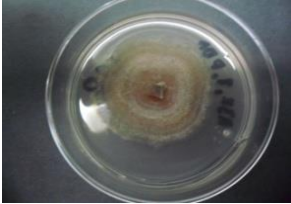
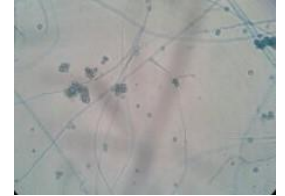
	94	Colonia ilimitada, de aspecto veloso emn color gris .	3		
	95	Colonia limitada, cremosa, convexa, rugosa en color verde.	1		
	96	Colonia limitada, de aspecto aterciopelado veloso en color café claro, no presenta pigmentación en el medio.	13		
	97	Colonia limitada; aspecto y forma: vellosa, color rosa sin pigmentación.	1		
	98	Colonia algodonosa-vellosa.	7		

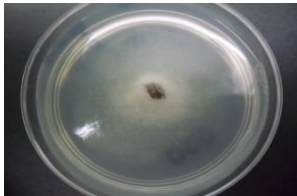
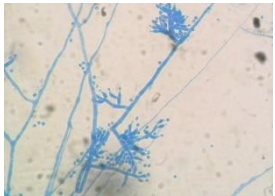


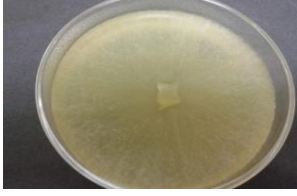
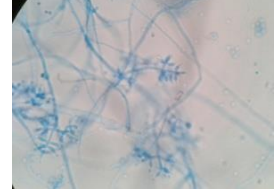



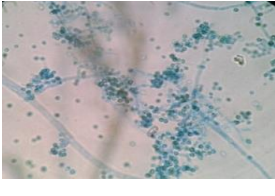
	99	Colonia limitada, de aspecto polvoso en color naranja, pigmenta al medio rojo.	1		
<i>Pestalotiopsis</i>	100	Colonia amarilla aterciopelada-granulosa plana, limitada, pigmenta al medio en amarillo.	9		
	101	Colonia limitada, vellosa irregular en color café, filamentoso sumergida en el centro.	1		
<i>Phaeosphaeriopsis</i>	102	Colonia vellosa, limitada de color café-crema, concéntrica, plana.	1		
<i>Phialemoniopsis</i>	103	Colonia limitada, aspecto cremosa, oscura en color crema.	2		

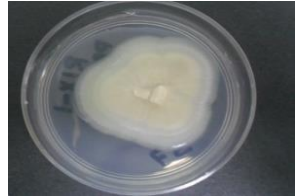





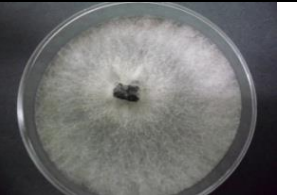

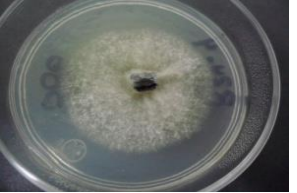

	104	Colonia limitada, de aspecto algodonoso centro abultado en color gris, y blanco en la periferia.	2		
<i>Phoma</i>	105	Colonia limitada, vellosa en color amarillo pigmentación al medio café tenue.	1		
<i>Pseudobotrytis</i>	106	Colonia limitada, de aspecto cremoso, duro y rugoso en color verde, anverso uva.	1		
<i>Pyrenochaeta</i>	107	Colonia ilimitada, vellosa-algodonosa, color blanco.	2		
<i>Pyrenochaetopsis</i>	108	Colonia dura, cremosa, convexa en color blanco.	2		



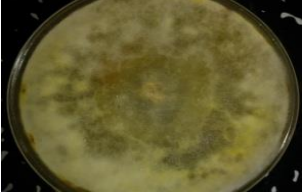
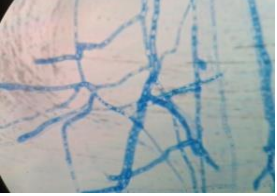
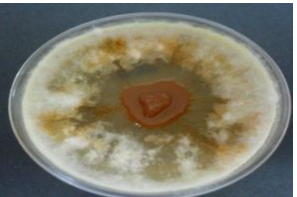
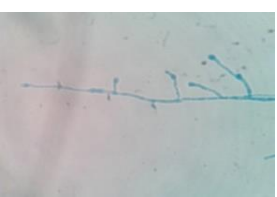




<i>Roussoella</i>	109	Colonia limitada, blanca: vellosa-granular blanca.	2		
	110	Colonia ilimitada, irregular, de aspecto polvoso en color negro.	1		
<i>Scedosporium</i>	111	Colonia limitada, convexa y plagada en color café.	3		
	112	Colonia granulosa-polvosa, limitada, plana, color gris, concentrica.	1		
	113	Colonia limitada, filamentosa-vellosa, color blanco.	7		


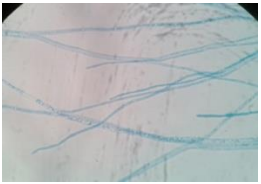
	114	Colonia limitada, de aspecto veloso, en color blanco.	3		
	115	Colonia limitada, vellosa en color gris cemento.	1		
	116	Colonia limitada, de aspecto filamentososo-cremoso en color púrpura (morado).	1		
	117	Colonia limitada, centro cremoso, duro color café, acompañado filamento delicado en la periferia en color blanco.	1		
<i>Schizophyllum</i>	118	Colonia limitada, de aspecto; vellososeco, color crema.	1		

<i>Talaromyces</i>	119	Colonia ilimitada, vellosa-algodonosa en color naranja.	1		
<i>Thyridaria</i>	120	Colonia ilimitada, vellosa-algodonosa en color blanco.	1		
<i>Trichoderma</i>	121	Colonia ilimitada, llena toda la placa, es de color blanca y presenta granulaciones en el centro, no se observa pigmentación en el medio.	14		
	122	Colonia ilimitada, vellosa, plana, color blanco, con esporulación en color verde.	62		
	123	Colonia limitada, aspecto aterciopelado concéntrica en color café claro.	1		

	124	Colonia limitada, vellosa-filamentosa en color blanco, no presenta pigmentación en el medio.	2		
	125	Colonia ilimitada, llena la placa. De aspecto veloso y color blanco.	28		
	126	Colonia filamentosa, plana, delicada en color amarillo.	6		
	127	Colonia ilimitada, de aspecto filamentosa-vellosa, en color blanco con el centro rojo.	3		
	128	Colonia ilimitada, llena la placa; de aspecto y forma: vellosa en color blanco.	9		

<i>Trichophyton</i>	129	Colonia cremosa, limitada, convexa y plana en color rosa (salmón).	2		
<i>Umbelopsis</i>	130	Colonia limitada, de aspecto vellosa y color salmón.	2		
<i>Verticillium</i>	131	Colonia limitada, radial, color blanca, aspecto vellosa-algodonosa	13		
<i>Xylariaceae</i>	132	Colonia ilimitada, vellosa en color blanco	1		
	133	Colonia limitada, de aspecto vellosa-granular en color blanco	1		

<i>Xylariales</i>	134	Colonia limitada, de aspecto veloso- algodonoso, centro abultado en color blanco.	9		
Unidentified	135	Colonia ilimitada, tiende a llenar la placa, color blanca-amarilla, aspecto veloso-algodonoso.	1		
Unidentified	136	Colonia filamentosa, ilimitada, plana, color blanco, centro café levaduriforme	1		
Unidentified	137	Colonia ilimitada, vellosa-plana, color blanco	3		
Unidentified	138	Colonia limitada, irregular, granular en color amarilla, aspecto gelatinoso	2		

Unidentified	139	Colonia limitada, aterciopelada de color blanco.	3	 A photograph of a petri dish containing a white, fuzzy, limited colony on a dark agar surface. The colony is irregular in shape and has a soft, cottony texture. The petri dish lid has some faint markings, including the number '139'.	 A microscopic view of a bacterial culture stained with a blue dye. The image shows numerous long, thin, rod-shaped bacteria, some of which are arranged in chains or bundles. The background is a light, slightly grainy blue.
--------------	-----	--	---	--	--

Anexo 2

Tabla S2. Distribución de géneros en los diferentes tejidos de *S. tigrina*.

