



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN  
MOLECULAR DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS EN  
PLANTAS SILVESTRES DE *Laelia autumnalis* (LLAVE & LEX)  
LINDL. (ORCHIDACEAE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A  
P R E S E N T A :

EUFROSINA CORA VALENCIA



DIRECTORA DE TESIS:  
M. en C. MARÍA DE LOS ÁNGELES AÍDA  
TÉLLEZ VELASCO

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
**Director General**  
**Dirección General de Administración Escolar**  
**Presente**

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Aislamiento, purificación e identificación molecular de microorganismos endófitos en plantas silvestres de *Laelia autumnalis* (Llave & Lex) Lindl. (Orchidaceae).**

realizado por **CORA VALENCIA EUFROSINA** con número de cuenta **0-9724117-9** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila	
Propietario	M. en C. Teresa Ruiz Olvera	
Propietario Tutora	M. en C. María de los Ángeles Aída Téllez Velasco	
Suplente	M. en C. Octavio González Caballero	
Suplente	Biól. César Ramiro Martínez González	

Atentamente  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU "**  
 Ciudad Universitaria, D. F., a 25 de noviembre de 2014  
 EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/MGM/mdm

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Ing. Domingo Colmenares Aragón (Jefe del Departamento de Cuarentena y Saneamiento Vegetal) y a la Ing. Iobana Alanís Martínez (Enlace de Diagnóstico y Sanemamiento Vegetal), por permitirme utilizar las instalaciones de la Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal (SENASICA), para la realización de esta investigación.

A mi asesora, M. en C. María de los Ángeles Aída Téllez Velasco por la ayuda e interés proporcionado durante el desarrollo de esta tesis.

A mis sinodales, Dr. Víctor M. Chávez Ávila, M. en C. Teresa Ruíz Olvera, M. en C. Octavio González Caballero, Biól. César R. Martínez González por el tiempo dedicado en la corrección de este trabajo.

*...Ad sidera tollere vultus  
(Levanta tu cara a los astros)*

## ÍNDICE

RESUMEN	Pág.
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Morfología de la familia Orchidaceae .....	3
2.2. Género <i>Laelia</i> .....	5
2.2.1. Conservación de <i>L. autumnalis</i> .....	6
2.3. Posición taxonómica.....	9
2.4. Descripción de la especie.....	9
2.5. Microorganismos endófitos en orquídeas .....	12
2.6. Cronómetros moleculares .....	13
2.6.1. rDNA 16S .....	19
2.6.2. ITS.....	19
2.7. PCR punto final .....	20
3. OBJETIVO.....	22
3.1. Objetivo general. ....	22
3.2. Objetivos particulares .....	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1. Material biológico y sitio de recolecta.....	23
4.2. Desinfestación y siembra del material biológico para el aislamiento .....	23
4.3. Aislamiento y purificación de bacterias y hongos endófitos .....	27
4.4. Conservación de las colonias bacterianas .....	27
4.5. Preservación de hongos.....	27
4.6. Extracción de DNA genómico de los cultivos puros de bacterias y hongos.....	27
4.7. Amplificación del fragmento 16S rRNA (bacterias) e ITS1-5.8S rRNA- ITS2 (hongos) .....	28
4.7.1. 16SrRNA .....	28
4.7.2. ITS1-5.8S rRNA- ITS2 .....	28
4.8. Secuenciación.....	29
4.9. Análisis de datos.....	29

5. RESULTADOS .....	30
5.1. Identificación molecular de las bacterias .....	34
5.2. Identificación molecular de los hongos .....	36
6. DISCUSIÓN.....	39
7. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES .....	45
8. LITERATURA CITADA.....	46
9. ANEXOS.....	57
9.1. Secuencias de bacterias.....	57
9.2. Secuencias de hongos .....	61
9.3. Medios de cultivo para bacterias .....	66
9.4. Características generales de las bacterias endófitas en <i>L. autumnalis</i> .....	67
9.5. Características generales de los hongos endófitos identificados en <i>L. autumnalis</i> . ..	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Morfología de las orquídeas .....	4
2. Ilustración de <i>Laelia autumnalis</i> , señalando los órganos .....	5
3. Diagrama de la región ITS4-ITS5.....	20
4. Pasos de un ciclo de PCR .....	21
5. <i>Laelia autumnalis</i> sobre <i>Gletditsia</i> sp. (“espina de Temazhualaca”) .....	24
6. Sitio de estudio.....	25
7. Selección al azar de las secciones de raíz, pseudobulbo y hoja para su siembra en PDA .....	26
8. <i>Laelia autumnalis</i> en estado silvestre .....	31
9. Crecimiento de hongos en medio PDA .....	32
10. Electroforesis del DNA genómico de las cepas bacterianas.....	33
11. Electroforesis del DNA genómico de hongos .....	33
12. Amplificación del fragmento 16s rDNA de las cepas bacterianas .....	34
13. Amplificación del fragmento ITS4-ITS5 de hongos.....	37

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
1. Ejemplos de bacterias y hongos endófitos en orquídeas .....	14
2. Identificación de bacterias endófitas en <i>L. autumnalis</i> , a partir de la amplificación de la región 16S de acuerdo al BLASTn realizado en el GenBank .....	35
3. Identificación de hongos endófitos en <i>L. autumnalis</i> , a partir de la región la region ITS4-ITS5, de acuerdo al BLASTn realizado en el GenBank .....	38

## RESUMEN

*Laelia autumnalis*, orquídea endémica de México, no está en ninguna categoría en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT 2010, pero presenta disminución en sus poblaciones silvestres en comunidades muy localizadas de distintos estados del país, debido a su uso, principalmente, como planta de ornato para las festividades de “día de Muertos”, así como a su venta y extracción ilegal. Al respecto, se han hecho investigaciones para su conservación, ya sea *in situ* o *ex situ*, logrando resultados satisfactorios. Sin embargo, el conocimiento sobre los microorganismos que alberga, así como los beneficios que éstos le pueden proporcionar, podrían incrementar las posibilidades de supervivencia de esta especie en tiempos relativamente cortos.

Como en la mayoría de las orquídeas epífitas, existen pocos estudios sobre la identificación y relación que estas plantas tienen con microorganismos endófitos, los cuales se ha visto le confieren numerosos beneficios a sus hospederos, tales como propiciar la germinación de la semilla, resistencia a estrés por factores bióticos y/o abióticos, síntesis de metabolitos secundarios. Estos últimos, con una gran aplicación en la industria, la agricultura y la medicina.

En el presente trabajo se aislaron e identificaron a los endófitos, tales como las bacterias y los hongos, presentes en los órganos (raíz, pseudobulbo y hoja) de plantas silvestres de *L. autumnalis*. Se obtuvieron 89 aislamientos puros, 25 de bacterias y 64 de hongos. Para bacterias, sólo 14 cepas lograron identificarse y corresponden al Orden *Bacilliales* los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*; Orden *Actinomycetales* el género *Curtobacterium* y al Orden *Burkholderiales* el género *Acromobacter*, los cuales se les encuentra habitando en los tres órganos de la orquídea, siendo la raíz y el pseudobulbo, los que albergan más microorganismos. En cuanto a los hongos, un total de 23 cepas se consiguió identificar como ascomicetos de los géneros *Hypocrea*, *Trichoderma*, *Sordaria*, *Hypoxylon*, *Xylaria*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Epicoccum*, *Colletotrichum* y *Presussia* viviendo en raíces y pseudobulbos.

En suma, esta investigación es una primicia para posteriores estudios sobre la relación planta-endófito.



## 1. INTRODUCCIÓN

La familia Orchidaceae es una de las más diversas, la cual cuenta con alrededor de 25 a 35 mil especies descritas ( Dressler, 2005). Las orquídeas habitan casi todas las regiones y ambientes de la Tierra, pero la mayor diversidad se encuentra en las regiones tropicales, se estima que el 25% son terrestres, mientras que el 70% son epífitas (Ángel *et al.*, 2001). En México, se han registrado 1260 especies, distribuidas en 170 géneros (Hágsater *et al.*, 2005; Soto-Arenas *et al.*, 2007), de las cuales 444 especies, que corresponden al 40%, son endémicas del país.

El género *Laelia*, formado por 11 especies, es de gran importancia ornamental y sus poblaciones se ven amenazadas por la sobrecolecta.

*Laelia autumnalis*, se ha propagado *in vitro* obteniendo el 70% de sobrevivencia en la etapa de aclimatización (Huapeo, 2004; Ávila y Salgado-Garciglia, 2006) y el conocimiento sobre los microorganismos benéficos asociados a esta especie, podría elevar dicho porcentaje en invernadero, ya que Castillo (2002) y Ortega-Larrocea (2005) sugieren que la simbiosis genera plantas más vigorosas que sobreviven mejor a la aclimatización.

Los endófitos son organismos que habitan en el interior de las plantas, sin causarles síntomas de enfermedad por ejemplo, bacterias, hongos, plantas e incluso, insectos. Las asociaciones de los microorganismos endófitos con sus hospederos, son en la mayoría de los casos, simbióticas y/o mutualistas (Guo *et al.*, 2008; Melnick *et al.*, 2008) ya que les confieren numerosos beneficios, tales como, la síntesis de reguladores de crecimiento, fijación de nitrógeno atmosférico, biocontrol a fitopatógenos, protección contra herbívoros, producción de compuestos de interés farmacológico, solubilización de fósforo, fitorremediación (Esposito-Polesi, 2011).

Los procesos de detección e identificación de estos microorganismos se limitaban a técnicas dispendiosas como la tinción del micelio, la decoloración del tejido vegetal o el cultivo *in vitro* (Abello y Segenet, 2006). Actualmente, las técnicas en biología molecular, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por las siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) han permitido la identificación de muchos de estos organismos, mediante la amplificación de los genes 16S rDNA, para procariontes y del

espacio interno transcrito (ITS, por sus siglas en inglés *Internal Transcript Spacer*), para eucariotas.

La presente investigación se enfocó en la identificación molecular de los endófitos, bacterias y hongos, presentes en los diferentes órganos de plantas silvestres de *L. autumnalis*, orquídea endémica cuyo uso, principalmente, es el ornamental y medicinal.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Morfología de la familia Orchidaceae

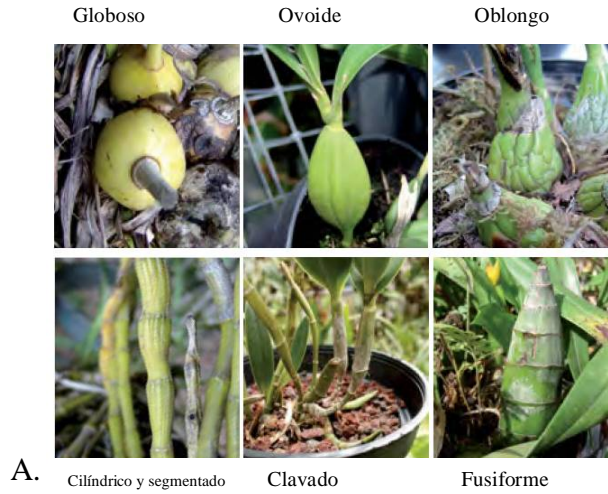
Las orquídeas son plantas herbáceas y es común encontrarlas como epífitas y/o litófilas, es decir, adheridas por sus raíces a árboles o rocas; terrestres, creciendo en tierra, arena u hojarasca, semiacuáticas y subterráneas.

Las raíces de las orquídeas epífitas y litófilas son ecológicamente equivalentes porque, en ambos casos, están expuestas a la luz y al aire. Además, son fotosintéticas, perennes y se renuevan constantemente a lo largo de los años (Bayman y Otero, 2006).

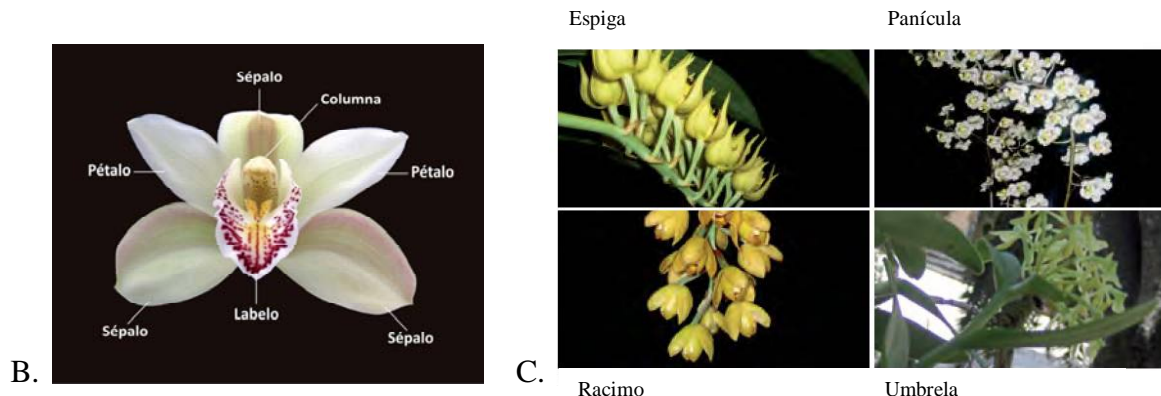
En las orquídeas epífitas, el agua y las sustancias de reserva se almacenan en los pseudobulbos, es decir, tallos aéreos de forma globosa, cilíndrica, fusiforme, ovoide, elipsoide, comprimidos bilateralmente o comprimidos dorso lateralmente (Fig. 1.A), de los cuales emergen las hojas, cuya función principal es la transpiración, el intercambio gaseoso y la producción de nutrientes durante la fotosíntesis.

Las flores son zigomorfas, constan de tres sépalos semejantes entre sí; tres pétalos, uno de los cuales es el más llamativo de todos, denominado labelo (Fig. 1.B) Las flores pueden estar dispuestas como flor simple, racimo, panícula, espiga, corimbo, umbela y cabezuela (Téllez *et al.*, 2007) (Fig. 1.C). Además, las inflorescencias pueden surgir del ápice o la base del pseudobulbo (Fig. 1.D).

