

**Hongos endófitos de *Prosthechea michuacana*  
del cerro Uyuca, Honduras**

**Luis Gamundi Berenguer**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano  
Honduras**

Noviembre, 2019

ZAMORANO  
CARRERA DE AMBIENTE Y DESARROLLO

# **Hongos endófitos de *Prosthechea michuacana* del cerro Uyuca, Honduras**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero en Ambiente y Desarrollo en el  
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Luis Gamundi Berenguer**

**Zamorano, Honduras**  
Noviembre, 2019

## Hongos endófitos de *Prosthechea michuacana* del cerro Uyuca, Honduras

Luis Gamundi Berenguer

**Resumen.** Endófitos son simbioses presentes en los tejidos vegetales de las plantas llegando a su hospedero mediante interacciones con el ambiente, organismos y el suelo; por tanto las plantas adultas han tenido un mayor tiempo para acumularlos. Su extracción y aislamiento representan un reto ya que se necesita tejido vivo y nutrientes específicos en los medios para su aislamiento. Poco se sabe actualmente de la diversidad y los beneficios que pueden tener estos organismos asintomáticos. En este estudio se aislaron hongos endófitos a partir de las raíces de *Prosthechea michuacana* con el fin de identificarlos. Se realizaron aislamientos de los hongos presentes en el suelo de la rizosfera de esta orquídea. Las muestras se recolectaron de cuatro individuos en estado silvestre ubicados en el cerro Uyuca. Estos presentaron tres condiciones en común: una colonia de al menos cuatro bulbos, un tamaño mínimo del bulbo de 6 cm y raíces sanas y mayores a 15 cm. El aislamiento de los endófitos se realizó en Agar V8 acidificado. Para su identificación se evaluaron características morfológicas macroscópicas y microscópicas, después se realizaron dos metodologías para la extracción de ADN de estos simbioses. Los resultados mostraron que los hongos del género *Rhizoctonia* sp. son endófitos obligados, ya que no se vio presencia de este género en las muestras de suelo. Los géneros de hongos predominantes en los aislamientos de las raíces de *Prosthechea michuacana* fueron *Penicillium* y *Rhizoctonia*. Se usaron diferentes técnicas de extracción de ADN, de las cuales “CTAB” produjo las mejores concentraciones.

**Palabras clave:** Endosimbiontes, orquídea, rizosfera, simbiote.

**Abstract.** Endosymbionts are micro-organisms residing in plant tissues. Plants acquire endosymbionts from their surroundings including soil or other plants, thus older individuals have had more time to accumulate them. Their extraction and maintenance represents a challenge as they reside in living tissue and have specific nutritional requirements. Research on endophytes is a new and evolving scientific field and we still know very little about asymptomatic endophytes. The present study consisted of isolating endophytic fungi from roots of *Prosthechea michuacana* and from associated soil with the goal of identifying these. Four plants from different parts of Mt. Uyuca, Honduras were sampled. Plants were selected based on being mature and healthy; at least four bulbs greater than 6 cm and having roots exceeding 15 cm in length. The fungi were isolated in acidified V8 nutrient agar to study macroscopic and microscopic characters. Subsequently, DNA was extracted from each isolate. Fungi of the Genus *Rhizoctonia* were found to be obligate endosymbionts not present in soil samples. The predominant genera found were *Penicillium* and *Rhizoctonia* species. Several DNA extraction techniques were used of which “CTAB” produced the best DNA yield.

**Key words:** Endosymbiont, orchid, rhizosphere, symbiont.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Página de firmas .....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos .....	v
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. METODOLOGÍA.....</b>	<b>3</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>16</b>
<b>5. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>17</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>18</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>20</b>

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURA Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Aislamientos de hongos en medio Agar V8. ....	8
2. Identificación de hongos endófitos presentes en las raíces de <i>Prosthechea michuacana</i> . ....	9
3. Concentraciones de ADN de los dos métodos aplicados.. ....	12
4. Identificación de hongos presentes en el suelo cercano de <i>Prosthechea michuacana</i> . ....	13
5. Resumen de la frecuencia absoluta y relativa de los aislamientos de endófitos. .	15
Figura	Página
1. Fotografía del crecimiento de los explantes en medio PDAac. [a] Día de siembra de los explantes, [b] 6 días después de la siembra, [c] 24 días después de la siembra. ....	7
Anexos	Página
1. Preparación de 1 litro de medio Agar Agua. ....	20
2. Preparación de 1 litro de medio Agar de verdura V8 acidificado. ....	20
3. Protocolo para la preparación y siembra de explantes para diagnóstico. ....	20
4. Protocolo para siembra de hongos. ....	21
5. Protocolo para análisis de microorganismos en suelo. ....	22
6. Protocolo para la extracción de ADN de hongos (modificado), extracción método CTAB phenol: cloroformo: isoamyl alcohol (25:24:1). ....	22
7. Protocolo para extracción de ADN de hongos MODIFICADO, Extracción método phenol: cloroformo: isoamil alcohol (25:24:1). ....	23
8. Protocolo para la preparación de PCR master mix con primer universales. ....	24
9. Protocolo para electroforesis en gel. ....	25
10. Fotos de <i>Prosthechea michuacana</i> . ....	26

## 1. INTRODUCCIÓN

El término endófito hace referencia a los organismos que viven y se desarrollan dentro de otros. A través de los años este término ha cobrado distintos significados Léveillé en 1846 los describe como organismos fúngicos que habitan en el interior de las plantas. Esta descripción se queda muy corta, ya que Carroll (1986) los define como cualquier organismo que habita asintóticamente en el tejido vivo de una planta. En esta nueva descripción se incluyen bacterias y otros organismos como agentes endófitos. Posteriormente, Wilson (1995) los describe como hongos y bacterias que colonizan el tejido vivo de las plantas durante toda su vida, siendo asintomáticos. En esta definición se excluye a las micorrizas, ya que en ocasiones producen deformaciones en el sistema radicular de las plantas.

Los hongos endófitos son simbioses presentes en el tejido intercelular y/o intracelular de las plantas y pueden estar presentes en las raíces, tallo y hojas. A pesar de ser asintomáticos hay excepciones que presentan un pequeño grado de patogenicidad, ya que algunos están relacionados con hongos fitopatógenos (Carroll, 1988). Por lo tanto, sus relaciones van desde lo simbiótico a lo patogénico. Estos pueden cambiar su comportamiento dependiendo de factores ambientales y el estrés que presente su hospedero (Schulz y Boyle, 2005). Según Strobel y Daisy (2003), los endófitos son una fuente importante de innovación debido a su potencial para usos industriales, médicos y agrícolas.

Poco se sabe actualmente de estos organismos, sin embargo, ya se han reportado algunas propiedades antibióticas, antimicóticas, inmunosupresoras y compuestos anticancerígenos producidos por estos organismos (Strobel, Daisy, Castillo y Harper, 2004). Los endófitos son de vital importancia para el desarrollo de las plantas, ya que les proporcionan un mejor sistema inmunitario. Un estudio hecho sobre las asociaciones de endófitos en las ramas del cacao demostró que estos hongos previenen, retrasan y atacan la enfermedad por muerte vascular (Asman, Amin, Rosmana y Abdullah, 2018). Esto demuestra su capacidad como agentes de control biológico. Hay que tener en cuenta que este tipo de hongos varían entre las distintas familias de plantas, por lo tanto, muchos son tanto endófitos como fitopatógenos. El efecto de estos en su hospedero es el que determina su clasificación.