Genus	Leaf		Pseudobulb		Root		Flower		Rhizosphere	Total	
	End	Epi	End	Epi	End	Epi	End	Epi	Epi	End	Epi
<i>Acremonium</i>	0	4	1	3	2	3	0	3	1	3	14
<i>Alternaria</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>Annulohyphoxylon</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	0
<i>Anthostomella</i>	0	2	1	3	1	1	0	0	0	2	6
<i>Aplosporella</i>	0	7	0	8	0	0	0	0	1	0	16
<i>Arthopyrenia</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	3
<i>Arthrinium</i>	2	6	2	6	2	4	0	0	6	6	22
<i>Aspergillus</i>	1	7	1	6	6	4	0	1	7	8	25
<i>Bionectria</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	3	1	3
<i>Bipolaris</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
<i>Chaetomium</i>	2	2	0	1	0	0	0	0	0	2	3
<i>Chaunopycnis</i>	1	0	0	3	1	4	0	0	1	2	8
<i>Cladophialophora</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Cladosporium</i>	0	1	1	2	0	1	0	0	1	1	5
<i>Cochliobolus</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Colletotrichum</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Curvularia</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	2	0	4
<i>Daldinia</i>	0	3	0	7	3	1	0	0	1	3	12
<i>Diaporthe</i>	0	1	0	2	0	0	0	0	1	0	4
<i>Diplodia</i>	0	2	1	0	1	0	0	0	0	2	2
<i>Elaphocordyceps</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Epichloe</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	3
<i>Eutypa</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Eutypella</i>	1	2	0	0	0	0	0	0	1	1	3
<i>Exophiala</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2
<i>Fonsecae</i>	1	2	0	3	1	1	0	1	2	2	9
<i>Fusarium</i>	2	10	2	11	4	4	0	2	5	8	32
<i>Fusicolla</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Geotrichum</i>	1	7	0	3	0	2	0	0	1	1	13
<i>Gibberella</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Hypocrea</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Hypoxylon</i>	1	0	0	3	0	1	0	0	1	1	5
<i>Letendraea</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Macrophoma</i>	0	3	0	0	2	0	0	0	1	2	4
<i>Microdiplodia</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	3
<i>Microsporium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
<i>Mucor</i>	2	5	0	7	0	2	0	1	10	2	25
<i>Nectria</i>	0	1	2	2	0	0	0	0	0	2	3
<i>Neopestalotiopsis</i>	0	4	0	4	0	1	0	0	0	0	9
<i>Nigrograna</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Ochlorocladosporium</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
<i>Paecilomyces</i>	2	1	2	1	1	3	1	0	4	6	9
<i>Paraconiothyrium</i>	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	4
<i>Penicillium</i>	8	15	11	25	16	12	0	2	14	35	68
<i>Pestalotiopsis</i>	5	1	0	4	0	0	0	0	0	5	5

<i>Phaeosphaeriopsis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Phialemoniopsis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>Phialemonium</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
<i>Phoma</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Pseudobotrytis</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Pyrenochaeta</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
<i>Pyrenochaetopsis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2
<i>Roussoella</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3
<i>Scedosporium</i>	1	5	1	1	1	3	0	0	5	3	14
<i>Schizophyllum</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Talaromyces</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Thyridaria</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Trichoderma</i>	0	22	1	22	8	28	0	2	41	9	115
<i>Trichophyton</i>	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
<i>Umbelopsis</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
<i>Verticillium</i>	0	4	0	4	0	2	0	1	2	0	13
<i>Xylariaceae</i>	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0
<i>Xylariales</i>	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Unidentified	1	0	0	3	0	3	0	0	3	1	9

Anexo 3

Tabla S3 Distribución de géneros de acuerdo al hábito de crecimiento de las plantas de *S. tigrina*.

Endófitos			
Genero	Hábito de crecimiento de las plantas		
	Epífita	Sustrato	Litófito
<i>Acremonium</i>	1	1	1
<i>Alternaria</i>	0	1	0
<i>Annulohyphoxylon</i>	0	1	1
<i>Anthostomella</i>	0	1	1
<i>Aplosporella</i>	0	0	0
<i>Arthopyrenia</i>	0	0	0
<i>Arthrinium</i>	1	3	2
<i>Aspergillus</i>	4	4	0
<i>Bionectria</i>	1	0	0
<i>Bipolaris</i>	0	0	0
<i>Chaetomium</i>	2	0	0
<i>Chaunopycnis</i>	0	1	1
<i>Cladophialophora</i>	0	0	0
<i>Cladosporium</i>	1	0	0
<i>Cochliobolus</i>	0	0	0
<i>Colletotrichum</i>	0	1	0
<i>Curvularia</i>	0	0	0
<i>Daldinia</i>	1	2	0
<i>Diaporthe</i>	0	0	0
<i>Diplodia</i>	1	1	0
<i>Elaphocordyceps</i>	0	0	0
<i>Epichloe</i>	0	0	0
<i>Eutypa</i>	0	0	0
<i>Eutypella</i>	1	0	0
<i>Exophiala</i>	0	0	0

Epifitos			
Genero	Hábito de crecimiento de las plantas		
	Epífita	Sustrato	Litófito
<i>Acremonium</i>	6	5	3
<i>Alternaria</i>	0	0	0
<i>Annulohyphoxylon</i>	0	0	0
<i>Anthostomella</i>	2	4	0
<i>Aplosporella</i>	0	16	0
<i>Arthopyrenia</i>	1	2	0
<i>Arthrinium</i>	1	20	1
<i>Aspergillus</i>	13	9	3
<i>Bionectria</i>	0	3	0
<i>Bipolaris</i>	1	0	1
<i>Chaetomium</i>	0	3	0
<i>Chaunopycnis</i>	1	7	0
<i>Cladophialophora</i>	1	0	0
<i>Cladosporium</i>	2	2	1
<i>Cochliobolus</i>	1	0	0
<i>Colletotrichum</i>	0	0	0
<i>Curvularia</i>	3	1	0
<i>Daldinia</i>	2	10	0
<i>Diaporthe</i>	1	3	0
<i>Diplodia</i>	0	2	0
<i>Elaphocordyceps</i>	0	1	0
<i>Epichloe</i>	0	3	0
<i>Eutypa</i>	1	0	0
<i>Eutypella</i>	3	0	0
<i>Exophiala</i>	1	0	1

<i>Fonsecae</i>	1	1	0
<i>Fusarium</i>	5	3	0
<i>Fusicolla</i>	0	0	0
<i>Geotrichum</i>	0	1	0
<i>Gibberella</i>	0	0	0
<i>Hypocrea</i>	0	0	0
<i>Hypoxylon</i>	0	1	0
<i>Letendraea</i>	1	0	0
<i>Macrophoma</i>	0	0	2
<i>Microdiplodia</i>	0	0	0
<i>Microsporium</i>	0	0	0
<i>Mucor</i>	2	0	0
<i>Nectria</i>	0	2	0
<i>Neopestalotiopsis</i>	0	0	0
<i>Nigrograna</i>	0	0	0
<i>Ochlorocladosporium</i>	0	0	0
<i>Paecilomyces</i>	2	4	0
<i>Paraconiothyrium</i>	0	0	0
<i>Penicillium</i>	10	22	3
<i>Pestalotiopsis</i>	5	0	0
<i>Phaeosphaeriopsis</i>	1	0	0
<i>Phialemoniopsis</i>	0	1	0
<i>Phialemonium</i>	0	1	0
<i>Phoma</i>	0	0	0
<i>Pseudobotrytis</i>	0	0	0
<i>Pyrenochaeta</i>	0	0	1
<i>Pyrenochaetopsis</i>	0	0	0
<i>Roussoella</i>	0	0	0
<i>Scedosporium</i>	2	1	0
<i>Schizophyllum</i>	0	0	0
<i>Talaromyces</i>	0	0	0

<i>Fonsecae</i>	3	5	1
<i>Fusarium</i>	9	12	11
<i>Fusicolla</i>	1	0	0
<i>Geotrichum</i>	5	1	7
<i>Gibberella</i>	0	0	1
<i>Hypocrea</i>	0	1	0
<i>Hypoxylon</i>	0	4	1
<i>Letendraea</i>	0	0	0
<i>Macrophoma</i>	1	3	0
<i>Microdiplodia</i>	1	2	0
<i>Microsporium</i>	2	0	0
<i>Mucor</i>	12	11	2
<i>Nectria</i>	0	3	0
<i>Neopestalotiopsis</i>	0	9	0
<i>Nigrograna</i>	0	1	0
<i>Ochlorocladosporium</i>	1	1	0
<i>Paecilomyces</i>	1	5	3
<i>Paraconiothyrium</i>	3	1	0
<i>Penicillium</i>	21	44	3
<i>Pestalotiopsis</i>	3	2	0
<i>Phaeosphaeriopsis</i>	0	0	0
<i>Phialemoniopsis</i>	0	1	0
<i>Phialemonium</i>	0	1	0
<i>Phoma</i>	0	1	0
<i>Pseudobotrytis</i>	0	1	0
<i>Pyrenochaeta</i>	0	1	0
<i>Pyrenochaetopsis</i>	1	0	1
<i>Roussoella</i>	2	1	0
<i>Scedosporium</i>	5	6	3
<i>Schizophyllum</i>	1	0	0
<i>Talaromyces</i>	1	0	0

<i>Thyridaria</i>	0	0	0
<i>Trichoderma</i>	3	4	2
<i>Trichophyton</i>	0	0	0
<i>Umbelopsis</i>	0	0	0
<i>Verticillium</i>	0	0	0
<i>Xylariaceae</i>	1	1	0
<i>Xylariales</i>	0	0	0
No identificados	0	0	1