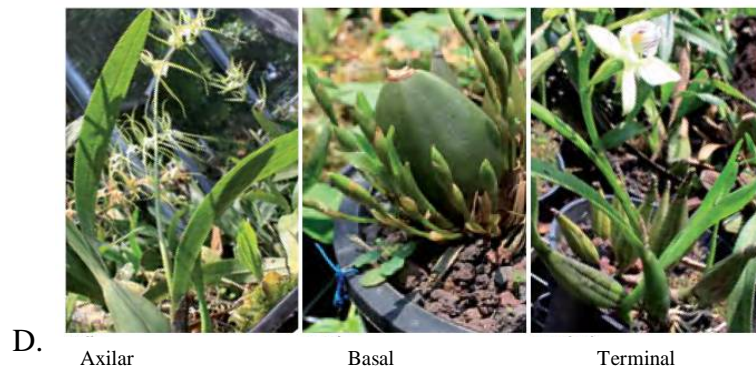
El androceo y el gineceo, se fusionan en una estructura denominada columna. La mayoría de las orquídeas presentan una única antera fértil, también hay con dos o tres, que son las menos, en donde el polen se encuentra aglutinado en unidades denominadas polinios. El gineceo se conforma de un ovario ínfero y de tres lóbulos estigmáticos, uno de ellos no receptivo, llamado róstelo, el cual puede secretar una sustancia pegajosa que auxilia en el proceso de polinización, adhiriendo los polinios al polinizador (Singer, 2009).



Fuente: Menchaca, 2011.



Fuente: Menchaca, 2011.



Fuente: Menchaca, 2011.

Fig. 1. Morfología de la familia Orchidaceae. A. Tipos de pseudobulbos; B. Estructura floral; C. Tipos de inflorescencias por su forma y D. por su inserción en la planta.

## 2.2. Género *Laelia*

El género *Laelia*, está formado por 11 especies, *L. albida*, *L. anceps*, *L. aurea*, *L. autumnalis* (Fig. 2), *L. crawshayana*, *L. eyermaniana*, *L. furfuracea*, *L. gouldiana*, *L. rubescens*, *L. speciosa* y *L. superbiens*, es endémico de México y ocupa diversos nichos ecológicos (Santos-Arenas *et al.*, 2006; Halbinger y Soto-Arenas, 1997). Su distribución abarca La Sierra Madre Occidental, El Eje Volcánico Transversal y La Sierra Madre del Sur. La mayoría de estas especies crecen por encima de los 2000 metros sobre el nivel del mar, sobre diversas especies de encinos (*Quercus*) y ocasionalmente en rocas (Halbinger y Soto-Arenas, 1997). Las flores de este género son denominadas “Flores Sagradas”, pues se usan principalmente en festividades religiosas, sobre todo en día de muertos; tal es el caso de *Laelia anceps* subsp. *dawsonii* f. *chilapensis* en Guerrero; *Laelia autumnalis* en Michoacán, Morelos y la Zona de Ocuilán, y Amecameca, en el Estado de México; *Laelia albida* y *Laelia furfuracea* en Oaxaca y *Laelia eyermaniana* en Durango. Las flores de *Laelia speciosa*, son recolectadas para las festividades del 10 de mayo y *Laelia superbiens* para celebrar el día de la Candelaria (Hágsater *et al.*, 2005).

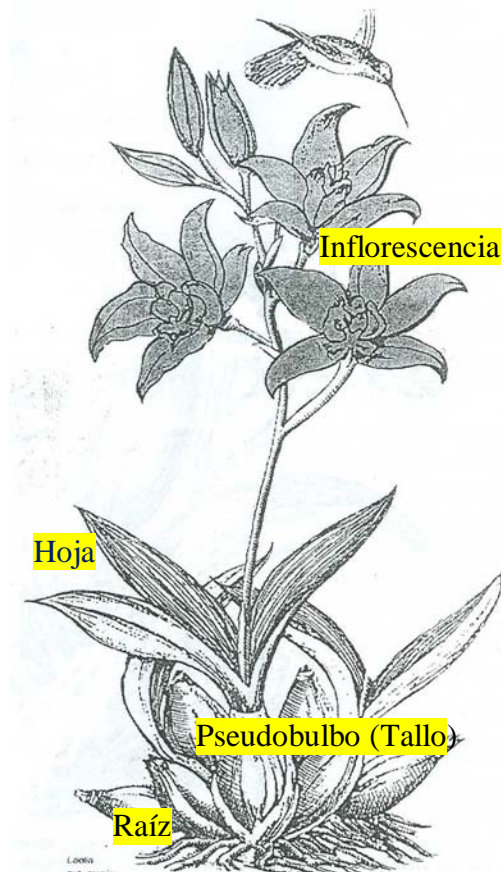


Fig.2. Ilustración de *L. autumnalis* en Ramírez, 1996.

Además de la importancia ornamental, el uso de las *Laelias* en el México Precolombino, fue la preparación de un mucílago o tzauhtli (también tzacutli) en náhuatl, que se extraía de los pseudobulbos deshidratados y molidos, el cual se utilizaba como mordente para pintura, como aglutinante de papel amate de algunos códices, en el arte plumario prehispánico y en la elaboración de figuras azucaradas, como las calaveritas que son parte de las ofrendas del Día de Muertos (Santos *et al.*, 2006; Hágsater *et al.*, 2005).

### **2.2.1. Conservación de *L. autumnalis***

Las orquídeas son uno de los recursos florísticos con mayor riqueza de especies y elevada importancia cultural y económica, estas características han propiciado que sus poblaciones se encuentren amenazadas. Para el caso del género *Laelia*, la sobrecolecta de las flores y pseudobulbos, han disminuido el número de individuos en poblaciones silvestres, además de la calidad de la planta, pues los nuevos brotes tardan en desarrollarse y cuando lo hacen son débiles y frecuentemente son atacados por microorganismos patógenos, lo que provoca una disminución en la producción del fruto, por lo que algunas poblaciones están en peligro de extinción. En suma, los frutos que alcanzan a madurar, producen miles de semillas sin reservas nutricionales y requieren la asociación de microorganismos específicos para germinar, por lo que sólo entre el 2 y 5% germina en condiciones naturales (Arditti y Ernst, 1993).

Una opción para la conservación de especies, son las técnicas de micropropagación que utilizan medios de cultivo seleccionados, las que permiten producir un gran número de plantas, debido a nutrientes seleccionados sustituyen la función del micobionte (Menchaca *et al.*, 2012).

Actualmente, existen protocolos de micropropagación para orquídeas mexicanas en peligro de extinción como *Bletia urbana* Dressler, *Cattleya aurantiaca* (Bateman ex Lindl.) P.N., *Chysis bractescens* Lindl., *Coryanthes picturata* Rehb.f., *Encyclia adenocaula* (Llave & Lex) Schltr., *Encyclia cordigera* (Kunth) Dressler, *Euchile citrina* (Llave & Lex) Whitner, *Euchile mariae* (Ames) Withner, *Epidendrum raniferum* Lindl.,

*Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & W.E.Higgins, *Laelia albida* Bateman ex Lindl., *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* (J. Anderson) Rolfe, *Laelia autumnalis* (Llave & Lex) Lindl., *Laelia rubescens*, *Laelia speciosa* (Kunth), *Lycaste skinneri* Lindl., *Mormodes badia* Rolfe ex Watson, *Oncidium cavendishianum* Bateman, *Oncidium stramineum* Lindl., *Oncidium tigrinum* Llave & Lex, *Paphiopedilum exstaminodium* (Castaño, Hágsater & Aguirre) V.A. Albert & Börge Pett, *Paphiopedilum caudatum* (Rolfe) V.A. Albert & Börge Pett., *Prosthechea vitellina* Lindl., *Rhynchoaelia digbiana* (Lindl.) Schltr., *Sobralia macrantha* Lindl., *Stanhopea oculata* Lindl., *Stanhopea tigrina* Bateman, *Vanilla insignis* Ames, *Vanilla planifolia* Andrews, *Vanilla pompona* Schiede, entre otras (Ávila-Díaz y Salgado-García, 2006; Suárez-Quijada *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2008; Lee-Espinosa *et al.*, 2008; Ruíz *et al.*, 2008; Ortega-Larrocea *et al.*, 2009; Menchaca *et al.*, 2012; Aguilar-Morales y López-Escamilla, 2013).

Con respecto a *L. autumnalis*, los esfuerzos por preservar a esta especie endémica de México, no se limitan a las técnicas biotecnológicas, las cuales forman parte de la conservación *ex situ*, sino que se han hecho estudios de conservación *in situ*. Esta estrategia de conservación, es la más adecuada para la permanencia de las especies, ya que mantiene la variación genética de las poblaciones (Rivas, 2001).

En la comunidad de Charapan, Michoacán, Luyando-Moreno *et al.* (2011), establecieron metodologías para la reintegración de plantas rescatadas de *L. autumnalis*, a un bosque de pino-encino, encontrando que la orquídea tiene afinidad por el forofito *Arbutus xalapensis* Kunth (*Ericaceae*), el cual permitió el desarrollo de esta planta epífita. Por otro lado, en el Pedregal Arócutin, que se localiza en la cuenca del lago de Pátzcuaro, Molina-Paniagua y Zamudio-Ruíz (2010), realizaron un estudio florístico y encontraron escasos ejemplares de la orquídea en el bosque de encino. Mientras que Halbinger y Soto-Arenas (1997), mencionan que en el Eje Volcánico Transversal, *L. autumnalis* alcanza densidades poblacionales de 100 a 500 individuos por hectárea, sin embargo, la mayoría de los especímenes son inmaduros o plantas no reproductivas. En la comunidad El Salto, ubicado en la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla, en Morelos, la densidad poblacional de esta especie ha disminuido, por la colecta de inflorescencias para el arreglo de altares, en las festividades de “día de Muertos”, la comercialización en mercados locales

o regionales a un costo entre los \$5.00 y los \$25.00 pesos mexicanos por inflorescencia (Beltrán-Rodríguez *et al.*, 2012).

Como las orquídeas forman parte de los productos forestales no maderables (PFNM), Menchaca *et al.* (2012) propone establecer viveros rurales que se coordinen con laboratorios de reproducción masiva de orquídeas, para proteger a las poblaciones naturales y su aprovechamiento se realice de manera sustentable.

Hay que considerar que no sólo se mantiene a la especie en cuestión, sino también a todos los organismos con los que se relaciona, desde polinizadores hasta aquellos que a simple vista no se ven, tal es el caso de los microorganismos endófitos, los cuales son inherentes a las plantas y establecen una asociación específica con su hospedero para mutuo beneficio, la planta provee al endófito alimento, hospedaje y protección, mientras que los endófitos confieren gran potencial adaptativo a sus hospederos frente a condiciones adversa de tipo abiótico (estrés hídrico, salino) o biótico (herbivoría, enfermedades).

La falta de investigación y entendimiento de estos microorganismos limita la implementación de su uso en diferentes áreas, tales como la agricultura, la industria, la medicina, sobre todo en países en vía de desarrollo (Abello y Kelemu, 2006).

Por tal motivo, esta investigación tiene el propósito de identificar a los endófitos presentes en los órganos de plantas de *L. autumnalis*, orquídea endémica de México, con potencial ornamental y medicinal.



### 2.3. Posición taxonómica según (Hágsater *et al.*, 2005)

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Liliopsida

ORDEN: Asparagales

FAMILIA: Orchidaceae

SUBFAMILIA: Epidendroideae

TRIBU: Epidendreae

SUBTRIBU: Laeliinae

GÉNERO: *Laelia*

ESPECIE: *Laelia autumnalis*

### 2.4. Descripción de la especie

(Halbinger y Soto-Arenas, 1997)

*Laelia autumnalis* (Llave & Lex) Lindl.

**Plantas** epífitas o litófilas, formando grupos, de 20-40 cm de alto excluyendo la inflorescencia. **Raíces** redondas, blanquecinas, 1-2.5 mm de espesor. **Rizoma** corto a un poco elongado, se compone de 3 entrenudos, 15-25 mm de largo, 6.5-8 mm de espesor. **Pseudobulbos** variables, fusiforme, cónico-ovoides a subglobosos, levemente comprimido, elípticos en sección transversal, con 3-4 entrenudos, verde oscuro, cubierto por restos de vainas papiráceo-escariosas, de 10 a 12 surcos longitudinales, 40-110 mm de alto, 12-40 mm de ancho, 22-35 mm de espesor. **Hojas** por lo general 2, arqueadas, estrechamente elípticas, elípticas a ensiforme, aguda a subaguda, coriáceas-carnosas, ligeramente carnosas, verde oscuro verde, comúnmente teñida de púrpura, de 9-23 x 1,6-3,8 cm. **Inflorescencia** de pseudobulbo maduro, erecto-arqueado, 40-100 cm de largo, el

pedúnculo ligeramente comprimido, color verde con puntos de color púrpura, de 4-5 mm de espesor, con 3-6 brácteas tubulares, aplanados, cada vez más cortos, cuando se extienden ovo-subtriangular, agudos a obtusos, ligeramente conduplicadas, escariosas en la antesis, blanco-marrón, 15-35 mm de largo; racimo alargado, de 4-13 flores, el raquis 8-36 cm de largo. **Brácteas florales** triangular-ovadas, obtusas, mucronadas, el revestimiento del ovario o divergentes de la misma, escariosos en antesis, marrón-blanquecino, 21.9 x 14.7 mm. **Flores** grandes y vistosas, resupinadas, fragancia algo débil, de 6.5-11 cm de diámetro, tépalos lila a magenta oscuro, los ápices de los sépalos son más oscuras; el labelo con lóbulos laterales blancos impregnados de color lila-magenta, lóbulo medio lila magenta, disco blanco a amarillo con rayas de color púrpura-violeta a lo largo de las venas, estas líneas casi ausentes en la forma *atrorubens*; callo blanco o amarillo en la base media, amarillo en el distal, con rayas púrpura-violeta y puntos cerca de la base y una línea de puntos desde el ápice del callo hacia el lóbulo medio; columna blanca a lila-magenta, a veces con manchas de color púrpura en la parte ventral; fragancia débil, a intensa a la luz del sol. **Ovario** pedicelado, subcilíndrico, engrosado hacia el ápice, 6-surcado, recto o arqueado, torcido o no, furfuráceo, verde oliva, base pálida, de 35-46 x 3-4.5 mm. **Sépalos** extendidos con los ápices acuminados y recurvados, muy poco furfuráceos en la superficie externa; **sépalos dorsal** lanceolado a estrechamente elíptico, de 41-67 x 11-21 mm; sépalos laterales algo oblicuos, lanceoladas de 38-70 x 9-17 mm. **Pétalos** extendidos, los ápices son planos a ligeramente curvados, lanceolados a elípticos, (a subrómicos en f. *xanthotrophis*) más amplios en el centro, agudos a casi acuminados, la base abruptamente subdesgarrada, la hoja cuneada a redondeada en la base, margen entero a ligeramente onduladas, 38-67 x 14-27 mm (hasta 34 mm en f. *xanthotrophis*). **Labelo** trilobulado, 34-48 mm de largo, 28-39 mm de ancho, cuando se extiende hacia fuera; la parte basal recta y subparalela a la columna, el ápice generalmente deflexo; lóbulos laterales erectos, oblongo-elípticas, muy redondeado, los márgenes enteros, algo involuto, de 22-31 x 10-14 mm; lóbulo medio elíptico a ovado, agudo a emarginado, mucronado, ápice deflexo, márgenes ondulados, 18-28 x 17-26 mm; callos simples, integrado por tres quillas longitudinales, desde la base hasta el comienzo del lóbulo medio, 22-23 mm de largo, 2 mm de alto; el central más bajo y por encima las quillas laterales. **Columna** ligeramente arqueada, sin alas, semiclavada, el cuniculo muy oscuro y poco visible, ca. de 2 mm de

profundidad, márgenes ventrales prominentes, 24-32 mm de largo y 7 mm de ancho en la cavidad estigmática; clinandrio con un diente una apical, triangular, agudo, deflexo, y minuciosamente denticulado bajo los márgenes. **Antera** cuadrado-cordiforme, truncada, de ocho células, blanco-crema, de 4 x 3 mm. **Polinario** 3.0-3.2 x 3.0-3.5 mm, compuesto por ocho polinios amarillos, comprimidos, los superiores flabelados, 1.2 x 1.5 mm, las inferiores oblicuamente lanceoladas, de 2,0 x 0,8 mm, conectado a caudicles granulosos, formando una placa continua, ca. de 2,5 mm de largo. **Rostelo** laminar, transversalmente oblongo-semielíptico ovado, redondeado, convexo, hialino a blanco, ca. 1,5-2,0 x 3 mm. **Cavidad estigmática** tri-lobulada, transversal elíptica de perfil, algo oculto, lóbulos estigmáticos conspicuos y ligeramente sobresalientes, redondeados, 2,5-4 x 6,4 mm. **Cápsula** elipsoide, liso, tri-quillado, con pocas o no bien definidas crestas lisas, 36 mm de largo, 28 mm de diámetro, con un pedicelo ca. 25 mm y un pico apical ca. 8 mm de largo.