Otras cualidades de interés sobre estos hongos son sus propiedades antagónicas con bacterias. Según González (2015), hongos aislados a partir de muestras de *Piper aduncum* mostraron propiedades antagónicas en *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Es necesario realizar más estudios para saber qué posibles aplicaciones tienen. En la actualidad existe la venta de semillas infectadas con endófitos, lo que les confiere protección contra herbívoros y resistencia a patógenos (Gamboa-Gaitán, 2006). Estas semillas aportan otros beneficios como la reducción en el uso de agroquímicos o resistencia a sequías.

Este estudio se centró en los endófitos presentes en raíces de *Prosthechea michuacana*, una planta terrestre perteneciente a la familia Orchidaceae. El lugar de recolección de las muestras fue El Cerro del Uyuca. Esta orquídea no está amenazada y se encuentra entre los 1,300 y 1,700 msnm (Parrales, 2015). Entre algunas de sus cualidades están su resistencia a condiciones extremas y sus propiedades medicinales. Sus colonias están conformadas por grupos de bulbos conectados por rizomas, cada bulbo florece una sola vez. Sus raíces son largas y presentan crecimiento horizontal, sus bulbos sirven como reserva de agua en época seca. Como con cualquier otra planta los individuos más viejos y grandes tienen un mayor tiempo de acumulación de endófitos, siendo los individuos más prometedores.

*Prosthechea michuacana* ha sido utilizada por mucho tiempo en la medicina tradicional para tratar heridas y/o reducir inflamaciones, volviéndola una planta de interés potencial para la medicina moderna. A partir de los bulbos de esta orquídea se extrajeron cuatro flavonoides con propiedades hepatoprotectoras (Perez Gutierrez, Anaya Sosa, Hoyo Vadillo y Cruz, 2011). Se realizaron ensayos en ratas y los resultados eran comparables con la droga comercial Silibinin. En muchos casos los compuestos medicinales de las plantas son sintetizados por endófitos. Estos organismos también cumplen la función de anticuerpos en las plantas, ya que las protegen de otros patógenos. Si se lograsen aislar, identificar y reproducir endófitos benéficos, se reduciría la presión sobre las plantas medicinales y se facilitaría la producción comercial de los extractos médicos.

Un estudio exhaustivo de los endófitos presentes en las raíces de *Prosthechea michuacana* requiere de mucho tiempo y recursos. Esto no significa que enfocarse en un solo tipo de microorganismos como los hongos sea algo fácil. Según Bayman y Otero (2006) existen tres problemas para el estudio de los hongos endófitos. El primero es que los hongos no esporulan en medios de cultivo sintéticos, por lo que se suelen clasificar en morfo-especies. El segundo es que muchos de estos hongos son especies nuevas y no encajan en los taxones ya descritos. El último es que muchos de los hongos presentes en el tejido vivo no crecen en los medios de cultivo, por lo tanto, solo logramos aislar una pequeña porción de toda la población.

La composición de los medios de cultivo influye el crecimiento de los endosimbiontes. Muchos de estos microorganismos varían en sus requerimientos nutricionales y a esto se debe su selectividad de medios sintéticos. Otra limitante es el tiempo, debido a lo complejo que son los procesos de extracción de ADN se dificulta la identificación genética de los hongos. En vista de lo anterior se plantearon los siguientes objetivos para este estudio:

- Aislar hongos endófitos presentes en las raíces de *Prosthechea michuacana*.
- Determinar morfológicamente el género de hongos predominante en las muestras de *Prosthechea michuacana*.
- Identificar genéticamente los hongos aislados en las muestras de *Prosthechea michuacana*.

## 2. METODOLOGÍA

### **Recolección de muestras.**

Se recolectaron cuatro individuos (bulbos con raíces) de *Prosthechea michuacana* ubicados en la zona de barlovento del Cerro Uyuca, entre un rango altitudinal de 1,300 a 1,500 msnm. Las características que se consideraron para seleccionarlos fueron las siguientes:

- Presencia de una planta bien desarrollada (mínimo cuatro bulbos)
- Tamaño del bulbo (mínimo 6 cm)
- Raíces sanas y mayores a los 15 cm de largo

Se extrajo únicamente un bulbo por colonia y se almacenaron en una bolsa plástica. Al extraer el bulbo con las raíces se tuvo mucho cuidado en evitar el daño radicular y almacenarlos con el suelo que las rodeaba.

### **Preparación de medio de cultivo para siembra de explantes y trasplantes.**

La palabra endófito hace referencia a diferentes microorganismos como son bacterias, hongos, algas, entre otros. Por motivos de tiempo se realizaron únicamente aislamientos de hongos y a eso se debe la acidificación de los medios de cultivos con ácido tartárico. Se prepararon 250 mL de Agar Papa Dextrosa Acidificado (PDAac) con la siguiente formulación:

Medio PDAac

- 9.75 g de PDA
- 247.5 mL de Agua Destilada
- 2.5 mL de Ácido Tartárico

Para preparar los medios de cultivo se siguieron los protocolos establecidos por el Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación molecular de Zamorano. Primero se midieron 247 mL de agua destilada en una probeta de 250 mL. El agua destilada se vertió en un beaker de 400 mL, el cual fue calentado en un microondas durante 3 minutos. Se pesaron y agregaron 9.75 g de PDA al beaker, este fue colocado en un agitador y calentador magnético. Se esperó hasta que el medio empezara a hervir y se retiró de la plancha. Se vertió el líquido en un recipiente con tapón de 250 mL, el cual fue esterilizado previamente durante 40 minutos en el autoclave. Al finalizar el tiempo se movió el recipiente a la cámara flujo laminar previamente desinfectada con alcohol al 70%. Después de esperar 40 minutos para que se enfriase el medio de cultivo, se agregaron 2.5 mL de ácido tartárico. Se prepararon 10 platos Petri con medio PDAac. Se dejaron reposar los platos Petri en la cámara flujo laminar durante 4 horas, después se colocaron en un refrigerador a 4 °C.



Para la preparación del medio Agar Agua se siguió el protocolo “Preparación de un litro de medio Agar Agua”. Para la preparación del medio Jugo V8 se siguió el protocolo “Preparación de un litro de medio Agar de verdura V8 acidificado”. Ambos protocolos fueron establecidos por el Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación molecular de Zamorano.

### **Siembra de explantes y aislamiento de hongos.**

Dos días después de la recolección se seleccionaron diez raíces largas y con apariencia sana de los cuatro individuos de *Prosthechea michuacana*. Se procedió a remover cuidadosamente todos los agregados de tierra que poseían las raíces y a lavarlas con agua. Se dejaron secar en papel y se cortaron a la mitad (corte vertical), seleccionando arbitrariamente los segmentos a extraer. Se eligieron los segmentos que se encontraban en la parte intermedia o final de las raíces. Estos fueron de aproximadamente 0.5 cm, para su preparación y siembra se siguió el “Protocolo para la preparación y siembra de explantes para diagnóstico” (Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación molecular de Zamorano) haciendo caso omiso del primer paso. Se realizó un corte por raíz y se sembraron cinco explantes por plato Petri, teniendo un total de dos platos (diez explantes).