<i>Thyridaria</i>	1	0	0
<i>Trichoderma</i>	33	67	15
<i>Trichophyton</i>	1	0	1
<i>Umbelopsis</i>	0	2	0
<i>Verticillium</i>	3	9	1
<i>Xylariaceae</i>	0	0	0
<i>Xylariales</i>	0	9	0
No identificados	5	2	2

Anexo 4. Cromatogramas

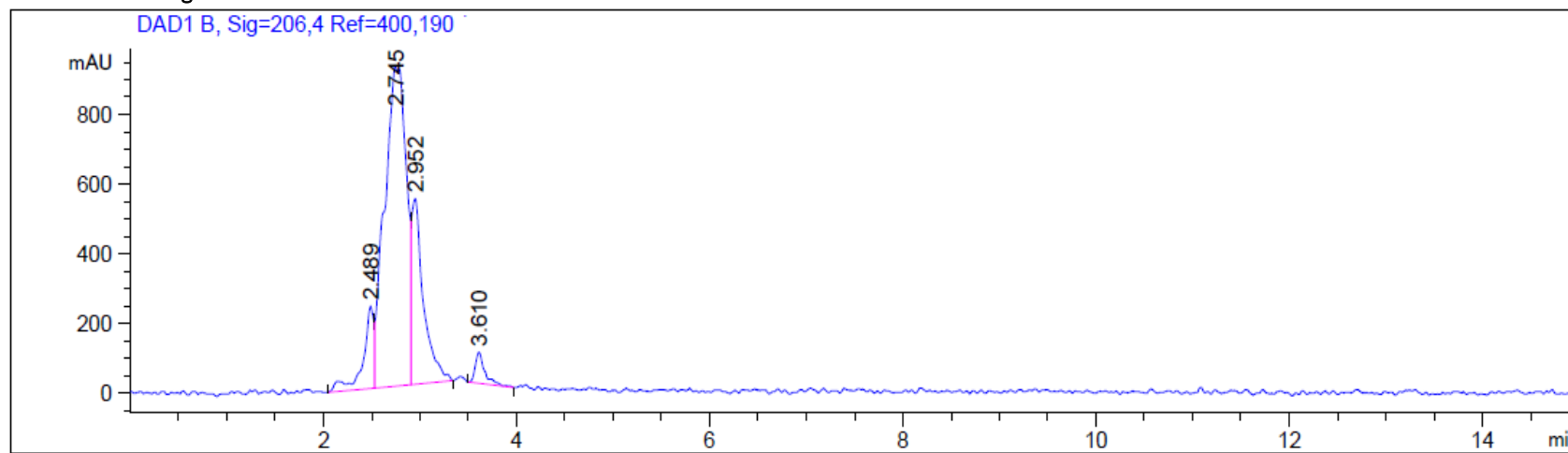


Figura S1. Producción de giberelinas aislado STF62 por HPLC. Se muestra el cromatograma de la muestra con varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.745 minutos.

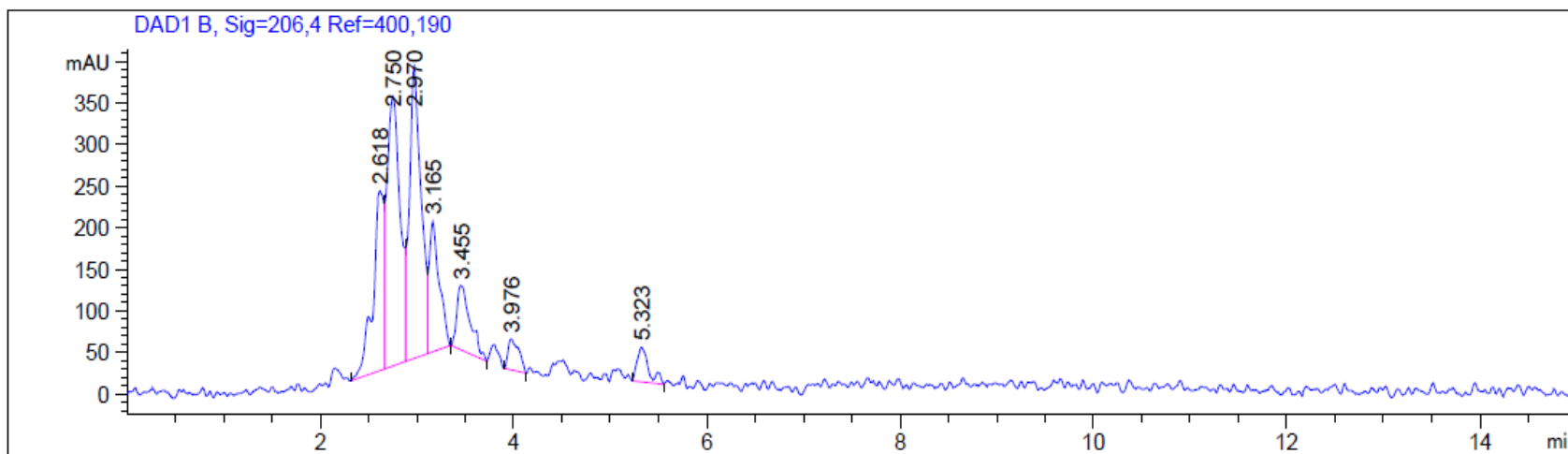


Figura S2. Producción de giberelinas aislado STF147 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.750 minutos.

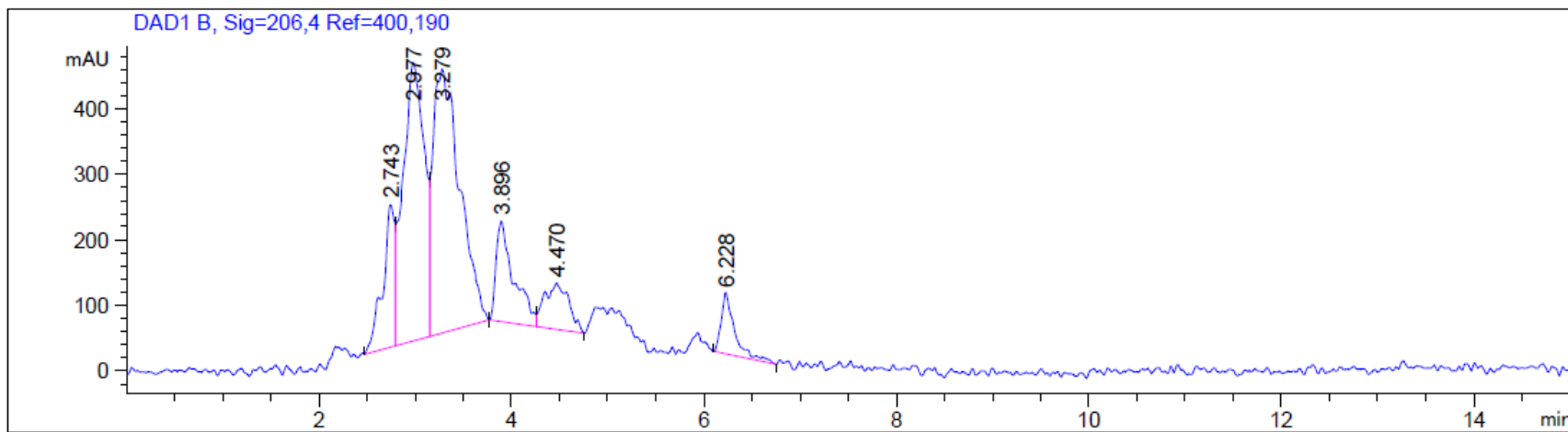


Figura S3. Producción de giberelinas aislado STF149 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.743 minutos.

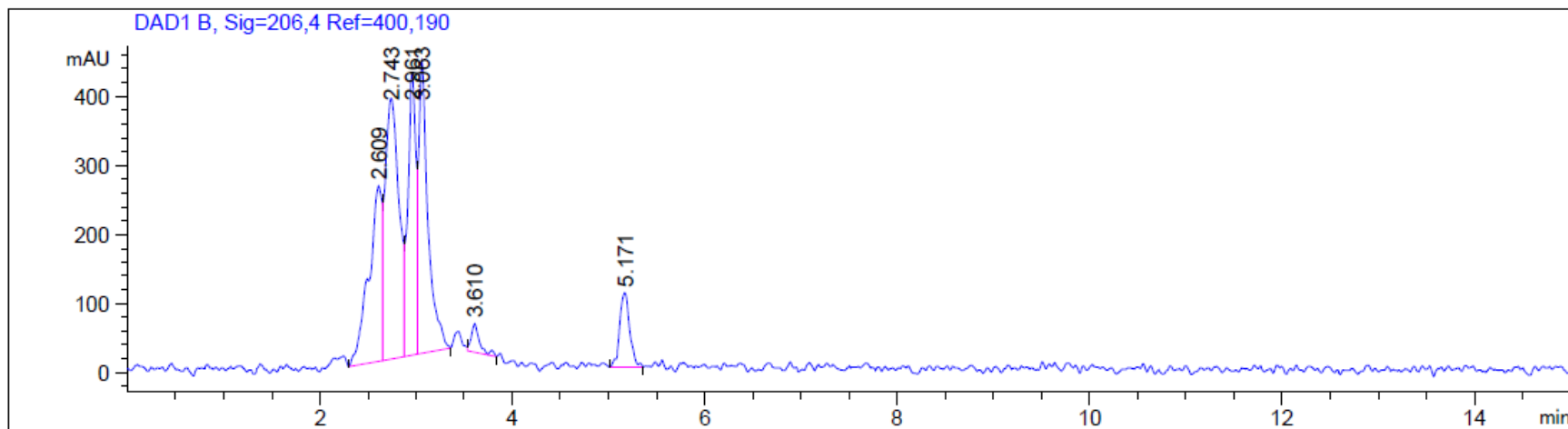


Figura S4. Producción de giberelinas aislado STF282 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.743 minutos.