**Nombres comunes:** “Flor de las ánimas”; “Flor de todos santos”; “Flor de encino”; “Flor de la calavera”; “Lirio de San Francisco”; “gallitos”; “San Dieguitos”.

**Usos:** extracción de lectinas de los pseudobulbos (Zenteno *et al.*, 1995); la infusión hecha con las flores alivia la tos (Hágsater *et al.*, 2005); cura la disentería; actúa como agente antiabortivo, antidiarreico, antitusivo, actividad tóxica contra el crustáceo *Artemia salina* L. (Espitia-Reyes *et al.*, 2004); propiedades antihipertensivas (Aguirre *et al.*, 2005; Vergara *et al.*, 2008).

**Distribución:** endémica del Eje Volcánico Transversal, y ha sido colectada en los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guanajuato, Estado de México, Morelos, Guerrero, Puebla y Distrito Federal (Halbinger y Soto-Arenas, 1997).

**Hábitat:** las plantas crecen frecuentemente sobre encinos y ocasionalmente sobre rocas a una altitud de 1400 a 2700 msnm, en ambientes secos o húmedos, caducifolios o perennifolios, bosques mixtos de pinos y encinos.

**Floración:** septiembre a noviembre, ocasionalmente diciembre.

**Status de conservación:** no amenazada, según la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT 2010 (SEMARNAT, 2010).

## 2.5. Microorganismos endófitos en orquídeas

Las plantas son colonizadas por una diversidad de microorganismos que tienen efectos deletéreos, neutrales o benéficos en el crecimiento de las plantas hospederas (Wilkinson *et al.*, 1994). El término “endófito” incluye a todos los organismos que crecen dentro de los tejidos vegetales sin causar aparentes síntomas de enfermedad (Petrini, 1991; Chanway, 1996), por ejemplo, bacterias (Tsavkelova *et al.*, 2004; Jalgaonwala y Raghunath, 2011; Ramos-Zambrano *et al.*, 2007; Gabino-Gutiérrez *et al.*, 2004); hongos (Kottke *et al.*, 2008; Stark *et al.*, 2009; Bougoure *et al.*, 2009; Beardmore y Pegg, 1981; Esnault *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 2007; Bayman y Lebrón, 1997; Ortega-Larrocea y Rangel-Villafranco, 2007; Maushara y Katsuya, 1994; Cameron *et al.*, 2006; Taylor y McCormick, 2008); plantas como *Arceuthobium* sp. (Marler *et al.*, 1999); insectos como *Ecdytolopha* sp. y *Marmara* sp. en *Rizophora mangle* (Feller 1995).

Las bacterias y los hongos, invaden a la planta a través de heridas, vectores, estomas, área de emergencia de raíces laterales, la degradación de la pared celular y colonizan inter e intracelularmente, sin embargo las primeras se localizan, de manera general, en el tejido vascular de la planta, mientras que los segundos, frecuentemente, en la raíz, formando endomicorrizas o ectomicorrizas (Schulz y Boyle, 2006). Los beneficios resultantes de la interacción planta-microorganismos, incluyen la fijación de nitrógeno atmosférico, síntesis de reguladores de crecimiento (Tsavkelova *et al.*, 2004), biocontrol a fitopatógenos, supresión al desarrollo de nematodos parasíticos, protección contra herbívoros, promotores del crecimiento de la planta (Jalgaonwala y Raghunath, 2011), ayudan a remover contaminantes (Pérez *et al.*, 2009).

La interacción de bacterias con orquídeas es poco conocida, pero se sabe que géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Arthrobacter*, *Kurthia*, *Erwinia*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Pantoea*, *Chryseobacterium*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Paracoccus*, *Clostridium*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, y *Gluconobacter* y géneros de hongos como *Xylaria*, *Tulasnella*, *Thanatephorus*, *Nectria*, *Hadotrichum*, *Colletotrichum*,

*Lasiodiplodia*, *Russula*, *Verticillium*, *Halocyphina*, *Gymnomyces*, *Penicillium*, *Coltricia*, *Gymnopus*, *Epacris*, *Metarhizium*, *Pestalotia*, *Rhizoctonia*, *Phoma*, *Ceratobasidium*, *Phomopsis*, *Hypoxyton* y *Bipolaris* (Gamboa-Gaitán, 2006; Bougoure y Dearneley, 2005; Bayman *et al.*, 1997; Ordóñez *et al.*, 2012) se han aislado de raíz, tallo y hoja de orquídeas terrestres y epífitas.

En México, estudios realizados en *Laelia furfuracea* y *Oncidium sphacelatum*, muestran que los géneros bacterianos asociados a estas orquídeas son *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum* y *Acetobacter*, siendo el primero el de mayor frecuencia (Zambrano *et al.*, 2007). En *Lycaste aromatica*, se encontraron los géneros *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Clostridium* y *Pantoea* (Gabino-Gutiérrez *et al.*, 2004). En cuanto a hongos, en *Laelia speciosa* se aislaron los géneros *Alternaria*, *Curvularia*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Myrmecridium*, *Neonectrina*, *Sordariomycetes* y *Tricholomataceae* y especies desconocidas de varios géneros más (Ávila-Díaz *et al.*, 2013), mientras que en *Cattleya skinneri*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Aspergillus*, *Epulohriza*, *Fusarium*, *Monillioopsis*, *Pestalotiopsis*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Penicillifer* y *Tetracladium* (Ovando *et al.*, 2005). En el cuadro 1, se presentan algunos ejemplos de endófitos bacterianos y hongos aislados en orquídeas.

## 2.6. Cronómetros moleculares

El cronómetro molecular es un ácido nucleico o proteína, los cuales permiten evaluar las relaciones filogenéticas entre distintos grupos de seres vivos, es decir, mide el cambio evolutivo. Los métodos más recientes para la determinación taxonómica de microorganismos, es el análisis molecular de las secuencias que codifican para los genes de los RNA ribosomales. Entre los distintos cronómetros evolutivos, se viene utilizando cada vez más el rDNA 16S en procariotas y el rRNA 18S en eucariotas; este último, está separado por dos espacios internos transcritos (ITS). Su uso se debe a que son moléculas muy antiguas, altamente conservadas y regiones con una alta variabilidad en su secuencia de nucleótidos; además, presentan secuencias llamadas “secuencias signatura”, que son oligonucleótidos cortos característicos de un determinado grupo de organismos. Hay

secuencias signatura exclusivas para cada dominio: *Bacteria*, *Eucarya* y *Archeae*, y para los taxones principales de cada uno de ellos. Con estas secuencias se puede ubicar a un organismo desconocido en el grupo filogenético principal que le corresponde (Panza, 2012).

Cuadro1. Ejemplos de bacterias y hongos endófitos encontrados en diferentes órganos en orquídeas.

BACTERIAS			
Planta hospedera	Endófito	Órgano	Autor
<i>Rhizanthella gardneri</i> R.S.	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> Stanier	Tejidos	Wilkinson <i>et al.</i> , 1994.
Rogers; <i>Calandelia latifolia</i> R. Br.;	<i>P. cepacia</i> Burkholder	subterráneos	
<i>Diuris longifolia</i> R. Br.;	<i>P. putida</i> (Trevisan) Migula		
<i>Pterostylis recurva</i> Lindl.;	<i>P. syringae</i> van Hall		
<i>Pterostylis vittata</i> Lindl.;	<i>Xanthomonas maltophilia</i> Swings <i>et al.</i> , 1983		
<i>Leporella fimbriata</i> (Lindl.) A.S. George;	<i>Cedecea neteri</i> Farmer <i>et al.</i> , 1983		
<i>Spiculaea 14rinite</i> Lindl.;	<i>Erwinia herbicola</i> (Löhnis) Dye		
<i>Thelymitra 14rinite</i> Lindl.;	<i>Klebsiella planticola</i> Bagley		
<i>Lyperanthus nigricans</i> R. Br.;	<i>Morganella morganii</i> (Winslow)		
<i>Diuris purdiei</i> Diels;	Jensen		
<i>Thelymitra fuscolutea</i> R. Br.;	<i>Salmonella choleraesuis</i> (Smith)		
<i>Eriochilus dilatatus</i> lindl.	Weldin		
	<i>Yersinia enterocolitica</i> Frederiksen		
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (Beijerinck) Baumann		
	<i>Bacillus cereus</i> Frankland & Frankland		
	<i>B. laterosporus</i> Laubach		
	<i>B. megaterium</i> Bary		
	<i>B. mycoides</i> Flugge		
	<i>B. pabuli</i> Schieblich		
	<i>B. subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn		
	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (Prazmowski) Ash		
	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (Meyer & Neide) Ahmed, Yokota, Yamazoe & Fujiwara		

Continuación cuadro 1.

<i>Laelia purpurata</i> Lindl. & Paxton; <i>Oncidium varicosum</i> Lindl.; <i>Miltonia flavescens</i> (Lindl.) Lindl.; <i>Dendrobium moschatum</i> Griff.; <i>Vanda tricolor</i> Lindl.; <i>Laelia flava</i> Lindl.; <i>Dendrobium fimbriatum</i> Hook; <i>Epidendrum</i> sp.; <i>Dendrobium nobile</i> Lindl.; <i>Coleogyne lawrenceana</i> Rolfe	<i>Azospirillum amazonense</i> Magalhães <i>et al.</i> , 1984	Raíz	Lange y Moreira, 2002
<i>Lycaste aromatica</i> Lindl.	<i>Bacillus circulans</i> Jordan <i>B. anthrasis</i> Cohn <i>B. cereus</i> Frankland & Frankland <i>B. licheniformis</i> (Weigmann) Chester <i>B. coagulans</i> Hammer <i>B. alvei</i> Cheshire & Cheine <i>B. laterosporus</i> Laubach <i>B. macerans</i> Schardinger	hoja	Gabino-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2004
<i>Dendrobium moschatum</i> Griff.	<i>Bacillus</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Nocardia</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Curtobacterium</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Xanthomonas</i>	Raíz	Tsavkelova <i>et al.</i> , 2004.
<i>Acampe papilosa</i> (Lindl.) Lindl.	<i>Bacillus</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Micrococcus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Streptomyces</i> <i>Xanthomonas</i>	Raíz	
<i>Laelia furfurácea</i> Lindl. y <i>Oncidium sphacelatum</i> Lindl.	<i>Azospirillum</i> <i>Enterobacter</i> <i>Pseudomonas</i>	Raíz, pseudobulbo y hoja	Ramos-Zambrano <i>et al.</i> , 2007.

Continuación cuadro 1.

	<i>Acetobacterias</i> <i>Herbaspirillum</i>		
<i>Paphiopedilum appletonianum</i> (Gower) Rolfe	<i>Streptomyces</i> <i>Bacillus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Burkholderia</i> <i>Erwinia</i> <i>Nocardia</i>	Raíz	Tsavkelova <i>et al.</i> , 2007.
<i>Pholidota articulata</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Strenotrophomonas</i> <i>Pantoea</i> <i>Chryseobacterium</i> <i>Bacillus</i> <i>Agrobacterium</i> <i>Erwinia</i> <i>Burkholderia</i> <i>Paracoccus</i>	Raíz	
<i>Cattleya walkeriana</i>	<i>Bacillus</i> <i>Burkholderia</i> <i>Enterobacter</i> <i>Curtobacterium</i>	Raíz	Galdiano <i>et al.</i> , 2011
<b>HONGOS</b>			
Planta hospedera	Endófito	Órgano	Autor
<i>Dactylorhiza sambucina</i> (L.) Soó; <i>D. maculata</i> (L.) Soó; <i>Platanthera bifolia</i> (L.) L.C.M. Richard	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Raíz	Marchisio <i>et al.</i> , 1985.
<i>Lepanthes</i>	<i>Xylaria</i> <i>Rhizoctonia</i>	Raíz y hoja	Bayman <i>et al.</i> , 1997.
<i>Cattleya skinneri</i> Bateman	<i>Trichoderma</i> <i>Verticilium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Epulorhiza</i> <i>Fusarium</i> <i>Monillioopsis</i>		Ovando <i>et al.</i> , 2005



Continuación cuadro 1.

	<i>Pestalotiopsis</i>		
	<i>Botrytis</i>		
	<i>Penicillium</i>		
	<i>Penicillifer</i>		
	<i>Tetracladium</i>		
<i>Bletia urbana</i> Dressler	<i>Epulorhiza</i>	Raíz	Ortega-Larrocea
<i>Dichromanthus aurantiacus</i> (La Llave & Lexarza) Salazar & Soto-Arenas	<i>Cerathorhiza</i>		y Rangel- Villafraco, 2009.
<i>Piperia yadonii</i> R. Morgan & J. Ackerman	<i>Phomopsis</i> <i>Ceratobasidium</i> <i>Neonectria</i> <i>Phialocephala</i>	Raíz	Sharma <i>et al.</i> , 2007.
<i>Bletilla ochracea</i> Schltr.	<i>Mycosphaerellaceae</i> Ascomycete sp. <i>Alternaria</i> sp. <i>Sebacina</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Nectria</i> sp.	Raíz y hoja	Tao <i>et al.</i> , 2008
<i>Gymnadenia conopsea</i> (L.) R. Br.	<i>Tullasnellaceae</i> <i>Ceratobasidiaceae</i> <i>Pezizales</i>	Raíz	Stark <i>et al.</i> , 2009.
<i>Dendrobium nobile</i> Lindl.	<i>Colletotrichum</i> sp. <i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx <i>Guignardia mangiferae</i> A.J. Roy <i>Xylaria</i> sp. <i>Hypoxylon</i> sp. <i>Pestalotiopsis vismiae</i> (Petrak) J. Xiang Zhang & T. Xu. <i>Phomopsis amygdale</i> (Delacr.) J.J. Tuset & M.T. Portilla <i>Phomopsis</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. <i>Fusarium proliferatum</i> (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg	Raíz, pseudobulbo hoja.	Yuan <i>et al.</i> , 2009.