Se dejaron en incubación durante 13 días a 25 °C, luego se procedió a realizar los aislamientos en medio Agar Agua. A los siete días de haber hecho los aislamientos se hicieron trasplantes de los hongos a medios con Jugo V8 acidificado. Los cortes hechos en los medios de cultivo fueron de 0.5 × 0.5 cm. Para el aislamiento y trasplante se siguió el “Protocolo para siembra de hongos” (Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación molecular de Zamorano). Antes de realizar los trasplantes se hizo una observación preliminar para descartar la posibilidad de contaminación por bacterias. Esta se hizo de manera visual poniendo las placas de Petri a contraluz. Para el aislamiento y trasplante de los hongos se seleccionó un segmento del borde, ya que este presenta hifas jóvenes y en crecimiento. Después del trasplante se esperó una semana para realizar la documentación de los hongos.

### **Análisis de muestras de suelo.**

Se realizó un análisis de suelo para identificar los hongos que estaban en contacto con la rizosfera de las raíces. Este análisis también sirvió como medida comparativa con los aislamientos hechos en las muestras de raíz. Se seleccionó el suelo cercano a la raíz, mezclando las muestras de los cuatro individuos en una sola. Se retiraron las raíces y piedras tratando de dejar el suelo lo más limpio posible. Para su preparación y siembra en medios de cultivo se siguió el “Protocolo para análisis de microorganismos en suelo” (Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación molecular de Zamorano).

### **Descripción macroscópica y microscópica.**

Las características macroscópicas se evaluaron de manera visual y empleando un estereoscopio. Se evaluaron las siguientes características color, forma, elevación, borde y presencia o ausencia de halo. Las características microscópicas se observaron con los aumentos 10x, 40x y 100x del microscopio. Se hizo especial énfasis en las estructuras de esporulación (conidióforos), las esporas y el tipo de micelio.

### **Extracción de ADN de hongos y planta.**

Para la extracción del ADN de los hongos se emplearon dos protocolos diferentes. El primero fue el “Protocolo para la extracción de ADN de hongos (modificado), extracción método CTAB phenol: cloroformo: isoamyl alcohol (25:24:1)” (Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación molecular de Zamorano). El primer cambio hecho sobre el protocolo original fue en el paso uno, ya que se usó tela cheesecloth 90° en lugar de las tres capas de papel filtro estéril. Adicionalmente en el paso 7 se transfirieron 500 µL del sobrenadante. Con este protocolo también se realizó la extracción del ADN de *Prosthechea michuacana*. Una metodología parecida fue usada por Ordoñez (2012), cambiando la cantidad de las muestras a analizar y la programación de la centrifuga.

El segundo fue el “Protocolo para extracción de ADN de hongos modificado, extracción método phenol: cloroformo: isoamil alcohol (25:24:1)” (Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación molecular de Zamorano). Se omitió el paso 5 de este protocolo, ya que los tubos utilizados contaban con cinco “beads” de cerámica. En el paso 8 se tomaron 150 µL del sobrenadante en vez de 100 µL.

### **Preparación de productos de PCR y gel para la electroforesis.**

Para la preparación de las muestras se siguió el “Protocolo para la preparación de PCR master mix con primer universales”. Se utilizaron los siguientes “primer” universales para hongos, ITS (ITS4R + ITS5F). Para la preparación del gel se siguió el “Protocolo para electroforesis en gel” (Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular de Zamorano).

### **Secuenciación.**

Se extrajo ADN de los 10 hongos aislados, sin embargo, se seleccionaron únicamente los cinco mejores para su secuenciación. Las características que se tomaron en cuenta fueron calidad y concentración. Las muestras se enviaron al laboratorio de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN), ya que ellos cuentan con el equipo necesario para realizar la secuenciación del ADN.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Aislamientos de hongos endófitos.**

De los 10 explantes sembrados en los platos Petri con medio de cultivo PDAac se observó presencia de 10 posibles hongos endófitos. Estos fueron creciendo hasta invadir todo el medio de cultivo, se pudo observar colonización por esporas y micelio. Los hongos presentaron coloración y crecimiento diferentes. No se observaron características antagónicas entre los hongos que crecieron en los medios PDAac (Figura 1). El pH bajo en los medios inhibe el crecimiento de bacterias, volviéndolo un medio selectivo para hongos.

En un estudio hecho en Colombia sobre la presencia de endófitos en rosas, de 560 subfragmentos de hojas aislados, solo 92 presentaron colonias de hongos endófitos (Salazar y García, 2005). Esto representa el 16.4% del total de fragmentos, demostrando la dificultad de extraer endófitos. En el presente estudio se obtuvieron 10 aislamientos (100% de éxito), a pesar de esto existe la posibilidad de que alguno de estos hongos sean contaminación o endófitos facultativos; estando presentes tanto en el suelo como en las raíces. Los análisis de suelo sirven para comparar los géneros presentes en las raíces con los del suelo.

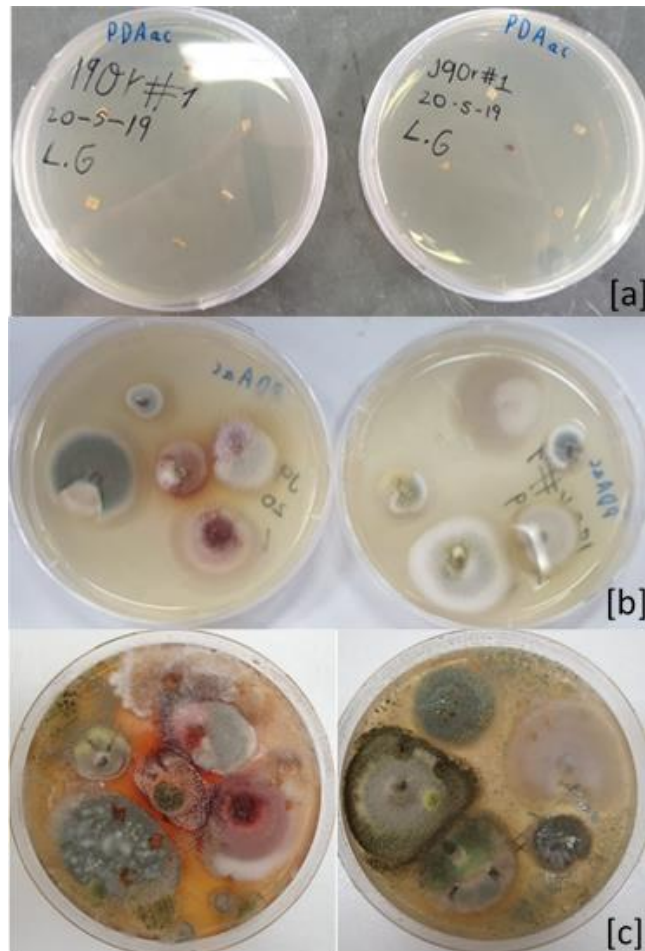




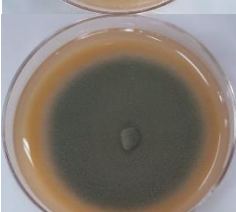
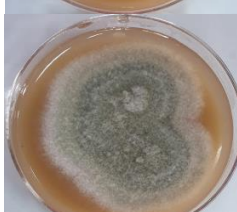
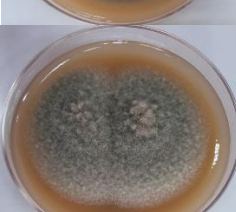
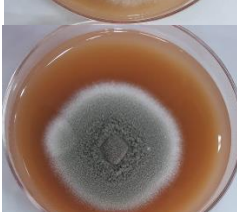




Figura 1. Fotografía del crecimiento de los explantes en medio PDAac. [a] día de siembra de los explantes, [b] 6 días después de la siembra, [c] 24 días después de la siembra.