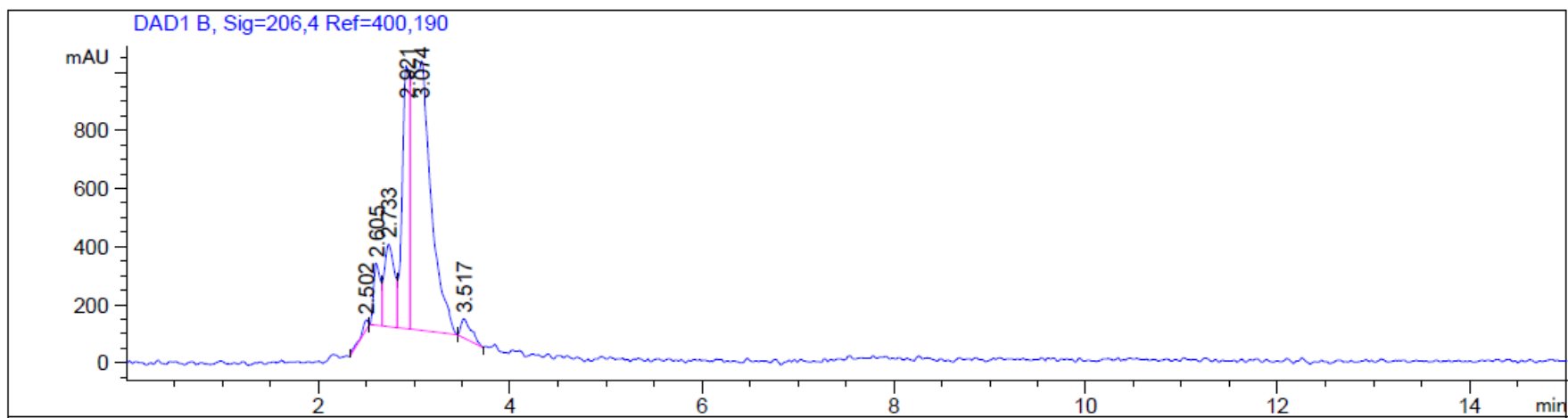


Figura S5. Producción de giberelinas aislado STF343 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.733 minutos.

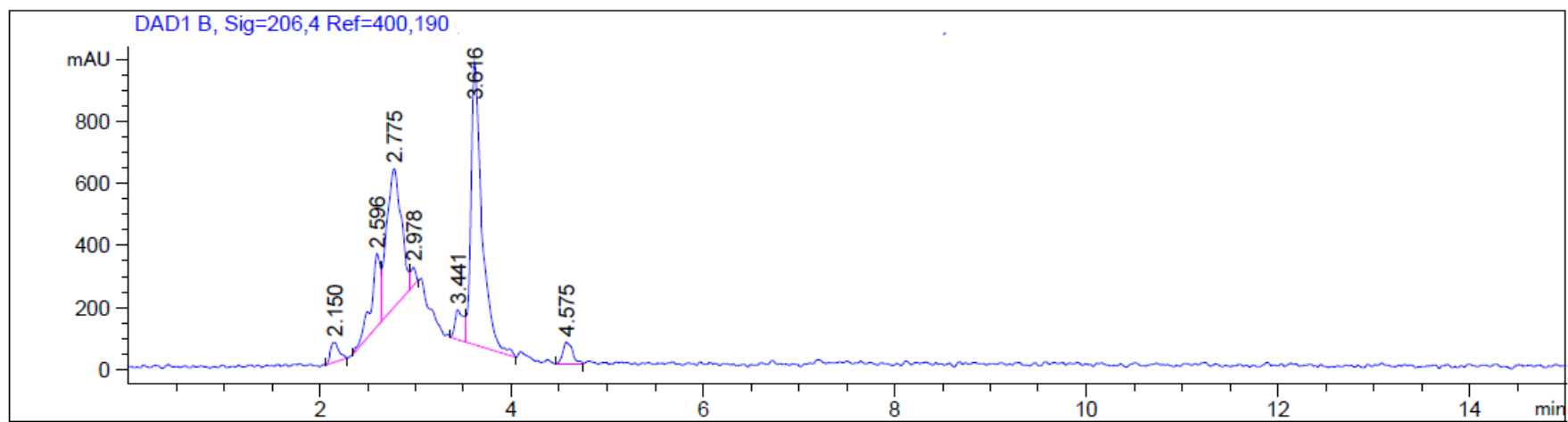


Figura S6. Producción de giberelinas aislado STF524 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.775 minutos.

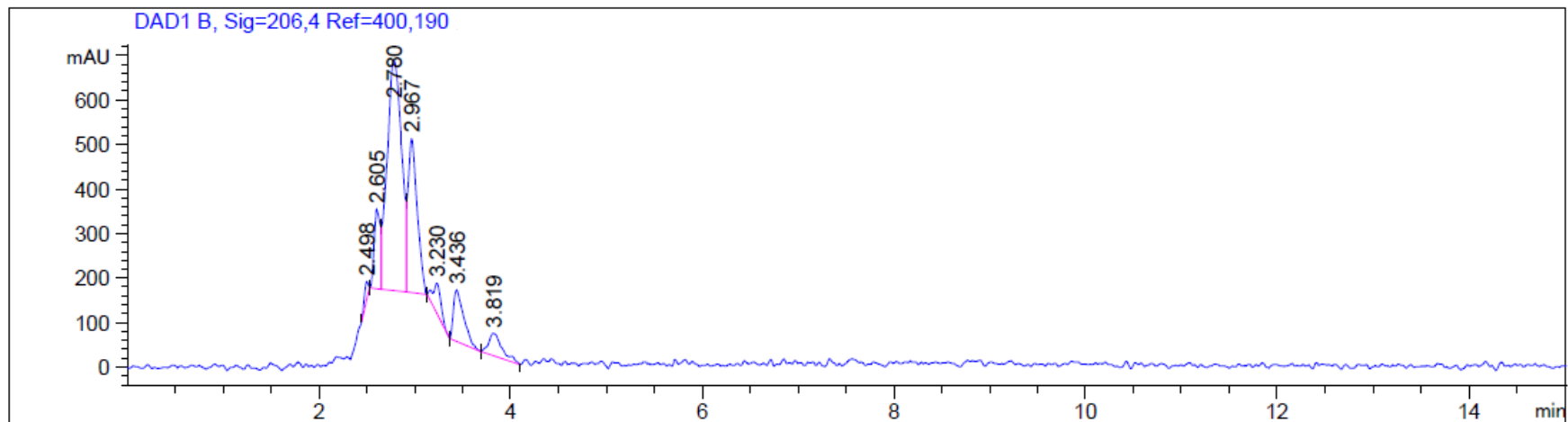


Figura S7. Producción de giberelinas aislado STF526 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.780 minutos.