	<i>Botryosphaeria</i> sp.		
	<i>Nemania</i>		
	<i>Rhizoctonia</i>		
	<i>Trichoderma chlorosporum</i> P. Chaverri & Samuels		
	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.		
	<i>Fusarium</i> sp.		
<i>Vanilla</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	Raíz	Ordoñez <i>et al.</i> , 2012.
	<i>Hypohylon</i> sp.		
	Xylariaceae		
	<i>Phoma</i> sp.		
	<i>Trichoderma</i> sp.		
	<i>Bipolaris</i> sp.		
<i>Laelia speciosa</i> (HBK) Schltr.	<i>Alternaria longissima</i> Deighton & MacGarvie	Semillas protocormos	Ávila-Díaz <i>et al.</i> , 2013
	<i>Alternaria</i> sp.	plántulas	
	Atractiellales sp.		
	Basidiomycete		
	<i>Curvularia affinis</i> Boedijn		
	<i>Cylindrocarpon pauciseptatum</i> Schroers & Crous		
	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.		
	Helotiales sp.		
	Hypocreales sp.		
	Lasiosphaeriaceae sp.		
	<i>Myrmecridium schulzeri</i> (Sacc.) Arzanlou, W. Gams & Crous		
	Nectriaceae		
	<i>Neonectria</i> sp.		
	<i>Penicillium</i> sp.		
	Sordariomycete sp.		
	<i>Tetracladium</i> sp. 1		
	<i>Tetracladium</i> sp. 2		
	Tricholomataceae		

### 2.6.1. rDNA 16S

El uso del rDNA 16S ha facilitado, en gran medida, la identificación de bacterias, incluyendo microorganismos no cultivables, y la elucidación de sus relaciones naturales, debido a que está presente en casi en todas las bacterias, frecuentemente existe como una familia de multigenes u operones; además, no ha sufrido cambios a lo largo del tiempo y posee 1500 nucleótidos; este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico, lo que brinda mucha información (Janda y Abbott, 2007), en comparación del rRNA 5S, con 120 nucleótidos; y del rRNA 23S, con 2900 nucleótidos, que lo hace menos manejable. Sin embargo, la secuencia del gen rRNA 16S no es muy usado para la diferenciación a nivel de especies, por lo que son necesarios los criterios bioquímicos biológicos para una adecuada determinación de la especie (Camarena y De La Torre, 2008).

### 2.6.2. ITS

Los genes de RNA ribosomales en eucariotas (conocidos como rDNA ribosomal o rDNA) se encuentran como unidades repetidas ordenadas en tándem; cada unidad consta de una región transcrita y otra no transcrita. En las regiones transcritas, los Espacios Transcritos Internos (ITS, por sus siglas en inglés *Internal Transcribed Spacer*), se encuentran a cada lado del gen 5.8S rRNA y son descritos como ITS1 e ITS2 (Sharma *et al.*, 2002) (Fig. 3). Los ITS, son los más utilizados en la identificación de hongos; pues los primers universales para PCR son diseñados a partir de estas regiones altamente conservadas y sus tamaños relativamente pequeños (600-700 pb), permiten su fácil amplificación, debido a su alto número de copias, en suma, con ellos se pueden comparar y delimitar géneros o especies muy cercanos (Bruns *et al.*, 1992; Guarro *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2002).

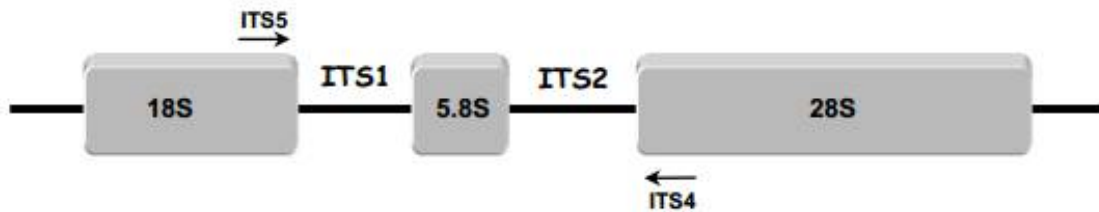


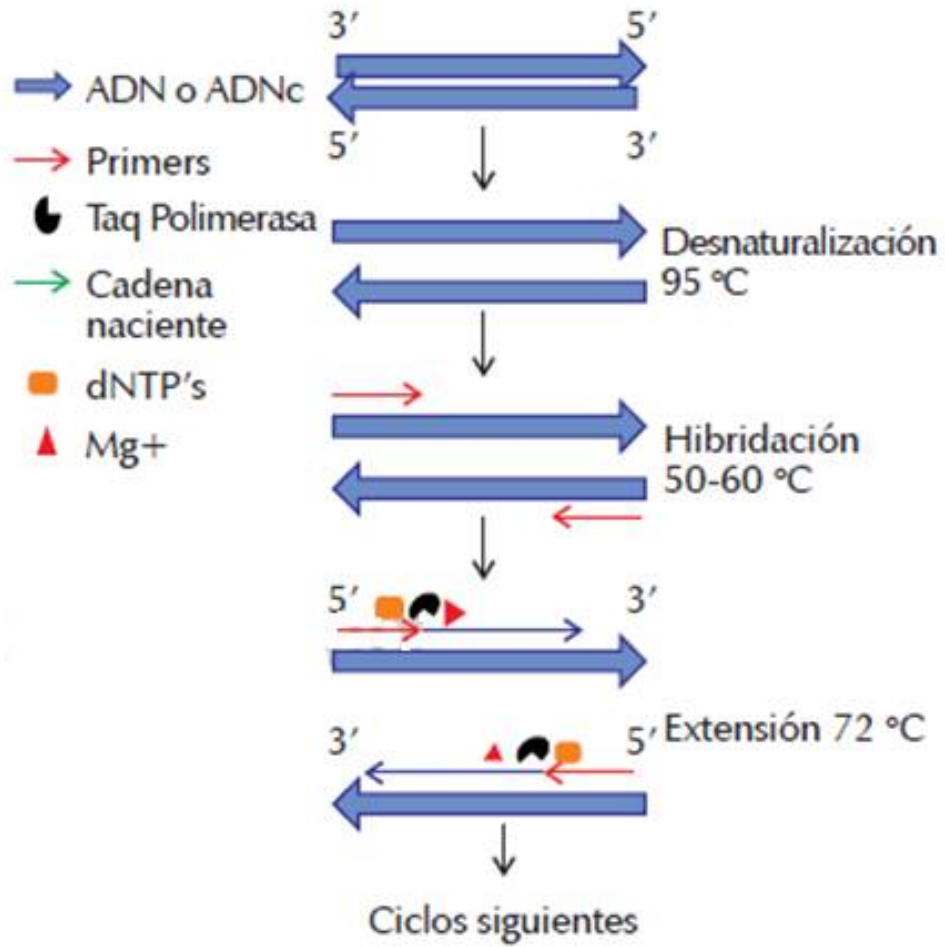
Fig. 3. Diagrama de la agrupación de genes que forman el rDNA fúngico. Los primers ITS5 e ITS4, actualmente, han sido utilizados para amplificar esta agrupación de todas las especies de hongos, produciendo un fragmento de entre 400 a 900 pb.

## 2.7. PCR punto final

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente y consta de 3 fases (Tapia-Tussell *et al.*, 2009; Tamay *et al.*, 2013):

1. Desnaturalización de la doble cadena de DNA, por medio de calor, entre 93 y 96 °C durante 20 a 30 segundos (s).
2. Alineación de los oligos o iniciadores, los cuales son secuencias cortas de entre 16 y 30 nucleótidos, al DNA molde, a una temperatura entre 55 y 65 °C.
3. Extensión de la cadena de DNA por medio de la enzima polimerasa que va uniendo nucleótidos en presencia de MgCl<sub>2</sub>; para que esto se lleve a cabo se requiere de una temperatura de 72 °C. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del DNA, es decir 5'-3'. Al final del ciclo se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases reconocidos.

Estas tres fases constituyen un ciclo de la PCR, que será repetido 30 o 40 veces, provocando un aumento exponencial de la secuencia objetivo cuyo resultado final serán millones de copias (Fig. 4).



Fuente: Tamay *et al.*, 2013.

Fig.4. Pasos de un ciclo de la PCR.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. Objetivo general.

Aislar, purificar e identificar de manera molecular bacterias y hongos endófitos presentes en raíz, tallo y hoja de plantas silvestres de *Laelia autumnalis* (Llave & Lex) Lindl. (Orchidaceae).

#### 3.2. Objetivos particulares

- Recolecta *in situ* de *L. autumnalis*.
- Aislar y purificar bacterias y hongos endófitos presentes en órganos (raíz, pseudobulbo y hojas) de plantas silvestres de *L. autumnalis*.
- Amplificar las regiones 16S del rDNA para bacterias y el ITS para hongos, mediante PCR, de cada uno de los tipos de endófitos encontrados en *L. autumnalis*.
- Comparar las secuencias obtenidas de los productos de PCR, con los números de accesoión depositados en el GenBank para su identificación.
- Conservar los cultivos obtenidos del aislamiento de las plantas de *L. autumnalis*, para su posterior reactivación.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Material biológico y sitio de recolecta**

Se recolectaron siete plantas silvestres con escapo floral en pre-antesis de *Laelia autumnalis* creciendo sobre *Gleditsia* sp. (*Leguminosae*) (“espina de Temazhualaca”), en un barranco dentro de un bosque de pino-encino (Fig. 5), en noviembre de 2012, en el poblado de Santiago Tochimizolco, el cual está situado en el Municipio de Tochimilco, Estado de Puebla, a una altitud de 2 150 msnm (Fig. 6). Sus coordenadas geográficas son los paralelos 18° 49' 12" y 49 ° 02' 54" de latitud norte y los meridianos 98° 31' 42" y 94° 43' 00" de longitud occidental. La temperatura media anual oscila entre los 12 y 18 °C. El clima es templado subhúmedo con lluvias en verano (INAFED, 2014).

### **4.2. Desinfestación y siembra del material biológico para el aislamiento**

Porciones de 0.5 cm<sup>2</sup> de raíces, pseudobulbos (tallos) y hojas asintomáticas de cada planta, tomadas al azar, se desinfectaron con una solución de NaOCl 1.5% (V/V) por 3 min, se enjuagaron con agua destilada estéril (3 veces), se secaron con papel estéril y fueron sembradas en papa-dextrosa-agar (PDA, SIGMA), tres repeticiones de cada órgano con tres fracciones, dando un total de 27 muestras analizadas por planta (Fig. 7), mantenidas a temperatura ambiente por cuatro días.

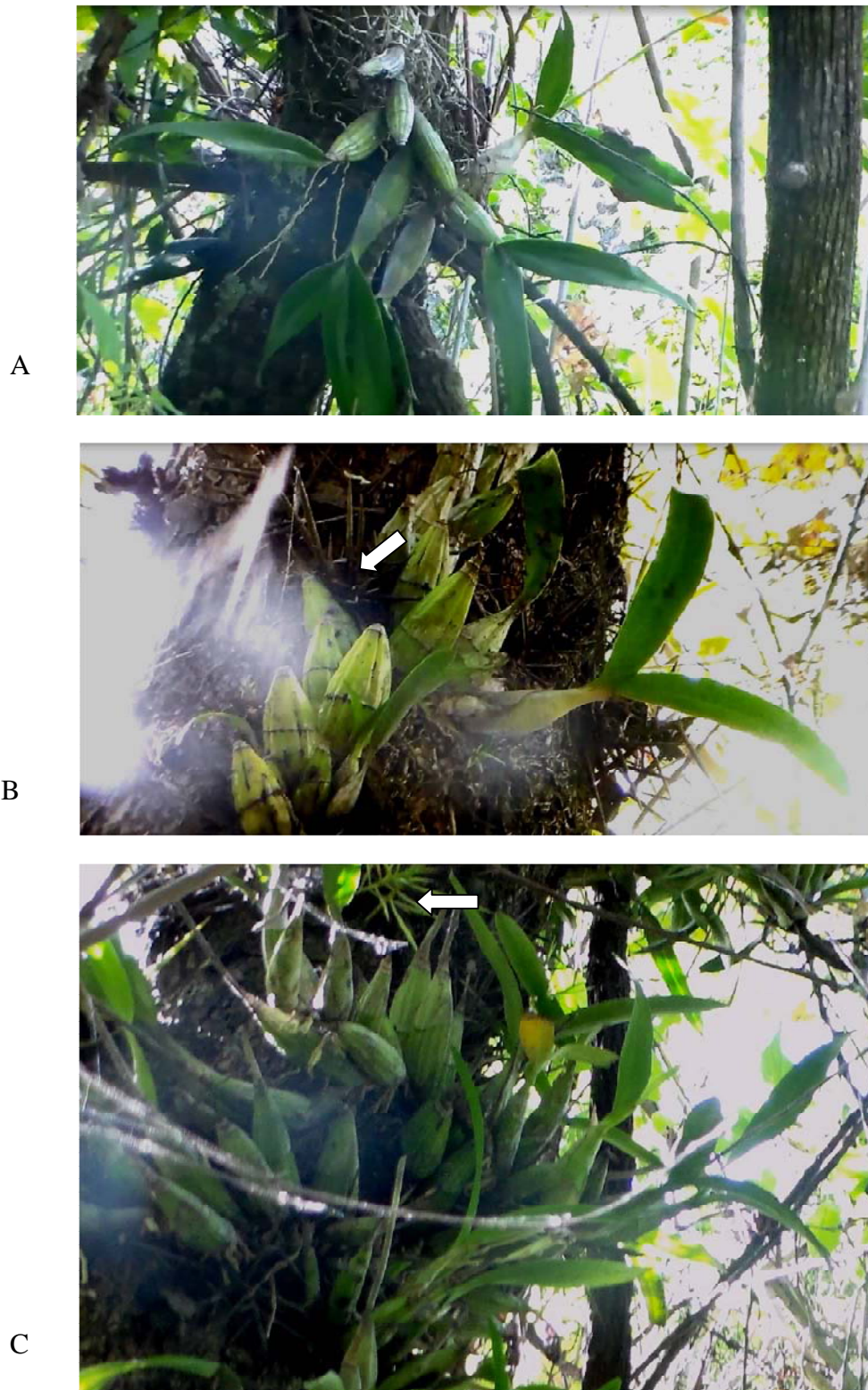


Fig. 5. *Laelia autumnalis* sobre *Gleditsia* sp. (“espina de Temazhualaca”). A. Crecimiento sobre tallo; B. *L. autumnalis* sobre espinas caulinares de *Gleditsia* sp.; C. La flecha (  $\Rightarrow$ ) indica espina caulinar joven.