A partir de los explantes se realizaron 10 aislamientos en medio de cultivo Agar Agua. Después de una semana de incubación no se observó la presencia de contaminación. Los trasplantes en medio de cultivo Agar V8 ayudaron en la identificación visual de los hongos, ya que se pudo visualizar la coloración y el crecimiento. A cada hongo se le dio un código (nomenclatura) con la siguiente nomenclatura 19OR#, 19 refiere al año y OR a orquídea (Cuadro 1).




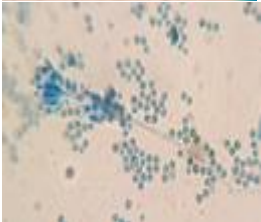

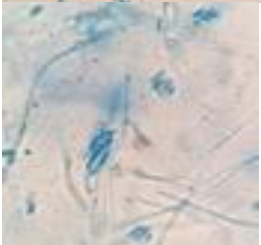

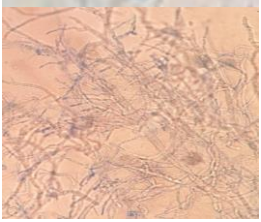
Cuadro 1. Aislamientos de hongos en medio Agar V8.

Código	Foto (Agar V8)	Código	Foto (Agar V8)
19OR#1.1		19OR#1.2	
19OR#1.3		19OR#1.4	
19OR#1.5		19OR#1.6	
19OR#1.7		19OR#1.8	
19OR#1.9		19OR#2.0	


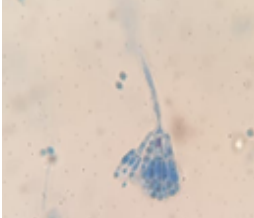



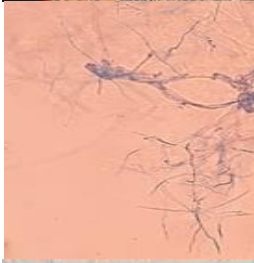

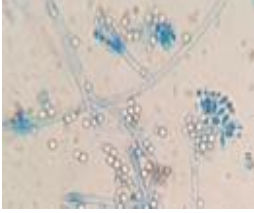
### Identificación de los hongos endófitos hasta nivel de género.





Los individuos 19OR#1.1, 19OR#1.2 y 19OR#1.5 presentaron características de crecimiento y apariencia similares. El individuo 19OR#1.4 presentó un cambio de coloración de amarillo a rosado. Lo mismo ocurrió con el individuo 19OR#1.8, cambiando de color verde a negro. El resto de hongos no presentaron ningún tipo de cambio durante su crecimiento. Se identificaron los géneros tomando en cuenta características macroscópicas y microscópicas (Cuadro 2). Un estudio hecho por Mosquera, Bayman y Otero (2010) mencionan que los hongos no esporulan en medios artificiales lo que dificulta su identificación morfológica. Sin embargo, se observó presencia de esporas en los géneros *Penicillium* y *Fusarium*. Lo cual sugiere que los hongos presentan distinto comportamiento dependiendo del medio en el que crecen.

Cuadro 2. Identificación de hongos endófitos presentes en las raíces de *Prosthechea michuacana*.

Código	Foto en estereoscopio	Descripción macroscópica	Fotos microscopio	Descripción microscópica	Género
19OR#1.1		<u>Color:</u> Verde <u>Forma:</u> Puntiforme <u>Elevación:</u> Plano <u>Borde:</u> Ondulado <u>Halo:</u> Presente		Aumento: 100x Presencia de conidióforo, hifas septadas, presencia de esporas	<i>Penicillium</i> sp.
19OR#1.2		<u>Color:</u> Verde <u>Forma:</u> Puntiforme <u>Elevación:</u> Plano <u>Borde:</u> Ondulado <u>Halo:</u> Presente		Aumento: 100x Presencia de conidióforo, hifas septadas, presencia de esporas	<i>Penicillium</i> sp.
19OR#1.3		<u>Color:</u> Blanco <u>Forma:</u> Filamentosa <u>Elevación:</u> Plano <u>Borde:</u> Filamentoso <u>Halo:</u> Ausente		Aumento: 100x Ausencia de conidióforo, hifas septadas, presencia de esporas	<i>Fusarium</i> sp.
19OR#1.4		<u>Color:</u> Blanco, Amarillo, Rosado <u>Forma:</u> Circulo <u>Elevación:</u> Plano <u>Borde:</u> Ondulado <u>Halo:</u> Ausente		Aumento: 40x Ausencia de conidióforo, hifas con ángulos de 45° y 90°	<i>Rhizoctonia</i> sp.



Código	Foto en estereoscopio	Descripción macroscópica	Fotos microscopio	Descripción microscópica	Género
19OR#1.5		<u>Color:</u> Verde <u>Forma:</u> Puntiforme <u>Elevación:</u> Plano <u>Borde:</u> Ondulado <u>Halo:</u> Presente		Aumento: 100x Presencia de conidióforo, hifas septadas, presencia de esporas	<i>Penicillium</i> sp.
19OR#1.6		<u>Color:</u> Verde <u>Forma:</u> Puntiforme y Filamentoso <u>Elevación:</u> Convexa <u>Borde:</u> Filamentoso <u>Halo:</u> Ausente		Aumento: 40x Ausencia de conidióforo, hifas septadas y en ángulos de 45° y 90°	<i>Rhizoctonia</i> sp.
19OR#1.7		<u>Color:</u> Verde <u>Forma:</u> Puntiforme y Filamentoso <u>Elevación:</u> Umbeliforme <u>Borde:</u> Filamentoso <u>Halo:</u> Ausente		Aumento: 10x Ausencia de conidióforo, hifas septadas y en ángulos de 45° y 90°	C.F. <i>Rhizoctonia</i> sp.
19OR#1.8		<u>Color:</u> Verde, Negro <u>Forma:</u> Puntiforme y Filamentoso <u>Elevación:</u> Plano <u>Borde:</u> Ondulado <u>Halo:</u> Presente		Aumento: 100x Presencia de conidióforo, hifas no septadas, presencia de esporas	<i>Penicillium</i> sp.