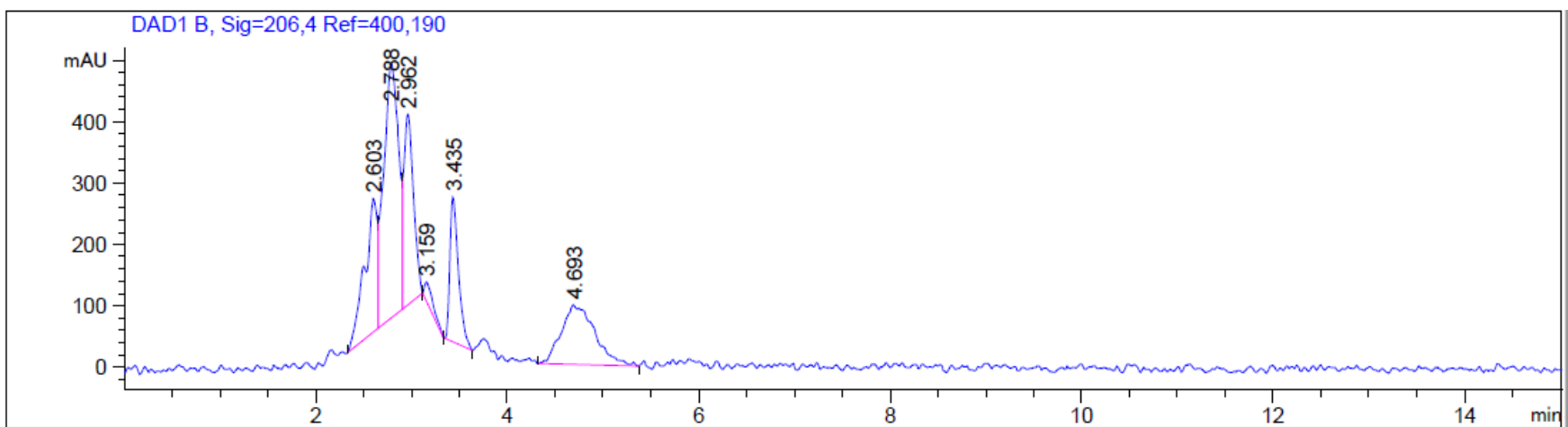


Figura S8. Producción de giberelinas aislado STF538 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.788 minutos.

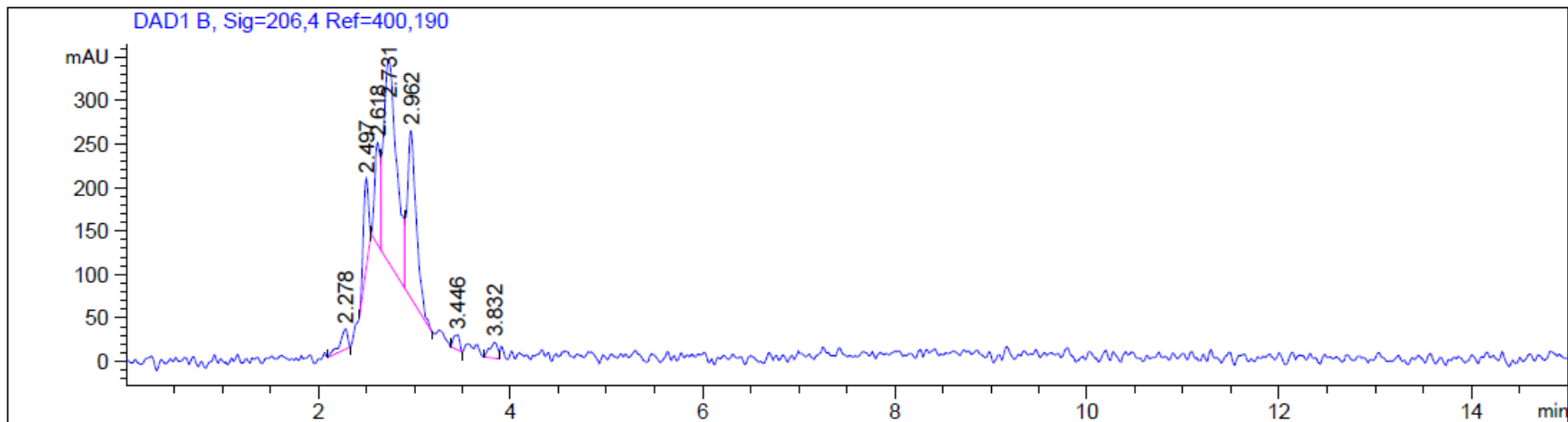


Figura S9. Producción de giberelinas aislado STF591 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.731 minutos.

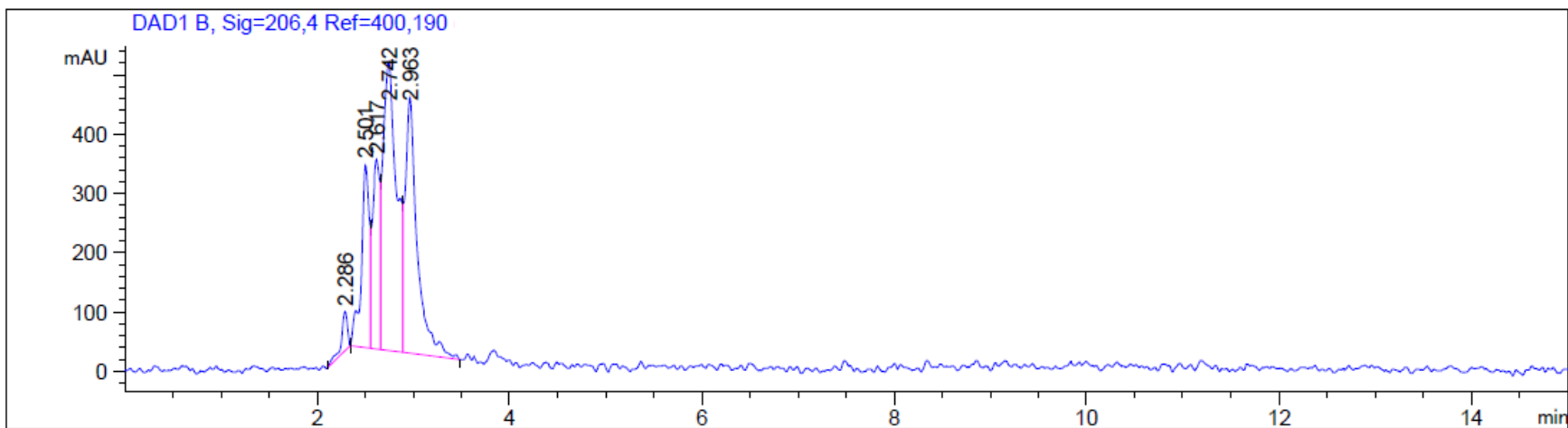


Figura S10. Producción de giberelinas aislado STF599 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.742 minutos.

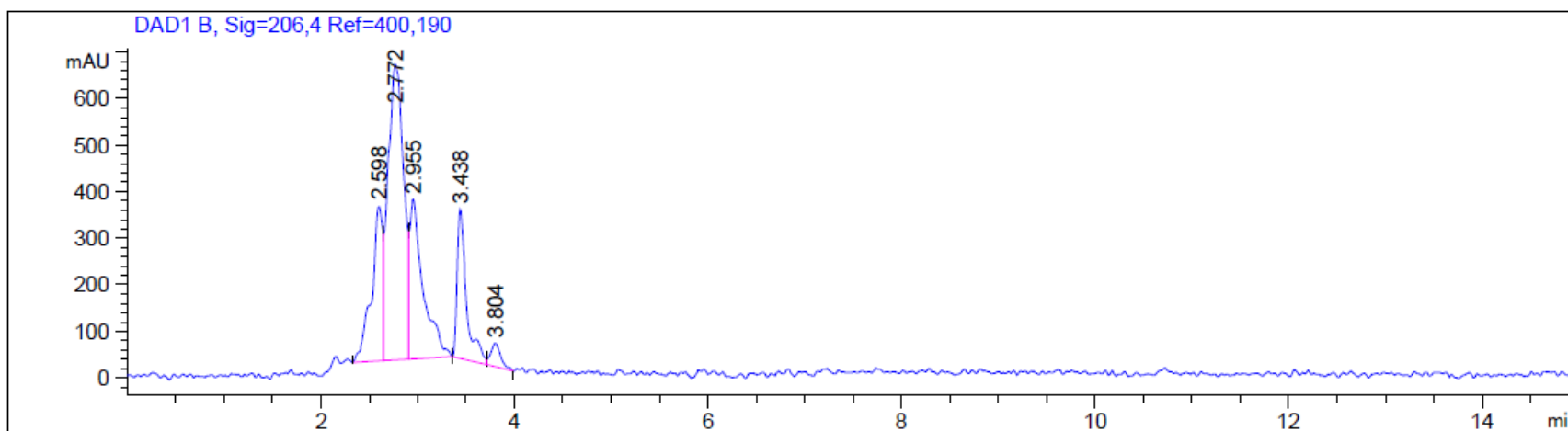


Figura S11. Producción de giberelinas aislado STF624 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.772 minutos.