C. Volcán Popocatepetl, visto desde la calle principal del poblado de Santiago Tochimizolco, México.



A. Estado de Puebla, mostrando la ubicación del Municipio de Tochimilco, México.



B. Imagen satelital de Santiago Tochimizolco.

Fig.6. Sitio de estudio. A. Localización del Municipio de Tochimilco, en la República Mexicana, al que pertenece el poblado de Santiago Tochimizolco; B. Mapa Topográfico de Santiago Tochimizolco; C. Calle principal de Santiago Tochimizolco y D. *L. autumnalis* en estado silvestre.

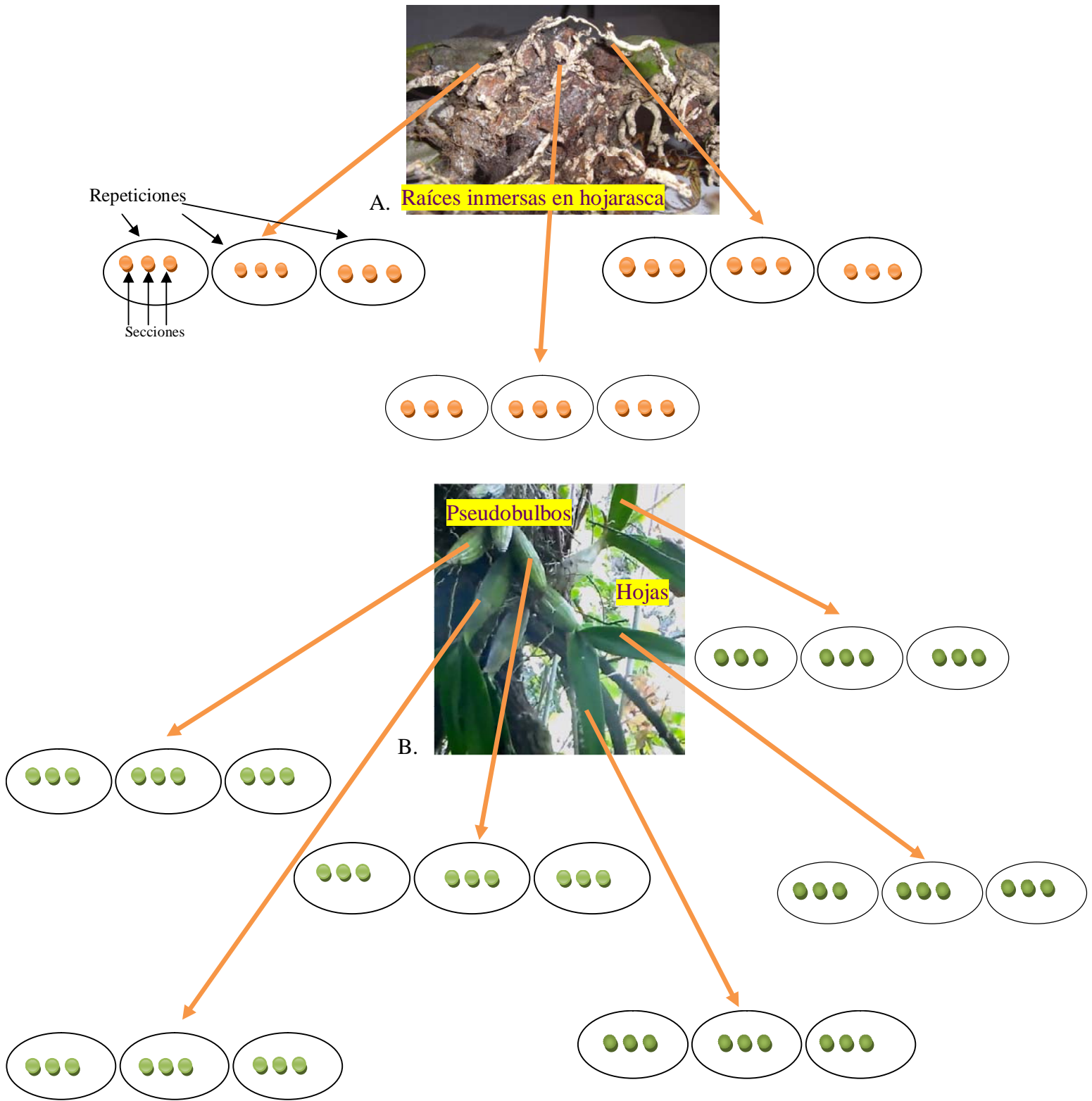


Fig.7. Selección al azar de las 3 secciones de: A. 3 raíces, B. 3 pseudobulbos y 3 hojas de cada una de las plantas colectadas de *L. autumnalis*, obteniendo un total de 27 repeticiones por planta sembrados en medio PDA.

#### **4.3. Aislamiento y purificación de bacterias y hongos endófitos**

Se tomó una asada de cada colonia bacteriana, teniendo cuidado de no tomar micelio, y se sembraron, por estría cruzada, en medio diferencial B de King. Se incubaron a 35 °C por tres días. Las colonias formadas se subcultivaron en medio B de King, para su purificación.

En cuanto a los hongos, porciones de 5mm<sup>2</sup> de la zona de crecimiento fueron sembrados en PDA y mantenidos a temperatura ambiente hasta la extracción de DNA.

#### **4.4. Conservación de las colonias bacterianas**

De los cultivos puros, se tomó una colonia, la cual fue introducida en un tubo Eppendorf de 1.5 ml conteniendo 500µL de caldo nutritivo (ANEXO 9.3) y 500µL de glicerol estéril, finalmente, se refrigeraron a 4 °C, para su conservación.

#### **4.5. Preservación de hongos**

Porciones de aproximadamente 0.2 cm<sup>2</sup>, de cada cepa, se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, conteniendo 1ml de una solución de agua destilada estéril adicionada con 500mg/L de ampicilina. Posteriormente, se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta su reactivación en medio PDA.

#### **4.6. Extracción de DNA genómico de los cultivos puros de bacterias y hongos**

Se tomaron cinco colonias de cada cepa bacteriana y se tomaron pequeños fragmentos de micelio raspados de la superficie de los cultivos; los cuales, fueron colocados en tubos Eppendorf de 1.5 ml, conteniendo 600µL de solución CTAB- Buffer. Posteriormente, fueron incubados a 65 °C durante 90 min; se adicionaron 500 µL de

cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo. Durante 10 min, los tubos se agitaron por inversión a temperatura ambiente. Después, se centrifugaron a 3 500 rpm, por 10 min para formar la fase acuosa y la fase orgánica. Se tomaron 600 µL de la fase acuosa y fueron vaciados a un nuevo tubo, adicionando, enseguida, 300 µL de isopropanol 100%, a -20 °C. Para precipitar la pastilla de DNA, se centrifugó a 13 000 rpm por 7 min. A continuación, se desechó el isopropanol por decantación y se realizaron dos lavados con etanol al 96% (V/V). Finalmente, se adicionaron 50 µL de Elution Buffer [Kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, USA)], a la pastilla de DNA seca.

#### **4.7. Amplificación del fragmento 16S rRNA (bacterias) e ITS1-5.8S rRNA- ITS2 (hongos)**

##### **4.7.1. 16SrRNA**

Se utilizaron los iniciadores universales que amplifican la subunidad menor del gene 16S del rDNA, PO (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y P6 (5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3') (Baggi *et al.*, 2004). El volumen final de la mezcla para PCR fue de 25 µL, conteniendo 1U de *Taq* DNA Polimerasa, 0.2 mM de dNTP's, 0.4 µM de cada iniciador; 2.5 µM de MgCl<sub>2</sub>; Buffer 1X; 16.8µL de agua (ultra PURE, Distilled Water DNase, RNase free, GIBCO), para cada muestra.

##### **4.7.2. ITS1-5.8S rRNA- ITS2**

Para la amplificación de ITS, se utilizaron los primers ITS4 (3'TCCTCCGCTTATTGATATGC5') e ITS5 (5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC3') (White *et al.*, 1990). La mezcla de reacción para PCR, consistió de 1U de *Taq* DNA Polimerasa, 0.2 mM de dNTP's, 0.8 µM de cada iniciador; 2.5 µM de MgCl<sub>2</sub>; Buffer 1X; 14.8µL de agua (ultra PURE, Distilled Water DNase, RNase free, GIBCO), para cada muestra.

Todas las reacciones de PCR, se realizaron en un TGradient Thermocycler Whatman Biometra, con un ciclo inicial a 94 °C por 5 min; 35 ciclos (94 °C por 30 s; 65 °C por 30 s; 72 °C por 1 min) y finalmente un ciclo a 72 °C por 10 min, para bacterias.

Las condiciones de amplificación para hongos fueron las siguientes: 94 °C durante 3 min; 35 ciclos (94 °C por 30 s, 58 °C por 45 s) y finalmente, un ciclo a 72 °C por 7 min.

Las amplificaciones se verificaron por electroforesis, en un gel de agarosa al 2%, preparado con 1X TAE Buffer (Tris Acetate-EDTA), corrido a 90 V cm<sup>-3</sup> por 45 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio (3 mgL<sup>-1</sup>) y las bandas se visualizaron con un transluminador Gel Doc XR (BIORAD, USA).

#### **4.8. Secuenciación**

Los productos de PCR de cada cepa, se enviaron al Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), para su secuenciación.

#### **4.9. Análisis de datos**

Para la construcción de las secuencias consenso se utilizó el programa BioEdit Sequence Alignment versión 7.0.9.0.

## 5. RESULTADOS

Las plantas silvestres colectadas en noviembre de 2012, época de floración de *Laelia autumnalis* (Llave & Lex) Lindl., no presentaron signos ni síntomas de enfermedad (Fig. 8). Las porciones de raíz, tallo y hoja sembrados en PDA, presentaron crecimiento de microorganismos a los cuatro días de haber sido sembrados (Fig. 9). De la obtención total de 89 aislamientos puros, 25 cepas fueron bacterianas y 64 de hongos. Al término de una semana y media, los cultivos tuvieron un buen crecimiento y para corroborar la presencia de DNA de la extracción, se corrió un gel de agarosa 2%. En aquellos cultivos que no mostraron presencia de DNA, como en las cepas 3, 5, 6, 8, 12, 15 de bacterias y 18, 22, 29, 30, 35, 37, 40, 41, 43, 60 y 64 de hongos (Fig. 10 y 11), se procedió a la reactivación de las colonias guardadas y, de esta manera, repetir la extracción.

Sólo 26, de las 64 cepas de hongos, sobrevivieron, y lograron reactivarse en medio PDA a temperatura ambiente, después de un mes de haber permanecido en conservación a 4 °C. En cuanto a las bacterias, su crecimiento fue mucho más lento en medio BK, después de haber sido conservadas, aún estando en incubación a 35 °C.

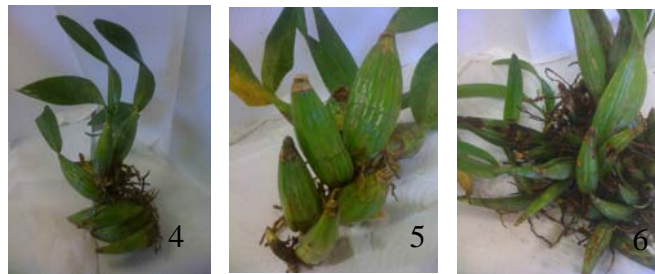
Las cepas de hongos reactivadas, y que se les extrajo DNA, corresponden a los folios 18, 31, 32, 33, 34, 41, 42, 45, 46, 47 y 48, los cuales fueron aislados de la raíz; los rotulados como 22, 36, 38, 39, 40, 55, 56, 58, 59, 60, 62 y 63, fueron aislados de tallo; ningún hongo procedente de hoja sobrevivió, por lo que no se pudo reactivar.

Cabe destacar, que para el caso de las bacterias, no hubo pérdidas de las cepas, por lo que se pudo extraer DNA de cada una de ellas, sin mayor dificultad. Los folios 6,7,8,9,10,11,12,13, 22, 23,24 y 25, corresponden a las cepas aisladas de raíz; mientras que 1,2,3,4,5,14,15,16,19 y 20, a las de tallo, y 17 y 18, a hoja.

Una vez obtenido el DNA de los microorganismos reactivados, se continuó con la amplificación del gen 16S rDNA, de las bacterias, e ITS del rDNA, de los hongos, mediante PCR punto final.



B.



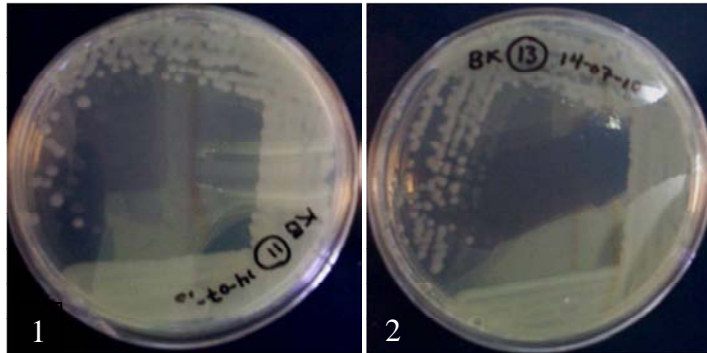
C.



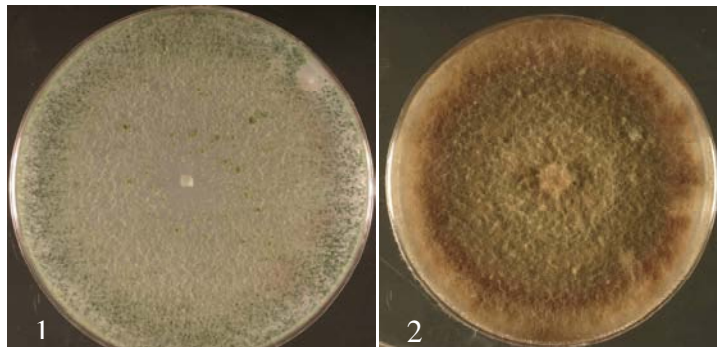
Fig. 8. Plantas silvestres de *L. autumnalis* recolectadas en noviembre de 2012. A. Raíz; B. pseudobulbos de las seis plantas recolectadas; C. Hojas. Todos los órganos son asintomáticos.