<b>Código</b>	<b>Foto en estereoscopio</b>	<b>Descripción macroscópica</b>	<b>Fotos microscopio</b>	<b>Descripción microscópica</b>	<b>Género</b>
19OR#1.9		<u>Color:</u> Blanco <u>Forma:</u> Filamentosa <u>Elevación:</u> Plano <u>Borde:</u> Filamentoso <u>Halo:</u> Ausente		Aumento: 10x Ausencia de esporas, hifas septadas en ángulos de 45° y 90°	<i>Rhizoctonia</i> sp.
19OR#2.0		<u>Color:</u> Blanco <u>Forma:</u> Filamentosa <u>Elevación:</u> Convexo <u>Borde:</u> Filamentoso <u>Halo:</u> Ausente		Aumento: 100x Oosporas	C.F. Oomiceto



### **Extracción de ADN.**

De los dos métodos usados el que obtuvo las mejores concentraciones fue el método CTAB. En el segundo método se repitió el proceso tres veces dando concentraciones similares o menores en cada ocasión. A pesar de que muchas de las muestras no poseen extracción por medio de los dos protocolos, los resultados del segundo están muy por debajo de lo mínimo requerido de 100 ng/mL obtenidos a partir del Cuadro 3.

Cuadro 3. Concentraciones de ADN de los dos métodos aplicados.

<b>Muestras</b>	<b>Método CTAB (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Método estándar (ng/<math>\mu</math>L)</b>
19OR#1.1	437.7	NA
19OR#1.3	NA	14.3
19OR#1.4	395.9	20.4
19OR#1.5	1,590.9	NA
19OR#1.6	375.9	NA
19OR#1.7	NA	18.9
19OR#1.8	181.6	34.1
19OR#1.9	NA	38.2
19OR#2.0	212.1	30.2

[NA] Método no aplicado.



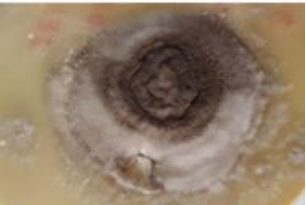
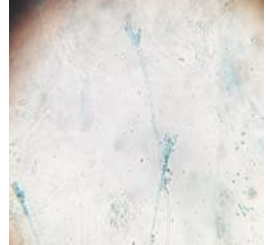

### **Vista del gel de agarosa teñido con bromuro de estudio en el transiluminador.**


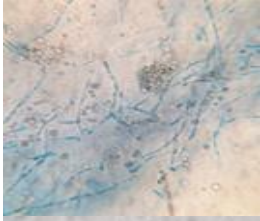



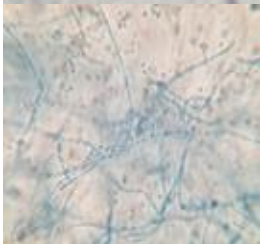
En la amplificación de las muestras no se logró ver migración del ADN. Se probó usar distintas concentraciones 1  $\mu$ L, 2  $\mu$ L, 4  $\mu$ L y 5  $\mu$ L y los resultados no cambiaron. Se usaron dos voltajes y tiempos en la cámara de electroforesis, de 80v durante 1 hora y 10 minutos y 100v durante 40 minutos. El objetivo fue reducir el tiempo en el que migra el ADN. Se purificó el ADN de las muestras agregando 5  $\mu$ L de acetato de sodio 3M Y 50  $\mu$ L de etanol al 70%. Los “primers” universales utilizados fueron el ITS4R y el ITS5F, sin embargo, el laboratorio de la UNAN recomienda utilizar el ITS1-F ya que se ganan aproximadamente 100 pares de bases al momento de secuenciar.

### **Aislamientos de muestras de suelo.**

Siete hongos fueron aislados a partir de las diluciones de muestras de suelo, de estos, tres fueron descartados por contaminación de bacterias o deshidratación del medio. Los otros cuatro hongos se clasificaron en los géneros *Penicillium* y *Fusarium* (Cuadro 4). Cinco de los endófitos aislados de las raíces comparten el mismo género que los aislamientos de la rizósfera. Esto indica que los individuos 19OR#1.4, 19OR#1.6, 19OR#1.7 y 19OR#1.9 son endófitos obligatorios. Por otro lado, 19OOR#2.0 presenta oosporas clasificándolo como un oomiceto.

Cuadro 4. Identificación de hongos presentes en el suelo cercano de *Prosthechea michuacana*.

Código	Fotos en jugo V8	Descripción macroscópica	Fotos microscopio	Descripción microscópica	Género
19OR#1.1s		Medio deshidratado	-----	-----	-----
19OR#1.2s		Contaminación por bacterias	-----	-----	-----
19OR#1.3s		<u>Color:</u> Blanco marrón <u>Forma:</u> Puntiforme <u>Elevación:</u> Convexo <u>Borde:</u> Filamentoso <u>Halo:</u> Ausente		Aumento: 40x Hifas septadas, presencia de esporas	<i>Penicillium</i> sp.
19OR#1.4s		Contaminación por bacterias	-----	-----	-----

Código	Fotos en jugo V8	Descripción macroscópica	Fotos microscopio	Descripción microscópica	Género
19OR#1.5s		<u>Color:</u> Marrón <u>Forma:</u> Puntiforme <u>Elevación:</u> Plana <u>Borde:</u> Ondulado <u>Halo:</u> Presente		Aumento: 10x Hifas septadas, presencia de esporas	C.F. <i>Penicillium</i> sp.
19OR#1.6s		<u>Color:</u> Blanco <u>Forma:</u> Filamentosa <u>Elevación:</u> Plana <u>Borde:</u> Filamentoso <u>Halo:</u> Ausente		Aumento: 100x Hifas no septadas, presencia de esporas	<i>Fusarium</i> sp.
19OR#1.7s		<u>Color:</u> Marrón y blanco <u>Forma:</u> Puntiforme <u>Elevación:</u> Plana <u>Borde:</u> Filamentoso <u>Halo:</u> Presente		Aumento: 10x Hifas septadas, presencia de esporas	C.F. <i>Penicillium</i> sp.

Los resultados de las muestras de suelo indican que el género *Rhizoctonia* se considera un endófito obligado ya que no fue identificado en el suelo. Los géneros *Penicillium* y *Fusarium* se consideran contaminación o posibles endófitos facultativos estando presentes en las raíces y el suelo. En el caso del género *Penicillium* los aislamientos de las muestras de suelo presentaron características macroscópicas diferentes a las de la raíz. Esto indica que son especies diferentes, de ser endófitos facultativos sería interesante evaluar su potencial antagonico en bacterias. Especies de *Penicillium* ya han presentado características antibióticas como por ejemplo la penicilina.

### **Análisis de predominancia.**

Los géneros de hongos que predominan en las muestras de raíz de *Prosthechea michuacana* son *Penicillium* sp. y *Rhizoctonia* sp. ambos con una frecuencia absoluta de cuatro, representando el 80% de los aislamientos (Cuadro 5). Para el cálculo de la frecuencia absoluta simplemente se colocó la sumatoria de individuos con el mismo género, para el cálculo de la frecuencia relativas se usó la Ecuación 1:

$$(\text{Frecuencia absoluta} / \text{Total de individuos}) \times 100 \quad [1]$$

Entre los géneros de hongos endófitos, *Rhizoctonia* es uno de los más documentados en orquídeas terrestres (Shan, Liew, Weatherhead y Hodgkiss, 2002). Por lo tanto, no es de extrañar que el 40% de las muestras pertenezcan a dicho género.