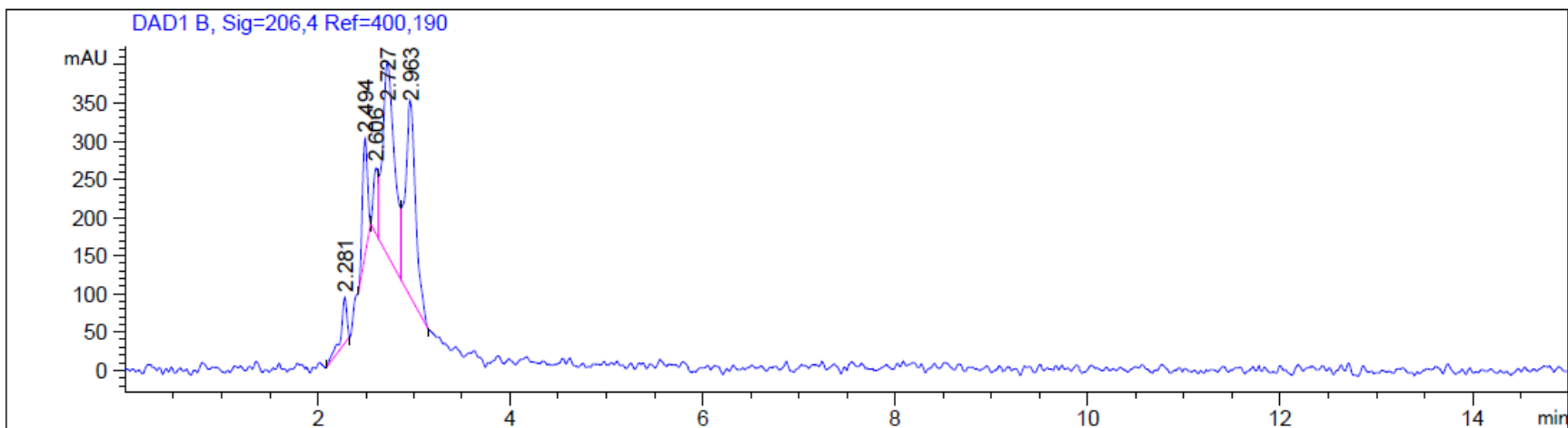


Figura S12. Producción de giberelinas aislado STF654 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.727 minutos.

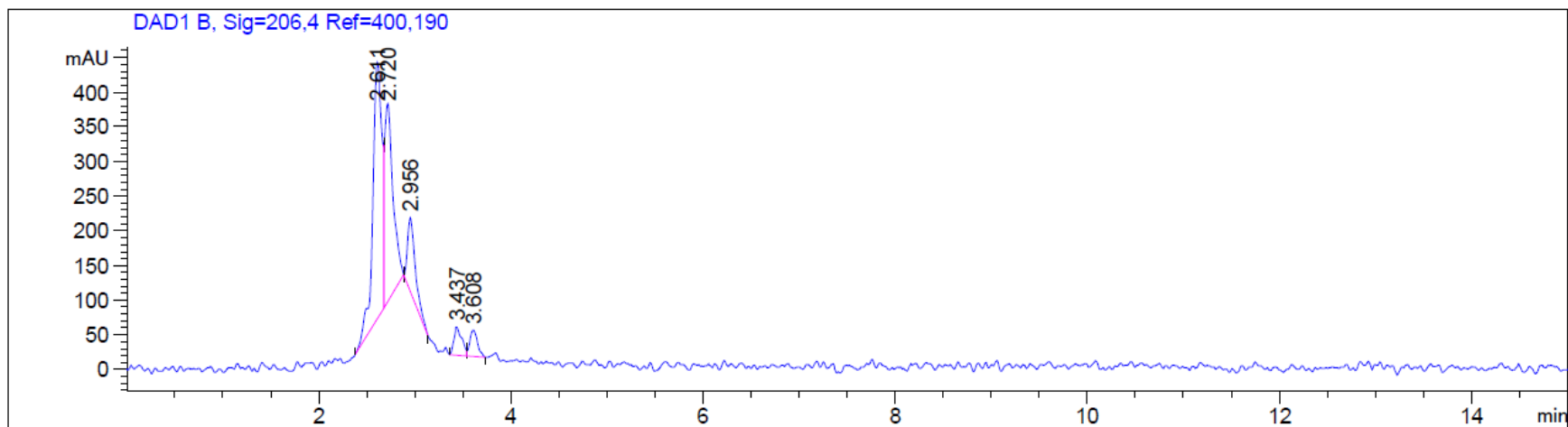


Figura S13. Producción de giberelinas aislado STF664 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.720 minutos.

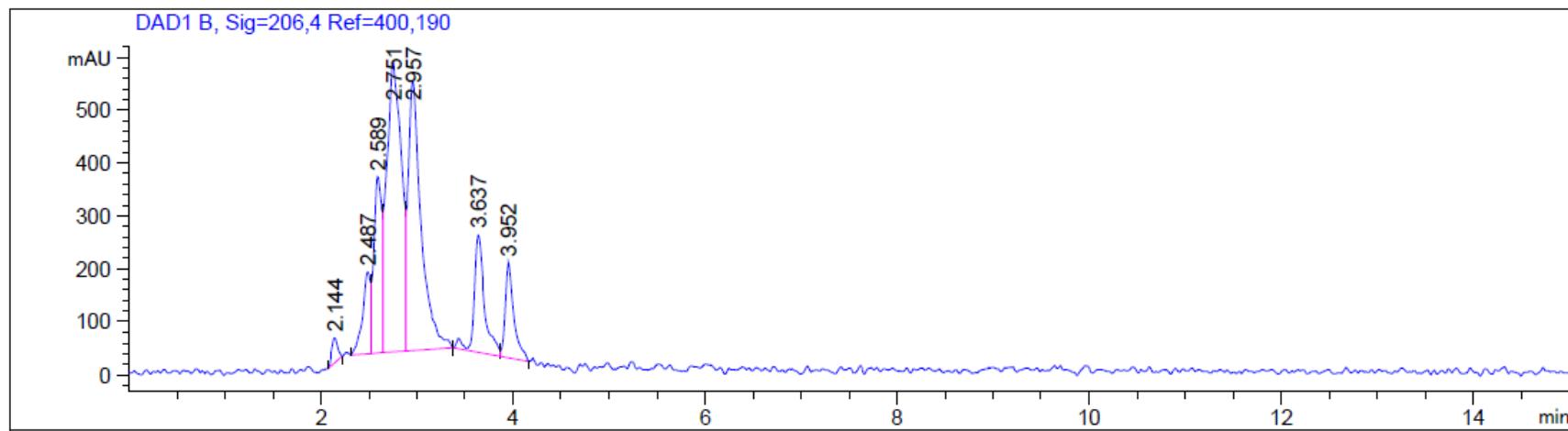


Figura S14. Producción de giberelinas aislado STF673 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.751 minutos.

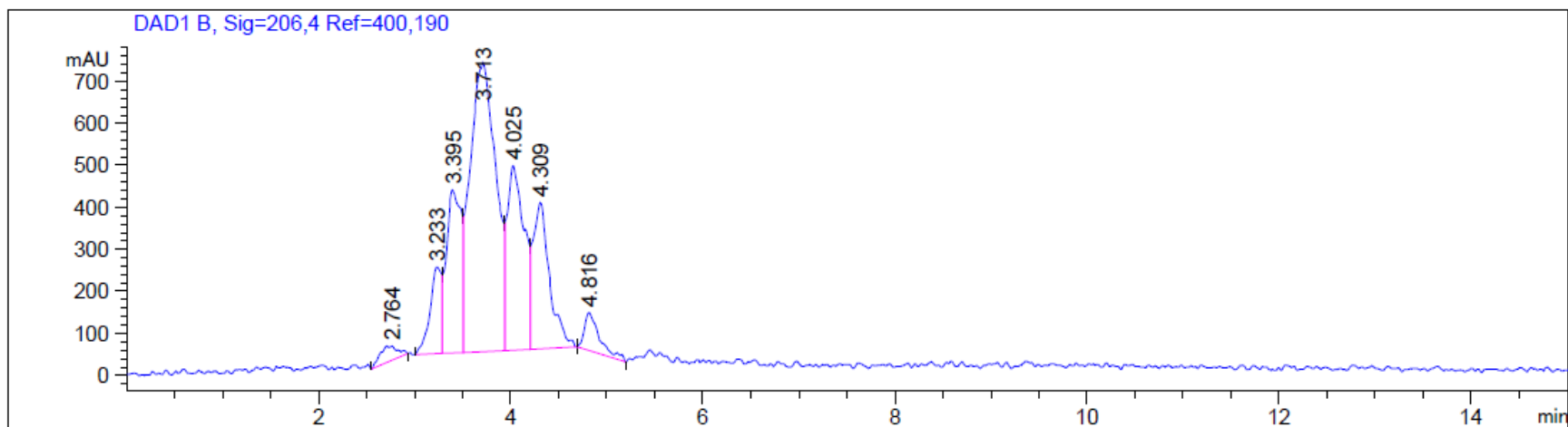


Figura S15. Producción de giberelinas aislado STF723 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.764 y GA₄ 4.025 minutos.