A.



B.



C.

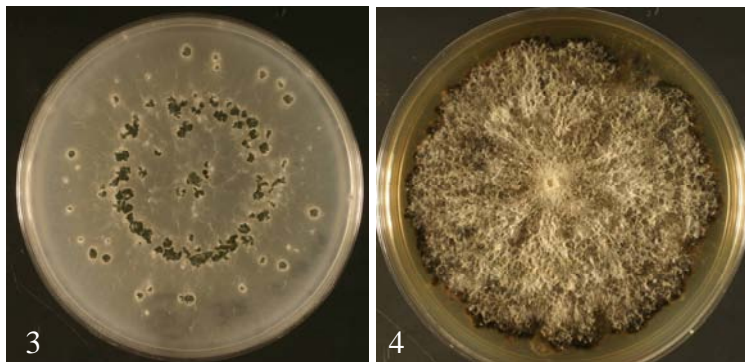


Fig. 9. A. Crecimiento de hongos en medio PDA sin purificar, a partir de secciones de tallo; B. Cepas bacterianas: 1) *B. weinhenstephanensis* y 2) *Paenibacillus* sp. y C. de hongos purificados: 1) *Hypocrea* sp.; 2) *Hypohylon begae*; 3) *Trichoderma* sp. y 4) *Xylaria* sp.



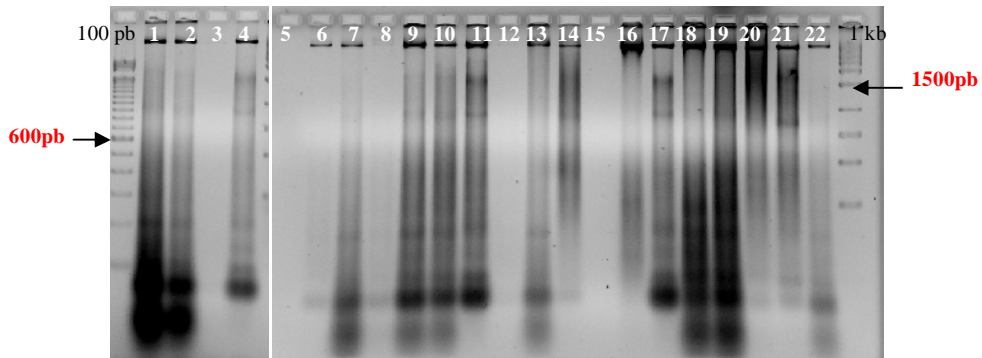


Fig. 10. Gel de electroforesis 2% cargado con el DNA genómico de las 25 cepas bacterianas encontradas en raíz, tallo y hoja de *L. autumnalis*. Marcador molecular de 100 pb (Invitrogen™) izquierda y 1Kb (Axygen) derecha.

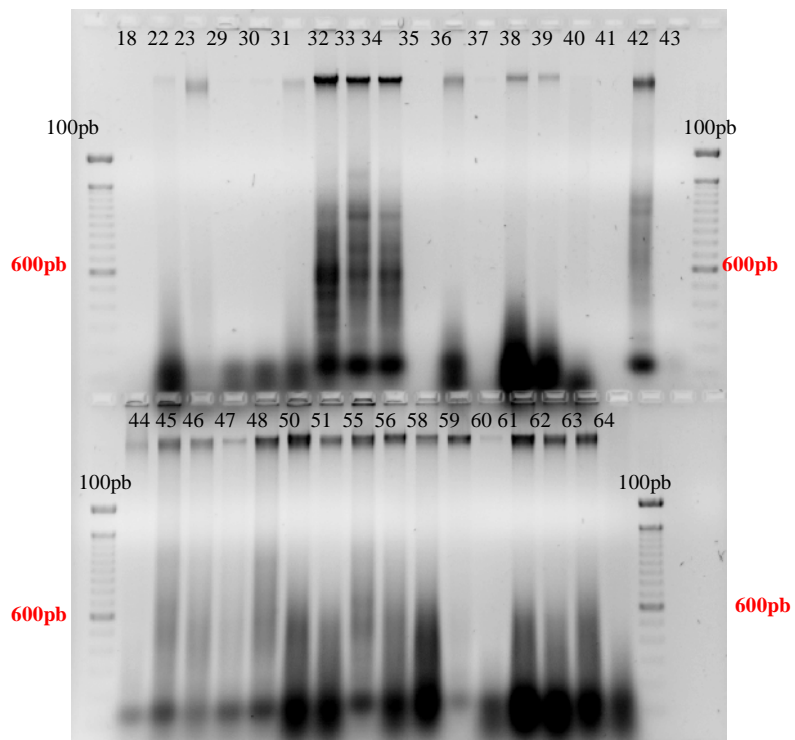


Fig. 11. Gel de electroforesis 2%, cargado con DNA genómico de los hongos aislados y reactivados de los diferentes órganos de *L. autumnalis*. Marcador molecular 100 pb (Invitrogen™) en ambos extremos.

## 5.1. Identificación molecular de las bacterias

De los 25 aislamientos bacterianos, 13 cepas se obtuvieron de la raíz, 10 de tallo y dos de hoja.

La amplificación de los productos de PCR de la región 16s del rDNA, generaron un fragmento de 1500 pares de bases (pb) con los primers universales PO (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y P6 (5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3') (Fig.12).

Los resultados del BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) para las 14 secuencias bacterianas que amplificaron con los primers universales utilizados (Anexo 9.1) indicaron que las cepas presentes en los órganos de la orquídea pertenecen *Phyla* Firmicutes y Proteobacteria; con respecto a Firmicutes, para el Orden *Bacilliales*, corresponden los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Curtobacterium*; y para Proteobacteria, el Orden *Burkholderiales*, está representado por el género *Achromobacter* (Cuadro 2.). Estos resultados corresponden al alineamiento local de las secuencias obtenidas, con las accesiones depositadas en el GenBank.

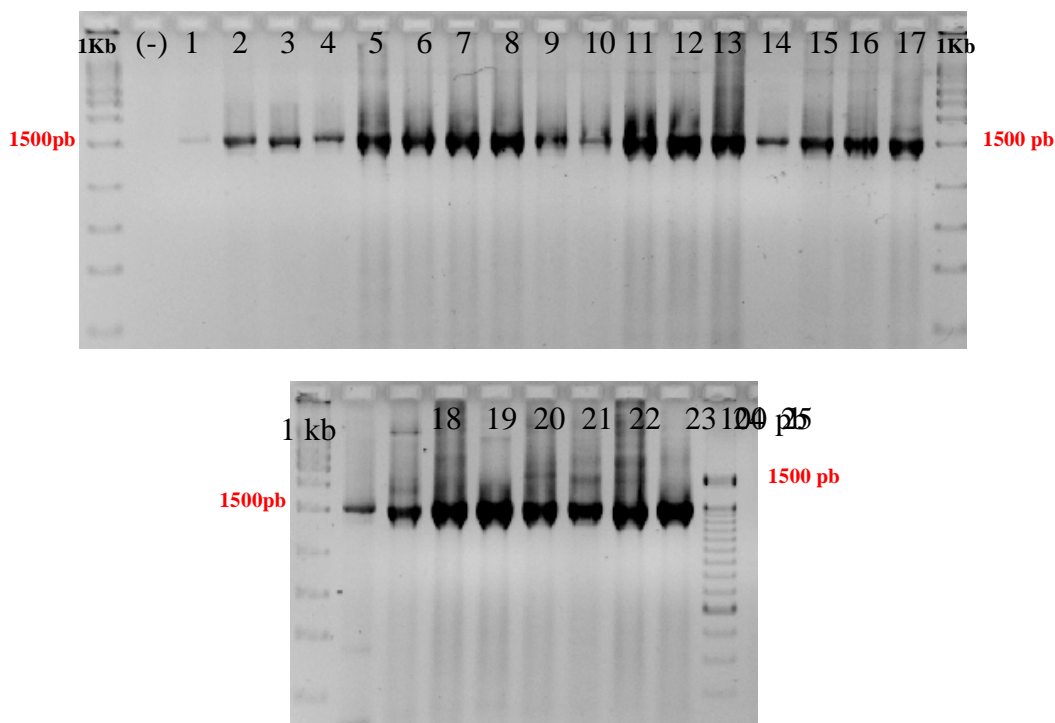


Fig. 12. Amplificación del fragmento 16s del rDNA de las 25 cepas bacterianas con los primers PO/P6, en gel de agarosa 2%. En los extremos de cada uno se indica el marcador molecular (1Kb, Axygen), así como el fragmento generado de 1500 pb.

**Cuadro 2.** Bacterias endófitas identificadas en *L. autumnalis*, a partir de la amplificación de la región 16S de acuerdo al BLASTn realizado en el GenBank.

Aislamiento	Homología en GenBank	Número de accesión	Tamaño del fragmento (pb)	Identidad (%)
<b>Raíz</b>				
6	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> Lechner <i>et al.</i>	KF777364.1	421	100
9	<i>Bacillus</i> sp.	HG794265.1		99
10	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> Meyer y Leiner	KF772243.1	302	
11	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	KF777364.1	439	100
12	<i>Bacillus</i> sp.	KC236656.1	438	99
13	<i>Paenibacillus</i> sp.	FR849932.1		99
21	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	KF777364.1	588	100
<b>Pseudobulbo</b>				
2	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	KF777364.1	661	100
5	<i>Paenibacillus polymyxa</i> Prasmowski	KC618483.1	574	100
14	<i>Achromobacter</i> sp.	JX53030.1	652	100
19	<i>Curtobacterium</i> sp	KC550159.1	456	100
20	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	KF777364.1	673	100
<b>Hoja</b>				
17	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	KF777364.1	480	100
18	<i>Bacillus mycoides</i> Flügge	KF732997.1	575	100

El género *Bacillus* está representado por *B. weihenstephanensi*, *B. mycoides* y *Bacillus* sp.; el género *Paenibacillus*, por *Paenibacillus polymyxa* y *Paenibacillus* sp., ambos géneros con sus respectivos representantes, excepto *B. mycoide*, que se encontró en hoja, están presentes en los tres órganos, raíz y pseudobulbo de *L. autumnalis*. Sin embargo, *Acromobacter* sp. y *Curtobacterium* sp., sólo se localizó en pseudobulbo.

En términos generales, el Orden Bacilliales, predomina en la estructura de toda la planta. Tanto en la raíz como en el pseudobulbo, se encontró la mayor cantidad de microorganismos procariotas, con respecto a las hojas.

## 5.2. Identificación molecular de los hongos

De los aislamientos obtenidos, 21 corresponden a la raíz, 24 a pseudobulbo y 19 a hoja.

Los productos de PCR amplificados de 23 cepas, generaron un fragmento de entre 500 y 700 pb, con los oligos ITS-4 e ITS-5 del rRNA ribosomal de los hongos (Fig. 13). El resultado del BLASTn para las secuencias (Anexo 9.2), asociaron a los hongos con dos clases de Ascomycetos (o sus anamorfos). A la Clase *Sordariomycetes*, pertenecen los géneros: *Hypocrea*; *Trichoderma*, con dos especies *T. viridescens*, *T. harzianum*; *Sordaria*; *Hypoxylon*; *Xylaria* y *Phomopsis*; mientras que para la Clase *Dothideomycetes*, corresponden los géneros: *Phoma*, *Epicoccum* y *Preussia*, con la especie *P. minima* (Cuadro 3).

Los géneros *Hypoxylon* y *Preussia* se localizaron tanto en raíz como pseudobulbo, mientras que *Trichoderma* (anamorfo), *Hypocrea* (teleomorfo), *Epicoccum*, *Sordaria* en raíz; *Xylaria*, *Sordariomycetes*, *Phoma*, *Phomopsis* y *Colletotrichum* sólo en pseudobulbo.

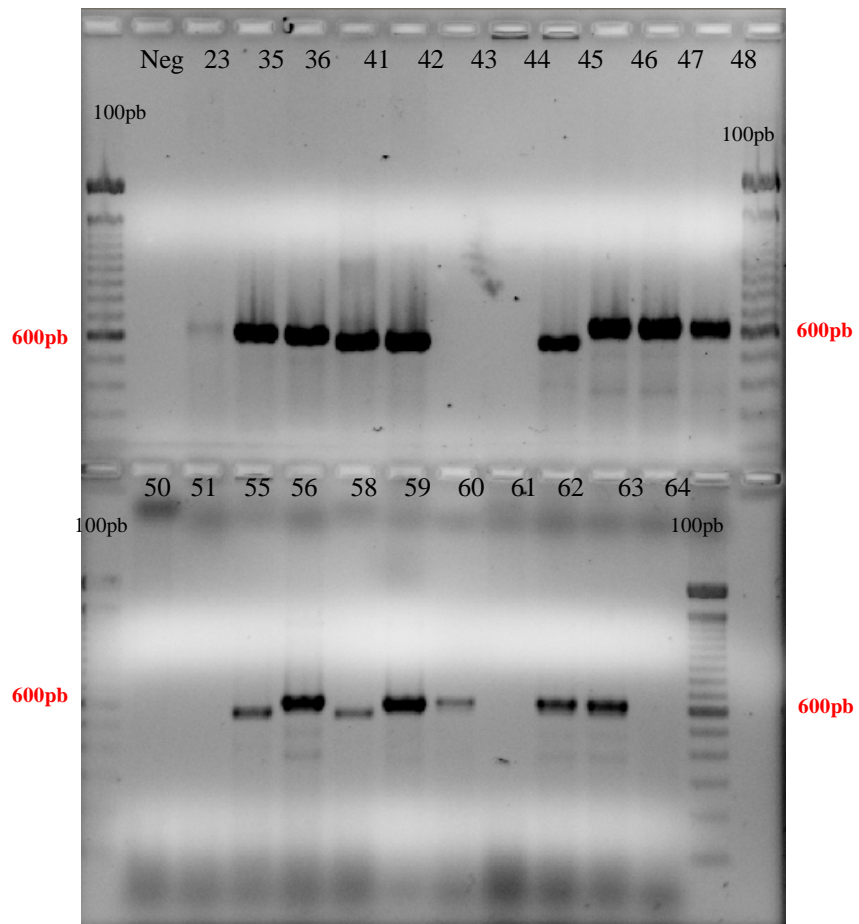
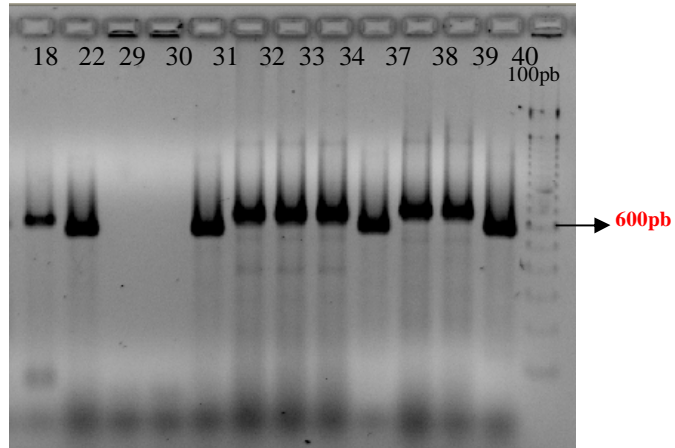


Fig. 13. Electroforesis en agarosa 2%, mostrando los fragmentos amplificados con los primers ITS-4 e ITS-5 (aproximadamente 600 pb) de hongos aislados de raíz y pseudobulbo de *L. autumnalis*. Marcador molecular 100 pb (Invitrogen™).