Cuadro 5. Resumen de la frecuencia absoluta y relativa de los aislamientos de endófitos.

<b>Géneros</b>	<b>Frecuencia absoluta</b>	<b>Frecuencia relativa (%)</b>
<i>Penicillium</i> sp.	4	40
<i>Fusarium</i> sp.	1	10
<i>Rhizoctonia</i> sp.	4	40
Otros	1	10
Total	10	100

### **Secuenciación de ADN.**

Después de tres semanas y de comunicaciones con la Universidad Centroamericana, las muestras fueron retenidas por el personal de IPSA (Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria), siendo esta una situación poco usual por lo que se decidió descartar las muestras ya que existe una alta probabilidad de que el ADN se haya desnaturalizado.

### **Adaptación de protocolos.**

Los protocolos utilizados estaban destinados específicamente a la extracción de agentes fitopatogénos. Las adaptaciones hechas a partir de estos dieron buenos resultados. Los únicos cambios hechos fueron en la forma de extraer las muestras, ya que en dichos protocolos se buscan síntomas de afecciones. Siendo el caso contrario para este estudio, se buscaron segmentos sanos y desarrollados.

#### 4. CONCLUSIONES

- De las 10 muestras de raíz extraídas de los cuatro individuos de *Prosthechea michuacana* se lograron aislar 10 hongos. De estos, cuatro se clasificaron como endófitos obligados y el resto como facultativos.
- Entre los hongos aislados a partir de las raíces de *Prosthechea michuacana* los géneros predominantes, con un 40% en ambos casos, fueron *Penicillium* y *Rhizoctonia*.
- De los dos protocolos utilizados para la extracción de ADN el que produjo mejores resultados fue el método CTAB, dando una concentración mínima de 181.6 ng/ $\mu$ L.
- Los resultados demuestran que los protocolos destinados al estudio de hongos fitopatógenos se pueden usar en hongos endófitos. Estos solo requerían adaptaciones sobre los criterios para la extracción de muestras.

## 5. RECOMENDACIONES

- Utilizar el primer universal ITS1-F para la amplificación del ADN de los hongos. Para la amplificación del ADN de la orquídea se recomienda utilizar marcadores MARTK.
- Hacer estudios de la presencia de estos hongos en el bulbo y las hojas de *Prosthechea michuacana*. De esa forma, se podrían hacer comparaciones de abundancia entre los distintos tipos de tejido vegetal de la orquídea.
- Realizar un estudio exhaustivo de todos los endófitos en *Prosthechea michuacana*. Para lograr esto se tendrían que probar diferentes medios de cultivo para el crecimiento de los simbiontes, ya que muchos difieren en sus requerimientos nutricionales.
- Hacer estudios para determinar su uso en la medicina ya que existe la posibilidad de que las propiedades medicinales de *Prosthechea michuacana* sean sintetizadas por sus endófitos. De ser así se reduciría la presión sobre la planta y se facilitaría la producción de dichos compuestos.

## 6. LITERATURA CITADA

- Asman, A., Amin, N., Rosmana, A. y Abdullah, T. (2018). Endophytic fungi associated with cacao branch and their potential for biocontrol vascular streak dieback disease on cacao seedling. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 157(1), 12–39. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/157/1/012039>
- Bayman, P. y Otero, J. T. (2006). Microbial Endophytes of Orchid Roots. En B. J. E. Schulz, C. J. C. Boyle y T. N. Sieber (Eds.), *Soil Biology. Microbial Root Endophytes* 9, 153–177. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9\\_9](https://doi.org/10.1007/3-540-33526-9_9)
- Carroll, G. C. (1986). Biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge, UK / edited by N.J. Fokkema and J. van den Heuvel, p. 203–222.
- Carroll, G. (1988). Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology*, 69(1), 2–9. <https://doi.org/10.2307/1943154>
- Gamboa-Gaitán, M. (2006). Hongos Endófitos Tropicales: Conocimiento actual y perspectivas (Tesis de maestría). p. 18. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- González, A. (2015). Aislamiento e identificación de hongos endófitos de la especie piper aduncum (piperaceae) y su actividad bactericida antagónica frente a distintas cepas microbianas (tesis de pregrado). p. 77. Universidad Tecnológica de Pereira. Recuperado de <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/5332/66062G643.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Léveillé, J. H. (1846). *Considérations mycologiques, suivies d'une nouvelle classification des champignons*. 41, p. 136. Paris: Imprimerie de I. Martinet.
- Mosquera-Espinosa, A. T., Bayman, P. y Otero, J. T. (2010). Ceratobasidium como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronómica*, 59(3), 316–326.
- Ordoñez, N. F. (2012). Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo Rhizoctonia y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de plantas de Vanilla plantifolia Jacks. (tesis de maestría). p. 64. Universidad Nacional de Colombia.
- Parrales H, M. F. (2015). Diversidad y distribución altitudinal de orquídeas terrestres del cerro Uyuca (tesis de pregrado): Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. p. 44. Recuperado de <https://bdigital.zamorano.edu:80/jspui/bitstream/11036/4519/1/IAD-2015-027.pdf>
- Perez Gutierrez, R. M., Anaya Sosa, I., Hoyo Vadillo, C. y Cruz, T. (2011). Effect of flavonoids from Prosthechea michuacana on carbon tetrachloride induced acute

- hepatotoxicity in mice. *Pharmaceutical biology*, 49(11), 1121–1127. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.570766>
- Salazar, C. S. y García, M. C. (2005). Aislamiento de hongos endofitos en rosa (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22(2), 99–101. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(05\)70016-4](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(05)70016-4)
- Schulz, B. y Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109(6), 661–686. <https://doi.org/10.1017/S095375620500273X>
- Shan, X. C., Liew, E. C. Y., Weatherhead, M. A. y Hodgkiss, I. J. (2002). Characterization and Taxonomic Placement of Rhizoctonia-like Endophytes from Orchid Roots. *Mycologia*, 94(2), 230. <https://doi.org/10.2307/3761799>
- Strobel, G. y Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 67(4), 491–502. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003>
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. y Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of natural products*, 67(2), 257–268. <https://doi.org/10.1021 /np030397v>
- Wilson, D. (1995). Endophyte: The Evolution of a Term, and Clarification of Its Use and Definition. *Oikos*, 73(2), 274. <https://doi.org/10.2307/3545919>



## 7. ANEXOS

Todos los protocolos adjuntos en anexos fueron establecidos por el Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular de Zamorano, con excepción de los protocolos de extracción de ADN.