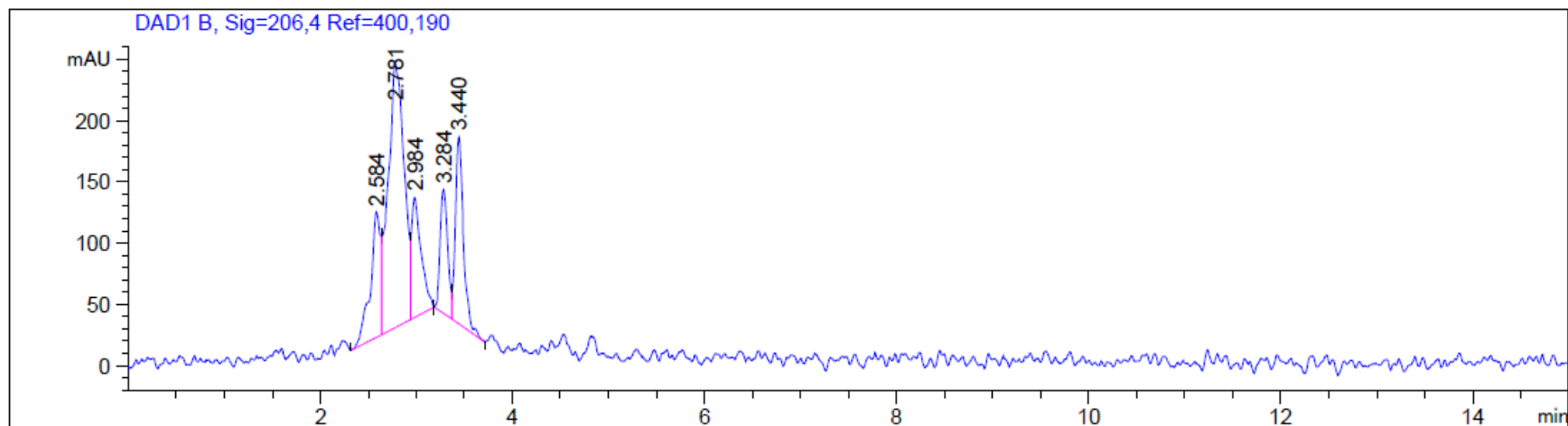


Figura S16. Producción de giberelinas aislado STF753 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.781 minutos.

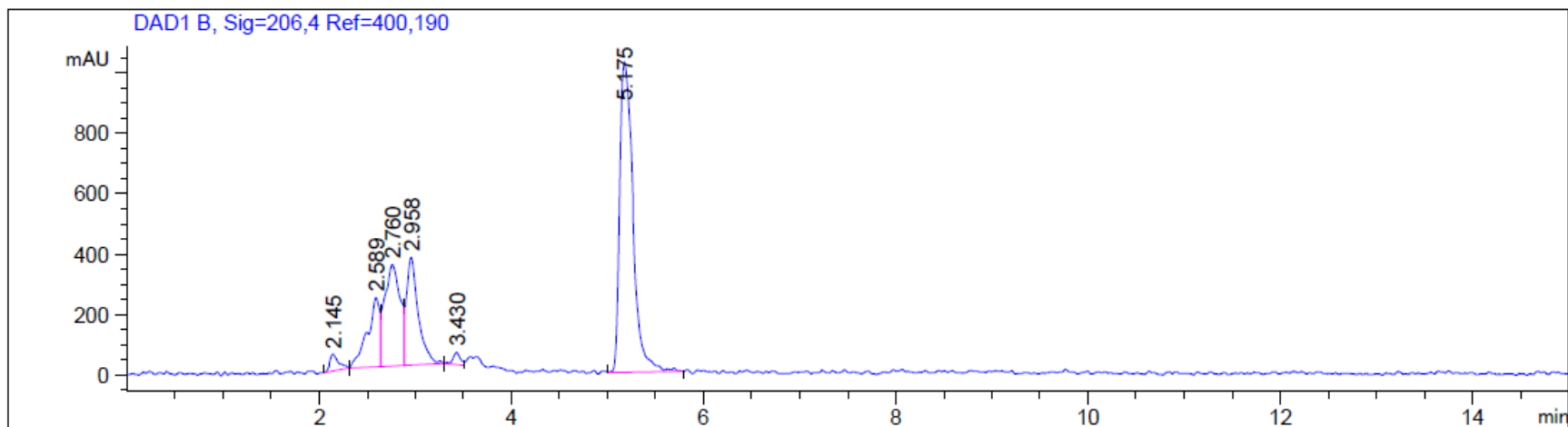


Figura S17. Producción de giberelinas aislado STF756 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.760 minutos.

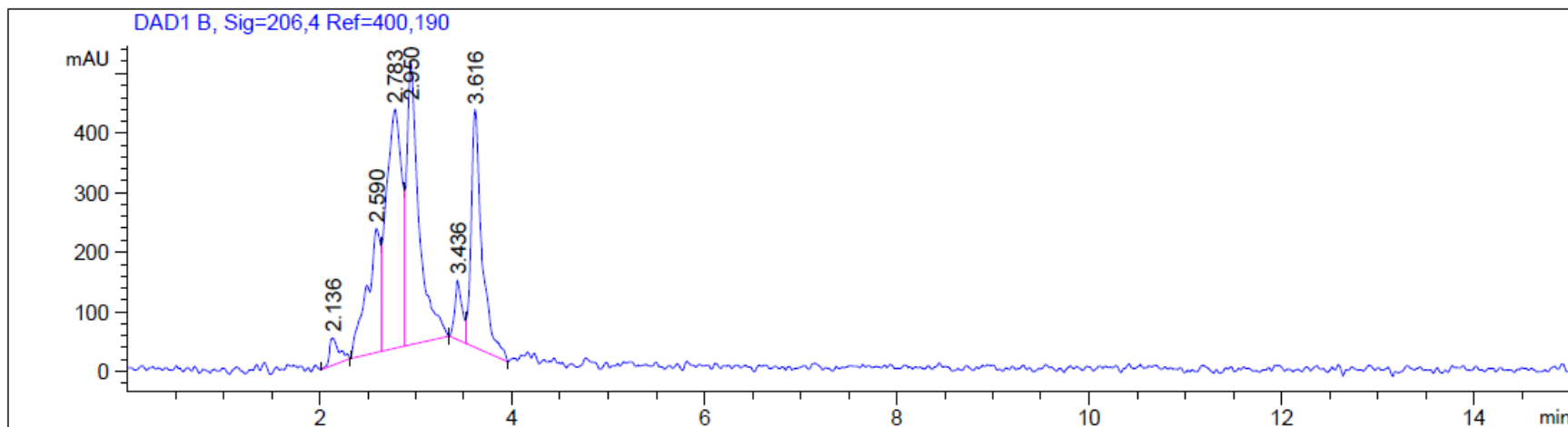


Figura S18. Producción de giberelinas aislado STF757 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.783 minutos.

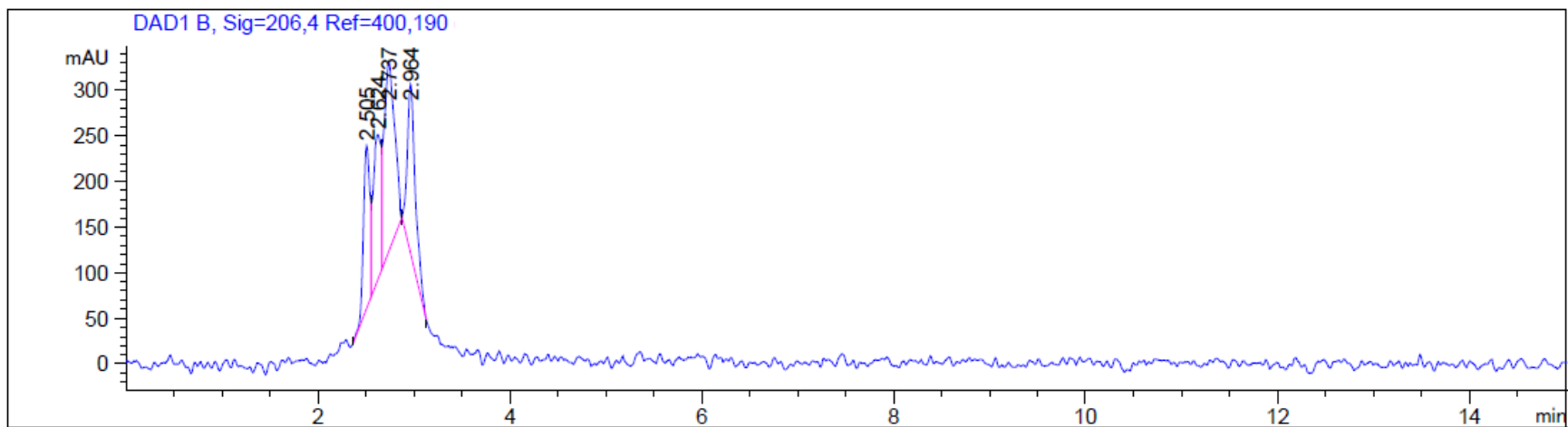


Figura S19. Producción de giberelinas aislado STF859 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.737 minutos.