**Cuadro 3.** Hongos endófitos identificados en *L. autumnalis*, a partir de la amplificación de la región ITS, de acuerdo al BLASTn realizado en el GenBank.

Aislamiento	Homología en GenBank	Número de accesión	Tamaño del fragmento (pb)	Identidad (%)
<b>Raíz</b>				
31	<i>Hypoxylon begae</i> Y.M. Ju y J.D. Rogers	JN660820	501	96
32	<i>Trichoderma viridescens</i> (A.S. Horne y H.S. Will) Jaklitsch y Samuels	KF691740	470	100
33	Uncultured <i>Trichoderma</i> clone	JF449871	571	100
34	<i>Trichoderma</i> sp.	JF773648	468	100
41	<i>Epicoccum</i> sp.	FJ176473	405	100
42	Uncultured fungus clone	KF800356	405	100
45	<i>Preussia minima</i> (Auersw.) Arx	AY943054	510	100
46	<i>Hypocrea</i> sp.	KF746146	481	100
47	<i>Hypocrea</i> sp.	KF746146	478	100
48	<i>Hypocrea</i> sp.	KF746146	500	100
18	<i>Sordaria</i> sp.	JN207345		99
<b>Pseudobulbo</b>				
22	<i>Hypoxylon begae</i> Y.M. Ju y J.D. Rogers	JN660820	501	96
36	<i>Xylaria</i> sp.	KF573972	374	97
38	Uncultured endophytic fungus	GQ219855	504	99
39	<i>Sordariomycetes</i> sp.	JQ761698	385	99
40	<i>Phoma</i> sp.	JX436806	401	100
55	<i>Preussia minima</i> (Auersw.)Arx	AY943054	505	100
56	<i>Colletotrichum</i> sp.	EU482211	460	100
58	<i>Hypoxylon begae</i> Y.M. Ju y J.D. Rogers	JN660820	482	96
59	<i>Phomopsis</i> sp	EU715618	489	99
60	<i>Colletotrichum</i> sp.	EU482211	450	100
62	<i>Colletotrichum</i> sp.	EU482211	470	100
63	<i>Colletotrichum</i> sp.	EU482211	453	100

## 6. DISCUSIÓN

Los microorganismos más comúnmente encontrados como endófitos en las plantas, son las bacterias y los hongos (Strobel *et al.*, 2004) y pueden estar como mutualistas, saprófitos o patógenos latentes, de acuerdo con la edad del hospedero y las condiciones ambientales.

En *L. autumnalis* se aislaron un total de 89 cepas bacterianas y de hongos. Normalmente, cuando se hablan de endófitos se da mucho énfasis a los hongos, sin embargo, las bacterias les confieren efectos benéficos a sus hospederos, tales como fijación de nitrógeno, síntesis de reguladores de crecimiento, activación de los mecanismos de defensa del hospedero, resistencia a nematodos, tolerancia a la salinidad y sequía, entre otros (; Rosenblueth y Martínez-Romero, 2006; Yang *et al.*, 2012).

Una de las familias bacterianas, cuyos miembros se encuentran asociados frecuentemente a plantas es la *Bacillaceae*. El grupo de *Bacillus cereus*, está representada por cuatro especies, dos de las cuales se encuentran en los órganos de *L. autumnalis*. Uno de ellos es *Bacillus weinhenstephanensis*, el cual se aisló de los tres órganos, raíz, pseudobulbo y hoja, sin embargo Compant *et al.* (2011) confirma la presencia del microorganismo en la pulpa de los frutos de la vid. Cabe mencionar que *B. weinhenstephanensis* es conocido por provocar intoxicaciones alimentarias, debido a la producción de enterotoxinas, las cuales causan diarrea en el humano (Hansen *et al.*, 2001; Guinebre *et al.*, 2008). La otra especie es *Bacillus mycoides*, microorganismo que se encuentra en el suelo, sin embargo, en la *L. autumnalis* se aisló de hoja y se ha utilizado como control biológico en remolacha (*Beta vulgaris* L.), reduciendo la enfermedad provocada por *Cercospora beticola* Sacc. (Bargabus *et al.*, 2003).

Otra de las bacterias aislada de raíces en *L. autumnalis* fue *Bacillus* sp. Wilkinson *et al.* (1994) reportaron el aislamiento del microorganismo en raíces de algunas orquídeas terrestres en Australia Occidental, mientras que Tsavkeslova *et al.* (2007), de la rizósfera de *Paphiopedilun appletonianum* (Gower) Rolfe y del rizoplano de *Pholidota articulata* Paxton., Tsavkelova *et al.* (2001) encontraron en raíces de *Calanthe vestita* var. *rubro-oculata* y en *Dendrobium moschatum* (Buch.-Ham.)Sw. y Galdiano *et al.* (2011) en

*Cattleya walkeriana* Gardn. Se han inoculado plántulas cultivadas *in vitro*, con este microorganismo, para aumentar el porcentaje de supervivencia en la aclimatización.

*Paenibacillus polymyxa* (antes *Bacillus polymyxa*) y *Paenibacillus* sp., identificados en raíz y pseudobulbos de *L. autumnalis*, se les encuentra en el suelo, la rizósfera y en las raíces de plantas cultivadas, como trigo, maíz, sorgo caña y cebada, así como en especies forestales y en sedimentos marinos (Lal, 2009). Estos microorganismos les confieren muchos beneficios a sus hospederos, tales como fijación de nitrógeno, solubilización del fósforo en el suelo, producción de antibióticos, exopolisacáridos (metabolitos secundarios ampliamente utilizados en la industria de alimentos, medicina y cosméticos), quitinasas, enzimas hidrolíticas, síntesis de reguladores de crecimiento, así como actividad antagónica contra hongos y herbívoros (Raza *et al.*, 2008).

El hecho de encontrar bacterias de la rizósfera como *B. mycoides*, *Bacillus* sp., *P. polymyxa* y *Paenibacillus* sp. en órganos aéreos, como pseudobulbos y hojas de *L. autumnalis*, habla de la capacidad que tiene el endófito de colonizar otros órganos vía tejido vascular, propiamente xilema. El primer paso es entrar en la raíz del hospedero, de ahí se mueven a los tejidos de las plantas invadiéndolos internamente autotransportándose por el tejido vascular y colonizándola sistémicamente (Germaine *et al.*, 2004).

*Lysinibacillus sphaericus* (antes *Bacillus sphaericus*) es otra bacteria aislada de raíz en *L. autumnalis*, éste microorganismo ha sido frecuentemente usado para el control biológico de especies de mosquitos, tales como *Anopheles* y *Culex*, vectores de enfermedades importantes en el hombre; la actividad insecticida está directamente relacionada a la síntesis, durante la esporulación, de cristales paraesporales (proteínas cristalizadas), BinA y BinB, toxinas que tienen la capacidad de matar larvas de los vectores que provocan la malaria, el dengue, la filariasis, etc. (Baumann *et al.*, 1991; Charles *et al.*, 1996).

El número de hongos (64 cepas) encontrados en los diferentes órganos de *L. autumnalis* supera al de bacterias (25 cepas), lo cual concuerda con Dreyfuss y Chapela (1994), al mencionar que los endófitos que más frecuentemente se aíslan de los tejidos vegetales son los hongos, ya que hay aproximadamente 1 millón de hongos endófitos



descritos y pueden producir varios químicos bioactivos que tienen potencial como biocontrol y resistencia a fitopatógenos (Sun *et al.*, 2012), o bien como fuente de compuestos utilizables en la industria farmacéutica como anticancerígenos, antimoduladores, antioxidantes, antiparasíticos, antivirales, antituberculares, entre otros (Strobel *et al.*, 2004), además, en los ecosistemas tienen un papel fundamental en el ciclaje de nutrientes.

Está reportado que géneros como *Xylaria*, *Phoma*, *Hypoxyton* producen citocalasinas (Wagenaar *et al.*, 2000), las cuales poseen actividad antibiótica y antitumorales, pero a causa de la toxicidad celular que presentan, no se explotan en la industria farmacéutica. Sin embargo, especies de *Phoma* aislados de diferentes hospederos, han sido reportados como fuente prometedora de compuestos antimicrobianos contra fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* Schldl., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)Penz. y Sacc., *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch., *Aspergillus niger* Tiegh., *Staphylococcus aureus* Rosenbach., *Xanthomonas campestris* (Xcc) y *Xanthomonas oryzae* (Xoo) (Kaul *et al.*, 2012; Hoffman *et al.*, 2008; Santiago *et al.*, 2012). Además, aquellas especies de *Phoma*, aislados de *Garcinia* sp. y *Garcinia dulcis* (Roxb.) Kurz (Guttiferae), producen compuestos capaces de combatir a *Mycobacterium tuberculosis* (Isaka *et al.*, 2001; Rukachalsirikul *et al.*, 2008).

Por otro lado, los miembros del género *Hypoxyton* viven como saprófitos o patógenos débiles, y los que se encuentran como endófitos, producen compuestos orgánicos volátiles (VOC's, Volatile Organic Compounds), ya sea con actividad biológica contra *Botrytis cinerea* Pers., *Phytophthora cinnamomi* Rands., *Cercospora beticola* Sacc. y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, o bien, como precursores en la producción de combustibles o sus aditivos, ahora conocidos como Mycodiesel (San Martín *et al.*, 1999; Tomscheck *et al.*, 2010).

Otro microorganismo que produce VOC's es *Phomopsis* sp., el cual fue aislado de *Odontoglossum* sp, dichos compuestos actúan contra hongos fitopatógenos como *Pythium*, *Phytophthora*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Verticillium* y *Colletotrichum* (Sanjay *et al.*, 2011). De *Vanilla albidina*, se aisló *Phomopsis archeri* B. Sutton, este

endófito produce sesquiterpenos aromáticos, fomoarquerinas A-C, las cuales muestran actividad antimalaria contra *P. falciparum* (Hemtasin *et al.*, 2011).

Otro microorganismo empleado en la industria es *Preussia minima*, el cual ha sido aislado de *Eremophila longifolia* F. Muell (Myoporaceae), planta australiana utilizada en la medicina tradicional. Este microorganismo produce una  $\alpha$ -amilasa. Las  $\alpha$ -amilasas tienen una amplia aplicación tanto en la elaboración de cerveza, en productos para hornear, en textiles y detergentes (Zaferanloo *et al.*, 2014).

*Trichoderma* y su telomorfo *Hypocrea* son los ascomicetos más reportados como endófitos colonizando raíces y es común encontrarlos habitando el suelo, sin embargo, algunas cepas crecen en la superficie foliar, flores o frutos. Estos microorganismos producen una gran cantidad de sustancias antibióticas y también estimulan a sus hospederos a producir sus propios compuestos antimicrobianos, además poseen actividad micoparasítica, es decir, parasitan a otros hongos (Harman *et al.*, 2004).

Es sabido que las especies de *Epicoccum*, producen compuestos heterocíclicos con propiedades bactericidas, por lo que ha sido empleado como agente en el control biológico de patógenos en las plantas (da Silva Araújo *et al.*, 2012) y es común encontrarlos en el aire como epífitos o en asociación con diversos sustratos (Yandry *et al.*, 2006).

La importancia para la existencia de esta simbiosis, radica en el estado fisiológico de la planta y de las condiciones ambientales a las que esté expuesta, pues de él dependerá si la relación será de carácter mutualista o parasítico (Redman *et al.*, 2001). Tal es el caso de *Colletotrichum*, que en *Cattleya* y *Laelia*, entre otros géneros de orquídeas, causa “antracnosis”, la cual se manifiesta, inicialmente, como manchas foliares de apariencia clorótica o amarillenta, que posteriormente toman coloración parda y en las que ocurre necrosis (Ángel *et al.*, 2001). Sin embargo, en *Artemisia mongolica*, se encontró a *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. como endófito, produciendo ácido coletótrico, el cual muestra actividad antibacterial y contra el hongo *Helminthosporium sativum* P.K. & B. (Zou *et al.*, 2000). Por otro lado, en *Artemisia annua* L. (Asteraceae), planta medicinal china, se aisló *Colletotrichum* sp., el cual no sólo produce metabolitos contra hongos o bacterias patógenas en humanos, sino también metabolitos que fueron

fungistáticos a hongos patógenos de plantas (Lu *et al.*, 2000). *Colletotrichum* sp., se aisló de pseudobulbos asintomáticos en *L. autumnalis*, lo que explica que este hongo puede ser un patógeno primario, secundario o saprófito (Ángel *et al.*, 2001).

Si se quiere conocer más a fondo el papel que juegan los endófitos aislados en *L. autumnalis*, se debe recurrir a la preservación idónea de cada una de las cepas bacterianas y fúngicas, ya que de las 64 cepas de hongos y 25 de bacterias encontradas, sólo 23 y 14, respectivamente, fueron identificadas. Los hongos endófitos aislados en hoja, no se pudieron reactivar. La cantidad de inóculo utilizado en la preservación juega un papel fundamental, así como la etapa de desarrollo del microorganismo (Rico *et al.*, 2004). El método más recomendado tanto para bacterias como para hongos, consiste en usar agua destilada estéril, adicionar el inóculo y guardar en refrigeración a 4 °C; sin embargo Morales *et al.* (2010) señalan que este procedimiento puede provocar mutaciones ocasionando la pérdida de la cepa que originalmente fue aislada, y para el caso de las bacterias, puede causar la muerte de las colonias por la liberación de sus componentes, los cuales, pueden ser aprovechados por otras bacterias para su crecimiento consecutivo. Godínez y Calderón (2008), notaron que la preservación en agua destilada de algunas especies de hongos, dio como resultado la disminución de la viabilidad con el tiempo, así como alteración en las características morfológicas, por ejemplo en color y aspecto; por lo que se sugiere no conservarlas por este método por más de un mes.