**Anexo 1.** Preparación de 1 litro de medio Agar Agua.

1. Pesar 8 g de bacto-agar
2. Añadir ~992 mL de agua destilada
3. Autoclavar

**Anexo 2.** Preparación de 1 litro de medio Agar de verdura V8 acidificado.

1. Añadir 150 mL de jugo V8
2. Pesar 3 g de carbonato de calcio
3. Añadir 790 mL de agua destilada
4. Mezclar
5. Pesar 15 g de bacto-agar
6. Autoclavar
7. Añadir 10 mL de ácido tartárico después del autoclavado

**Anexo 3.** Protocolo para la preparación y siembra de explantes para diagnóstico.

1. Toma de fotografía y detalle de síntomas, colocar el tejido enfermo en el centro de una hoja blanca. Escribir en la parte inferior el tipo de síntomas que presenta el tejido y un código de identificación de muestra con el siguiente formato: año, abreviatura de la planta y número de muestra (ej. 17zh#1). Colocar la fecha de recepción de muestra y preparación del explante en la parte superior del código. Tomar la fotografía de la muestra de tal manera que aparezcan todos los datos. Escribir detalladamente la sintomatología y adjuntarla al tablero de muestra.
2. Preparación de explantes, con un bisturí esterilizado realizar de 8-9 pequeños cortes del tejido de la interfase y sumergirlos en agua filtrada en un beaker esterilizado. Utilizar guantes y bisturí individuales para cada muestra para evitar la contaminación cruzada.
3. Preparación de material, dentro de la cámara de flujo laminar colocar el material a utilizar: 2 beakers, 4 pinzas, mechero, fósforos, papel filtro, medio de cultivo, alcohol al 70% y agua destilada. Asegurarse que el material se encuentre esterilizado.

### **Continuación Anexo 3.**

4. Desinfección de explantes, con una pinza esterilizada, transferir los explantes de la muestra a un beaker con una solución de hipoclorito (en un rango de 1-10%). Mantener la muestra de 3-5 minutos y menear el beaker para desinfectar los explantes.
5. Lavado de explantes, extraer los explantes sutilmente con una pinza esterilizada y transferirlos a un beaker con agua destilada estéril. Lavar los explantes por un minuto y repetir nuevamente el procedimiento.
6. Secado de explantes, finalmente extraer los explantes nuevamente con una pinza esterilizada y colocarlos sobre un papel filtro estéril para secarlos.
7. Siembra de explantes, transferir con una pinza esterilizada los explantes al medio de cultivo. Colocar de 6-7 explantes de manera uniforme y con la interfase en contacto con el medio.
8. Rotulado, sellar el medio con parafina y escribir el código, fecha y nombre de la persona que realizó la siembra.
9. Incubación, colocar las placas en la incubadora de 2-4 días para realizar las observaciones.

### **Anexo 4. Protocolo para siembra de hongos.**

Es importante trabajar con orden y realizando el menor movimiento posible dentro de la cámara de flujo laminar (movimientos sutiles). Evitar objetos que obstruyan el flujo del aire en el área donde se está trabajando, así como el uso de joyas o cualquier otro accesorio que interfiera con la inocuidad y el movimiento sutil de las manos.

1. Apagar el aire acondicionado para evitar la turbulencia en la cámara de flujo laminar.
2. Seleccionar el hongo para la siembra.
3. Encender y preparar la cámara de flujo laminar: limpiar y desinfectar con alcohol al 70% (para mayor información encontrar la guía al lado derecho de la cámara).
4. Seleccionar los medios de cultivos que se utilizarán y colocarlos en la cámara de flujo laminar. Dejarlos reposar alrededor 10 minutos antes de la siembra y quitar el agua que se condensó en la tapa de los platos.
5. Preparar los materiales: bisturí, mechero, fósforos, parafina, contenedor para sostener el bisturí desinfectado y contenedor con alcohol para desinfectar al 95%.
6. Desinfectar el bisturí con alcohol al 95%.
  - a) Llevar el bisturí sobre la llama del mechero para flamearlo.
  - b) Desinfectarlo con alcohol al 95%.
  - c) Repetir a y b nuevamente.
  - d) Dejarlo reposar para que se seque y enfríe.
7. Para la siembra es importante seleccionar el borde del hongo con hifas jóvenes. Realizar un corte pequeño cuadrangular y sembrarlo en el centro del plato con la parte de las hifas en contacto con el medio.

Observación: hacer movimientos sutiles porque se puede crear contaminaciones por migración de esporas.

8. Dejar reposar los platos abiertos alrededor de 10 minutos para eliminar el exceso de humedad y condensación de la muestra y el plato.

#### **Continuación Anexo 4.**

9. Sellar con parafina los platos, rotularlos y colocarlos en los contenedores de crecimiento.
10. Limpiar (quitando los residuos de medios de cultivo u hongos del bisturí), desinfectar y depositar los materiales utilizados en su lugar.
11. Apagar la cámara de flujo laminar.

#### **Anexo 5.** Protocolo para análisis de microorganismos en suelo.

1. Seque al aire una muestra de suelo de aproximadamente 250 g (peso húmedo) por 2 días a 24 °C.
2. Pese 5 g de suelo seco y afore a 50 mL agua destilada estéril en un tubo Falcon. Colocar la muestra en el orbital por 5 min/300 rpm.
3. Colocar en el microondas el medio completo para hongos (MCH) semisólido y 600 mL de agua filtrada para el baño María.
4. Aclimatar 3 platos Petri por muestra en la cámara de flujo laminar. Rotular los platos con: nombre la muestra, fecha, iniciales del nombre y dilución de la muestra.
5. Centrifugar las muestras usando el rotor SN943 a 500 rpm/5 min/ mínima aceleración y desaceleración.
6. Usando una pipeta estéril transfiera 900 µL del sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5 mL (dilución  $10^{-1}$ ).
7. Realizar diluciones seriadas de 1:10, es decir, colocar 900 µL de agua destilada estéril y añadir 100 µL del tubo anterior hasta la dilución  $10^{-6}$ .
8. Colocar 3 mL de MCH semisólido en los tubos de ensayo en el baño María Trabajar rápido para evitar que se solidifique.
9. Mezclar los 3 mL del tubo con medio MCH con 100 µL de la dilución  $10^{-6}$  de la muestra. Repetir este paso con diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-2}$ .
10. Mezclar bien y verter rápidamente el contenido del tubo en 1 plato agar agua y distribuir uniformemente con movimientos sutiles.
11. Observar los platos Petri 24 y 48 horas después.
12. Contar el número de hongos y bacterias encontrados.

#### **Anexo 6.** Protocolo para la extracción de ADN de hongos (Modificado), Extracción método CTAB phenol: cloroformo: isoamyl alcohol (25:24:1).

1. Filtrar el hongo usando tela cheescloth estéril para separar la parte acuosa de la parte sólida (micelios).
2. Transferir el micelio (~300 mg) directamente a un tubo de 2 mL.
3. Macerar el micelio usando un mortero y nitrógeno líquido.
4. Añadir 500 µL de Buffer de extracción CTAB, añadiendo 2.5 µL B-mercaptoethanol por muestra.
2. Colocar los tubos en el disruptor de tejidos a máxima velocidad por 2 minutos.
3. Incubar las muestras a 65 °C de 30-60 minutos. Cada 10 minutos mezcle la muestra.