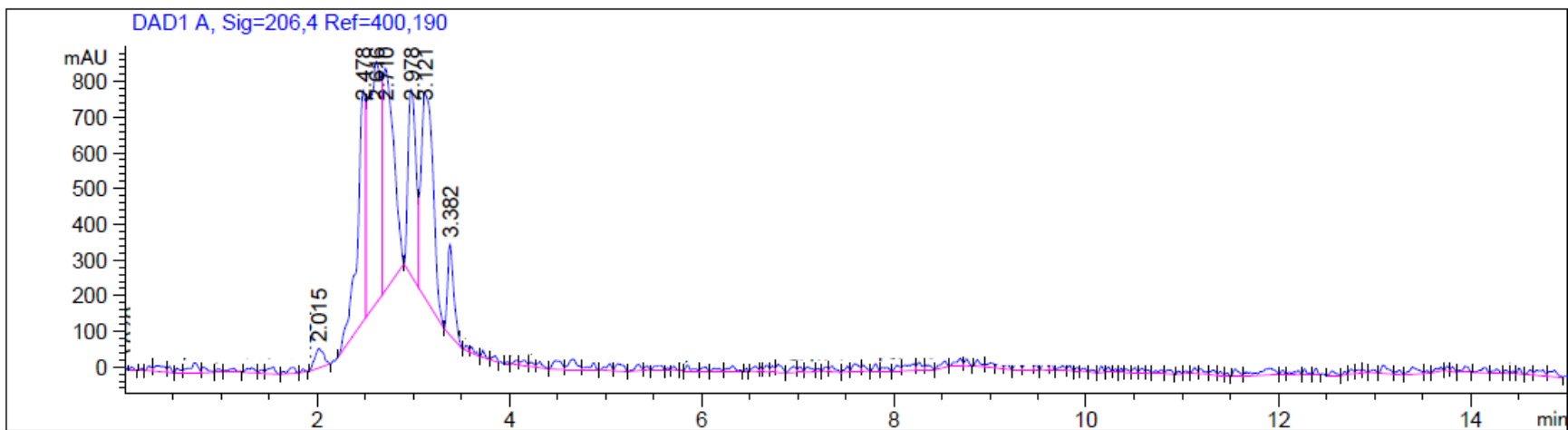


Figura S20. Producción de giberelinas aislado STF860 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.478 minutos.

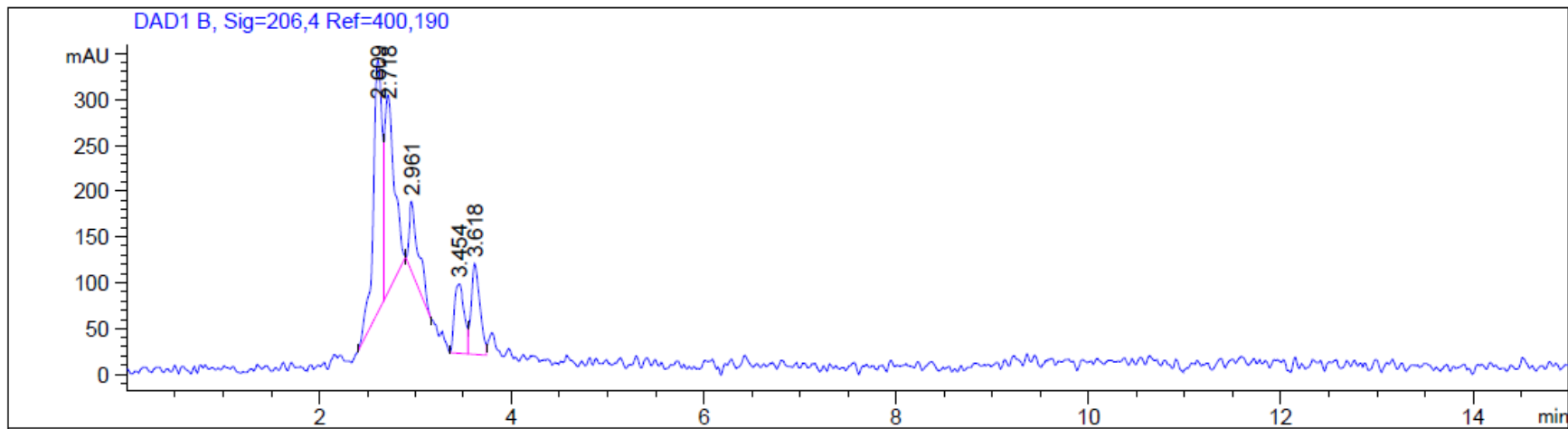


Figura S21. Producción de giberelinas aislado STF864 por HPLC. El cromatograma muestra varios picos dentro de los que se observa la GA₃ con un RT de 2.718 minutos.

Anexo 5. Medios de cultivo

Caldo de cultivo ICI

Ingredientes

8% Glucosa

0.48 g/l NH_4NO_3

5 g/l KH_2PO_4

1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Elementos traza (2ml)

Solución elementos traza

0.1g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.015g $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0.161g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.01g $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.01g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 24\text{H}_2\text{O}$

Disolver en 100ml de agua desionizada.

La solución de elementos fue esterilizada por filtración.

El caldo de cultivo sin los elementos traza fue esterilizado en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión, una vez estéril se le adicionaron 2ml de la solución de elementos traza previamente filtrada.

Caldo de cultivo Czapek

Ingredientes

1% glucosa

1% peptona

0.05% KCl

0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Los elementos se agitaron para disolver y se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio Extracto de Malta

Ingredientes

8g Extracto de malta

8g Agar

Se aforó a 400ml, se agitó hasta disolver y esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio LB

Ingredientes

2g Extracto de levadura

4g Peptona de caseína

4 ClNa

7g Agar bacteriológico

Se aforó a 400ml, se agitó hasta disolver y esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio mínimo

Ingredientes para un litro

16 g Agar bacteriológico
10 g Extracto de levadura
10 g Caseína
10 g Glucosa
250 µl Vitaminas
1.2 g K₂HPO₄
0.62 g KH₂PO₄
0.05 g CaCl₂·6H₂O
0.20 g MgSO₄·7H₂O
0.10 g NaCl
1.0 mg FeCl₃·6H₂O
0.5 µg (NH₄)₂SO₄
5 µg CuSO₄·5H₂O
10 µg MnSO₄·2H₂O
10 µg Na₂MoO₄·2H₂O
10 µg H₃BO₃
70 µg ZnSO₄·7H₂O
5 µg CoCl₂·6H₂O

½ Medio MS (Medio Murashige y Skoog)

Ingredientes para un litro

3.1 mg H₃BO₃
166.1 mg CaCl₂
0.0125 mg CoCl₂
85 mg K₂HPO₄
0.125 mg Na₂MoO₄·2H₂O
18.63 mg Na₂.EDTA
825 mg (NH₄)(NO₃)
950 mg KNO₃
0.0125 mg CuSO₄·5H₂O
8.45 mg MnSO₄·H₂O
4.3 mg ZnSO₄·7H₂O
13.9 mg FeSO₄·7H₂O
0.415 mg KI
1 g Carbón activado
2 % Sacarosa
0.8 % Agar

Se aforó a un litro, se agitó hasta disolver y esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio Nutritivo

Ingredientes

1.2 g Extracto de levadura
2 g Peptona de caseína
6 g Agar bacteriológico

Se aforó a 400 ml, se agito hasta disolver y esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio OMA (Agar Harina de Avena)

Ingredientes

1.2 g Harina pulverizada de avena

2.8 g Agar bacteriológico

0.04 g Extracto de levadura

Se aforó a 400 ml, se agitó hasta disolver y esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio PDA

Ingredientes

13 g PDA

Se aforó a 400 ml, se agitó hasta disolver y esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio V8

Ingredientes

100 ml jugo de verduras V8

1 g CaCO₃

7.5 g agar bacteriológico

Se aforó a 400 ml, se agitó hasta disolver y esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

Medio YEPD (Extracto de levadura peptona dextrosa)

Ingredientes

8 g Dextrosa

4 g Extracto de levadura

8 g Peptona de caseína

Se aforó a 400 ml, se agitó hasta disolver y esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión.

Anexo 6. Tinciones

Tinción con lactofenol azul de algodón

En esta tinción se utilizan colorantes para teñir células y aumentar su contraste, de modo que se puedan observar con facilidad en el microscopio de campo claro. Para lograr observar las estructuras de los hongos filamentosos se utilizó la tinción con azul de lactofenol.

20 ml Agua destilada
20 gr Cristales de fenol
20ml Ácido láctico
20ml Glicerina
0.05g Azul de algodón

Preparación

- Disolver el fenol en el agua
- Agregar el ácido y la glicerina
- Calentar a 70°C
- Adicionar el colorante
- Guardar en frasco.

Tinción de Gram

Procedimiento:

- Fijar la muestra con metanol durante un minuto o al calor.
- Agregar azul violeta y esperar un minuto.
- Enjuagar con agua no directamente sobre la muestra.
- Agregar lugol y esperar un minuto aproximadamente.
- Agregar alcohol acetona y esperar entre 5 y 30 segundos según la concentración del reactivo (parte crítica de la coloración).
- Enjuagar con agua.
- Tinción de contraste agregando safranina y esperar un minuto.
- Lavar levemente con agua.