## **Continuación Anexo 6.**

4. En la cámara de gases añadir 600  $\mu\text{L}$  de phenol: cloroformo: isoamyl alcohol (25:24:1) a los tubos eppendorf con la muestra. Invertir drásticamente el tubo para mezclar.
5. Centrifugar a 14,000 rpm/10 minutos a 4 °C.
6. Tomar cuidadosamente el sobrenadante superior del tubo. Transferir este sobrenadante (50-100  $\mu\text{L}$ ) a un nuevo tubo eppendorf.
7. Añadir 600  $\mu\text{L}$  de cloroformo: isoamyl alcohol (24:1). Invertir suavemente el tubo para mezclar.
8. Centrifugar a 14,000 rpm/10 minutos a 4 °C.
9. Tomar cuidadosamente el sobrenadante superior del tubo después de la centrifugación (50-80  $\mu\text{L}$ ).
10. Añadir 66  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M seguido de 1,350  $\mu\text{L}$  de 100% etanol frío.
11. Centrifugar el tubo a 14,000 rpm/10 minutos a 4 °C.
12. En el fondo del tubo se observa un pellet que contiene el ADN. Decantar el líquido.
13. Secar el tubo colocándolo boca abajo sobre papel toalla.
14. Cuando el tubo esté completamente seco, añadir 100  $\mu\text{L}$  de Buffer TE al pellet para rehidratarlo.
15. Finalmente colocar la muestra en baño María durante 30 minutos a 35 °C.
16. Analizar la cantidad del material genético usando el Nanodrop.

## **Anexo 7. Protocolo para extracción de ADN de hongos MODIFICADO, Extracción método phenol: cloroformo: isoamil alcohol (25:24:1).**

1. Filtrar el hongo usando tela de queso (grado #90) estéril para separar la parte acuosa de la parte sólida (micelios).
2. Transferir el micelio (~300 mg) directamente a un tubo de 2 mL.
3. Añadir 500  $\mu\text{L}$  de buffer de extracción CTAB, añadiendo 2.5  $\mu\text{L}$   $\beta$ -mercaptoethanol/ muestra) el día mismo de la extracción. El tubo se puede conservar así hasta por un año.
4. Incubar las muestras a 65 °C de 30-60 min. Cada 10 min mezcle la muestra.
5. Añadir 10 “beads” de cerámica y colocar los tubos en el disruptor de tejidos a máxima velocidad por 2 min.
6. En la cámara de gases añadir 600  $\mu\text{L}$  de phenol: chloroformo: isoamyl alcohol (25:24:1) a los tubos eppendorf con los 300 mg de muestra. Invertir drásticamente el tubo para mezclar.
7. Centrifugar a 14,000 rpm/10 min a 4 °C (Programa 4).
8. Tomar cuidadosamente el sobrenadante superior del tubo. Transferir este sobrenadante (~ 50 – 100  $\mu\text{L}$ ) a un nuevo tubo eppendorf.
9. Añadir 600  $\mu\text{L}$  de cloroformo: isoamyl alcohol (24:1). Invertir suavemente el tubo para mezclar.
10. Centrifugar a 14,000 rpm/10 min a 4 °C (Programa 4).
11. Tomar cuidadosamente el sobrenadante superior del tubo después de la centrifugación (~ 50 – 80  $\mu\text{L}$ ).
12. Añadir 66  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 3 M seguido de 1,350  $\mu\text{L}$  de 100% etanol frío (colocar dos veces 675  $\mu\text{L}$ ).

### Continuación Anexo 7.

13. Centrifugar el tubo a 14,000 rpm/10 min a 4 °C (Programa 4).
14. En el fondo del tubo se observa un pellet que contiene el ADN. Decantar el líquido.
15. Secar el tubo colocándolo boca abajo sobre papel toalla.
16. Cuando el tubo esté completamente seco, añadir 100 µL de buffer TE al pellet para rehidratarlo.
17. Finalmente colocar la muestra en baño María durante 30 min a 35 °C.
18. Analizar la calidad del material genético usando el Nanodrop.

### Anexo 8. Protocolo para la preparación de PCR master mix con primer universales.

Reactivos:	1X (25 µL)
10x PCR buffer	2.50 µL
dNTPs mix (100 mM)	0.50 µL (10 Mm)
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µL (2Mm)
Taq polimerasa (Ápex, Quiagen ó M166B)	0.50 µL
“Primers” universales mix*	2.50 µL
ddH <sub>2</sub> O	15.5 µL
Muestra de ADN (50 ng/ µL)	0.50 µL
Volumen Total	25 µL

#### Primer universales mix:

1. 27F+1492R.
2. ITS (ITS4R + ITS5F).
3. X ITS (XITS\_F3j, XITS\_F3k, XITS\_F3c, XITS\_F3d, XITS\_R2).
4. 60S (60S\_908R + 60S\_506F).
5. EF1 (EF1\_1018F + EF1\_1620R).

Mezcla de 25 µL de cada “primer” para el coctel de “primers”.

#### Condiciones para el termociclador (CQ-PIF).

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	20 s	34
Acoplamiento	57.5	15 s	
Extensión	72	15 s	
Extensión final	Paso 2	35 veces	1
Mantenimiento	72	5 min	

## **Anexo 9.** Protocolo para electroforesis en gel.

### Materiales:

- Amplicón.
- Bandeja para gel de agarosa y peines.
- Loading Dye, colorante de carga (6x).
- Escala de ADN de 100 bp o 1kb.
- 1 % gel de agarosa en 1X buffer TAE.
- 1X buffer TAE.
- Puntas para pipeta de 100  $\mu$ L.
- Guantes.
- Unidad de electroforesis y fuente de energía.
- Parafina.
- Bromuro de etidio (BrEt: 10 mg/ mL).
- Erlenmeyer.

### Preparación del gel:

1. Tomar 20 mL de la solución 50X TAE y mezclar en 980 mL de agua destilada.
2. Colocar en un –Erlenmeyer de 500 mL 150 mL de 1X TAE.
3. Añadir 1.5 g de agarosa (1% gel de agarosa en 1X TAE).
4. Calentar la mezcla en el microondas durante 3 min.
5. Sellar los bordes de la bandeja para gel con tape de rotulación.
6. Colocar los peines sobre las hendiduras de la bandeja para gel.
7. Esperar que se enfríe parcialmente la mezcla para añadir 7.5  $\mu$ L de BrEt.
8. En la cámara de gases verter la mezcla del gel de agarosa en la bandeja para gel y dejar reposar hasta que se solidifique (~15 min).
9. Retirar el tape de los bordes y colocar el gel en la unidad de electroforesis.
10. Verter los 850 mL del 1X TAE restante en la cámara de electroforesis hasta que el gel quede completamente sumergido.
11. Retirar cuidadosamente los peines del gel.

### Siembra del gel:

1. En un pedazo de parafina coloque 2  $\mu$ L de loading Dye 6X para cada muestra a sembrar.
2. Mezcle el loading Dye con 10  $\mu$ L de amplicón y siembre en los agujeros del gel de agarosa.
3. Agregue la escalera de 1 kb o 100 bp, según sea el caso.

### Corrido en la unidad de electroforesis:

1. Tapar el tanque de electroforesis y conectar los cables de acuerdo a su color (negro con negro y rojo con rojo) conectados a la fuente de poder BioRad.
2. Ajuste el voltaje a 80 voltios y corra las muestras por 1 hora y 10 minutos.
3. Coloque el gel en el UV y tomar una fotografía rápidamente.
4. Limpie y elimine los residuos.



**Anexo 10.** Fotos de *Prosthechea michuacana*.

Colonias en el cerro Uyuca.



Características de *Prosthechea michuacana*.





**Continuación Anexo 10.**



Explantes y muestras de suelo.