Por esta razón, ningún método de conservación es universal, por lo que se debe elegir el método que más se ajuste al microorganismo que se desee preservar, a la infraestructura del laboratorio y a los métodos técnicos, así como la finalidad con que serán utilizados.

Otro factor que intervino en la no identificación de los microorganismos cuya extracción de DNA fue exitosa, fue la utilización de los primers adecuados. Cuando la identificación de los hongos no es posible con los ITS, se recurre al análisis de regiones adicionales del genoma, tales como RPBI, RPB2, TEF1- $\alpha$ ,  $\beta$  tubulina y  $\gamma$ -actina (Schmith *et al.*, 2009); para bacterias existen los rpo B, gyr B, rpo D, atp D y EFTu.

Adicionalmente, no todos los microorganismos endófitos crecen en medios artificiales, por lo que su detección no es posible mediante el cultivo en el laboratorio, por lo que las técnicas moleculares son de gran utilidad en la identificación de éstos (Gamboa-Gaitán, 2006).

Cabe destacar que la diversidad de endófitos depende en gran medida del estado fisiológico y edad de la planta; mientras que las condiciones ambientales a la que esté expuesta, repercuten en la expresión de los mismos, ya sea como mutualistas o patógenos.

Muchas de las plantas medicinales, deben sus propiedades no por la producción de los metabolitos que llegan a sintetizar por sí mismas, sino por el estímulo que generan los microorganismos que habitan en ellas; un claro ejemplo es el taxol, un diterpeno producido por el hongo endófito *Taxomyces andreanae* Strobel, A. Stierle, D. Stierle y W.M. Hess aislado de *Taxus brevifolia* Peattie (Taxaceae), que se utiliza en el tratamiento de cáncer de ovario y de mama; posiblemente los endófitos (hongos y/o bacterias) identificados en *L. autumnalis* poseen potencial para la obtención de compuestos bioactivos y ser utilizados como agentes agroquímicos o fármacos. Sánchez-Fernández et al. (2013) proponen estrategias para el descubrimiento de metabolitos secundarios provenientes de microorganismos endófitos, que pueden tener implicaciones en la agricultura y la medicina, las cuales consisten en la selección de las plantas hospedereas; caracterización taxonómica de los endófitos puros; cultivar a los microorganismos en pequeña escala para establecer las condiciones óptimas de crecimiento; preparación de extractos, tanto del medio de cultivo como de los micelios o colonias bacterianas; aislamiento de los compuestos bioactivos mediante estudios químicos biodirigidos y, finalmente, determinar la toxicidad de dichos compuestos.

En suma, dichos microorganismos serán de gran utilidad en la aclimatización de plántulas propagadas *in vitro*, para aumentar el porcentaje de sobrevivencia y tener más ejemplares para reintroducirlas a su hábitat, ya que la densidad poblacional de esta especie se ve afectada dado su uso como planta de ornato en las festividades.

## 7. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES

- Se encontró mayor número de hongos (64 cepas) que de bacterias (25 cepas) en los órganos de *L. autumnalis*, de las cuales 23 y 14, respectivamente, se identificaron.
- En raíz y pseudobulbo de *L. autumnalis* se localizó mayor número de endófitos, con respecto a la hoja.
- Representantes del género *Bacillus*, se sitúan en toda la planta. En cuanto a los hongos, *Trichoderma* y su telemorfo *Hypocrea*, así como *Epicoccum*, sólo se ubicaron en raíz; mientras que *Colletotrichum*, *Phoma*, *Phomopsis* y *Xylaria* sólo en pseudobulbo; y en ambos órganos, *Hypoxylon* y *Preussia minima*.
- La presente investigación es una contribución al conocimiento de los endófitos en orquídeas epífitas, ya que la mayoría de los estudios se enfocan a orquídeas terrestres.
- De los aislamientos obtenidos en este trabajo, en tres cepas queda inconclusa su identificación, aún comparándola con los números de accesoión del GenBank, por lo que, se deberán buscar regiones adicionales dentro del genoma de hongos y bacterias, para su identificación molecular, cuando el DNA no haya amplificado con los primers universales; así como recurrir a la bioquímica y morfología para corroborar la identificación molecular.
- Reportes en otras plantas, diferentes a la familia Orchidaceae, sobre los endófitos aislados en *L. autumnalis*, les confieren características como antibacteriales, antifúngicas, así como su uso en la industria farmacéutica e industrial.
- Se debe buscar un método eficaz en la preservación de cada microorganismo aislado, para su futura reactivación e identificación.

## 8. LITERATURA CITADA.

Abello, J.F. y K. Segenet. 2006. Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 7(2):55-57.

Ángel C., C.A., M. Tsubota N., J.E. Leguizamón C., R. Cárdenas M., B. Chaves C., G. Cadena G. y A.E. Bustillo P. 2001. Enfermedades y Plagas en Cattleyas: antecedentes e investigaciones en Colombia. CENICAFÉ-COLCIENCIAS-Orquídeas Eva. Colombia, 320 pp.

Aguilar-Morales, M.A. y A.L. López-Escamilla. 2013. Germinación *in vitro* de *Laelia speciosa* (Kunth) Schltr., una herramienta para su conservación *ex situ*. In: Griselda Pulido-Flores and Scoot Monk, eds., Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas, Volumen II (Lincoln, NE: Zea Books).

Aguirre, F., P. Castillo, R. Villalobos, J. López y S. Estrada. 2005. Vasorelaxant Effect of Mexican Medicinal Plants on Isolated Rat Aorta. *Pharmaceutical Biology*. 43(6): 540-546.

Arditti, J. y R. Ernts. 1993. Micropropagation of Orchids. John Wiley and Sons., Inc. Nueva York, NY. USA. Pág. 1-25.

Ávila, D. I. y R. Salgado-Galicia. 2006. Propagación y mantenimiento *in vitro* de orquídeas mexicanas para colaborar en su conservación. *BIOLÓGICAS*, Facultad de Biología, UMSNH, México, 8:138-149.

Ávila-Díaz, I., R. Garibay-Orijel, R.E. Magaña-Lemus y K. Oyama. 2013. Molecular evidence reveals fungi associated within the epiphytic orchid *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. *Botanical Sciences*. 91(4): 523-529.

Baggi, G., L. Cavalca, P. Francia, M. Zangrossi. 2004. Chlorophenol removal from soil suspensions: effects of a specialized microbial inoculum and a degradable analogue. *Biodegradation*. 15(3):153–160.

Bargabus, R.L., N.K. Zidack J.E. Sherwood y B.J. Jacobsen. 2003. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a nonpathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 61:289–298.

Baumann, P., M.A. Clark, L. Baumann y A.H. Broadwell. 1991. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. *Microbiological Reviews*. 55: 425–436

Bayman, P. y L.L. Lebrón. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidacea). *New Phytologist*. 135: 143-149.

Bayman, P. y J.T. Otero. 2006. Microbial endophytes of orchid roots. En: B. Schulz, C.J. Boyle y T.N. Sieber. (Eds.). Springer, Berlin, Heidelberg. *Microbial Root Endophytes*. 9: 153-178.

Beltrán-Rodríguez, L.A., B. Martínez-Rivera y A. Paulo-Maya. 2012. Etnoecología de la flor de catarina- *Laelia autumnalis* (La Llave & Lex) Lindl.- (Orchidaceae) en una comunidad campesina al sur del estado de Morelos, México: conservando un recurso y preservando saberes populares. *Etnobiología*. 10(1):1-17

Bougoure, J.J. y J.D.W. Dearnaley. 2005. The fungal endophytes of *Dipodium variegatum* (Orchidaceae). *Australasian Mycologist*. 24(1):15-19.

Bougoure, J., M. Ludwig, M. Brundrett y P. Grierson. 2009. Identity and specificity of the fungi forming mycorrhizas with the rare mycoheterotrophic orchid *Rhizanthella gardneri*. *Mycological research*. 113(10): 1097-1106.

Breardmore, J. y G.F. Pegg. 1981. A technique for the establishment of mycorrhizal infection in orchid tissue grown in aseptic culture. *New Phytologist*. 87: 527-535.

Bruns, T. D., R. Vilgalys, S.M. Barns, D. Gonzalez, D.S. Hibbett, D.J. Lane, L. Simon, S. Stickell, T.M. Szaro, W.G. Weisburg y M.L. Sogin. 1992. Evolutionary relationships within the fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*. 1(3): 231-241.

Cabrera, M.G., M.R. Galmarini, y E. Flachslund. 2001. *Colletotrichum gloesporioides*, patógeno de orquídeas en el NE de Argentina. XXXIV Congreso Brasileiro y XI Congreso Latino-Americano de Fitopatología. Sao Pedro, Sp, Brasil.

Camarena, G. y R. De La Torre. 2008. Fitoplasmas: síntomas y características moleculares. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*. 14(2): 81-87.

Cameron, D.D., J.R. Leake y D.J. Read. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytologist*. 171: 405-416.

Castillo, M. 2002. Micorrización *in vitro* de *Bletia urbana* (Orchidaceae) como una estrategia para su reintroducción. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Chanway, C.P. 1996. Endophytes: they're not just fungi! *Canadian Journal of Botany*. 74: 321-322.

Charles, J. F., C. Nielson-LeRoux y A. Delecluse. 1996. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annual review of entomology*. 41(1): 451-472.

Compant, S., B. Mitter, J.G. Colli-Mull, H. Gangl y A. Sessitsch. 2011. Endophytes of grapevine flowers, berries and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts and visualization of niches of colonization. *Microbial Ecology*. 62: 188-197.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia Univ. Press. New York. 1262 p.

da Silva Araújo, F. D., L. C. de Lima Fávaro, W. L. Araujo, F. L. De Oliveira, R. Aparicio, y A.J. Marsaioli. 2012. Epicolactone—natural product isolated from the sugarcane endophytic Fungus *Epicoccum nigrum*. *European Journal of Organic Chemistry*. 27: 5225-5230.

Damon, A. , E. Aguilar-Guerrero, L. Rivera y V. Nikolaeva. 2004. Germinación *in vitro* de semillas inmaduras de tres especies de orquídeas de la Región del Soconusco, Chiapas, México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 10(2): 195-203.

Doyle, J.J., J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19:11-15.

Dressler, R. L. 2005. How many orchids species? *Selbyana*. 26: 155-158.

Dreyfuss, M.M. e I.H. Chapela. 1994. En: Gullo, V.P., Ed. *The discovery of natural products with therapeutic potential*. Butterworth-Heinemann; Boston. Pág 49-80.

Esnault, A.L., G. Masuhara y P.A. McGee. 1994. Involvement of exodermal passage cells in mycorrhizal infection of some orchids. *Mycological Research*. 98(6): 672-676.

Espitia-Reyes, P., Ma. de L. Hernández de Jedús, S.E, Estrada-Soto, V. Rodríguez-López. 2004. Evaluación biológica preliminar de los extractos de *Laelia autumnalis* (Llave & Lex) Lindl. *Revista de la Sociedad Química de México*. 48(1): 33.

Esposito-Polesi, N. P. 2011. Microorganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. *Revista Brasileira de Biociências*. 4(9): 533-541.

Feller, I.C. 1995. Effects of nutrient enrichment on growth and herbivory of dwarf red mangrove (*Rhizophora mangle*). *Ecological Monographs*. 65: 477-505.

Flores-Escobar, G., J.P. Legarra-Solano, I. Gil-Vásquez y M.T. Colinas-León. 2008. Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl. Una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14 (3): 347-353.

Gabino-Gutiérrez, R., G. Carrillo-Castañeda y L. Fucikovsky-Zak. 2004. Identification of Bacteria Associated to Necrotic Leaf Spots in Plants of *Lycaste aromatica* Lindley. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23(3): 338-344.



- Galdiano Júnior, R. F., E.A.N. Pedrinho, E. A. N., T.C.L. Castellane y E.g.M. Lemos. 2011. Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 35(3): 729-737.
- Galmarini, M. R.; M. G. Cabrera, y E. Flachslund. 2001. *Sclerotium rolfsii*, nuevo patógeno de orquídeas para la República de Argentina. XXXIV Congreso Brasileiro y XI Congreso Latino-Americano de Fitopatología. Sao Pedro, Sp, Brasil.
- Gamboa-Gaitán, M. 2006. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*. 11(supl. 1): 3-20.
- Geetha, S. and Sudheer A. Shetty. 2000. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Current Science*. Vol. 79, 6: 886-889.
- Germaine, K, E. Keogh, G. García-Cabellos, B. Borremans, D. van der Lelie, T. Barac, L. Oeyen, J. Vangronsveld, F.P. Moore, E.R.B. Moore, C.D. Campbell, D. Ryan y D.N. Dowling. 2004. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS Microbiology Ecology*. 48: 109–118.
- Godínez, S., y M. Calderón. 2008. Métodos alternativos para la preservación de hongos filamentosos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 18 (2): 31-37
- Guarro, J., J. Gené y A. Stchigel. 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 454-500.
- Guinebretière, M. H., F.L. Thompson, A. Sorokin, P. Normand, P. Dawyndt, P., M. Ehling-Schulz, B. Svensson, V. Sanchis, C. Nguyen-The, M. Heyndrickx y P. de Vos. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology*. 10: 851–865.
- Guo, B., Wang, Y., Sun, X. y Tang, K. 2008. Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 44: 136-142.
- Hágsater, E., M.A. Soto-Arenas, G. A. Salazar Cháves, R. Jiménez Machorro, M. A. López Rosas y R. L. Dressler. 2005. *Las orquídeas de México*. Instituto Chinoín, México, 304 pp.
- Halbinger, F. y M.A. Soto-Arenas. 1997. Laelias of Mexico. *Orquídea (Méx.)* 15. 160 pp.
- Hansen, B.M., T.D. Leser y N.B. Hendriksen. 2001. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiology Letters*. 202: 209-213.
- Harman, G.E., C.R. Howell, A. Viterbo, I. Chet y M. Lorito. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbiosis. *Nature Reviews Microbiology*. 2(1): 43-56

Hemtasin, C., S. Kanokmedhakul, K. Kanokmedhakul, C. Hahnvajanawong, K. Soyong, S. Prabpai y P. Kongsaree. 2011. Cytotoxic pentacyclic and tetracyclic aromatic sesquiterpenes from *Phomopsis archeri*. *Journal of natural products*. 74(4): 609-613.

Hernández, H.J.; S. O. Hernández y R. M. Mata, 2001. Regeneración de plántulas a partir de cultivo *in vitro* de mitades de protocormos de *Laelia anceps* Lindl. y *Catasetum intergerrinum* Hook. *Amaranto*. 14 (1): 3-12

Hoffman, A. M., S. G. Mayer, G. A. Strobel, W. M. Hess, G. W. Sovocool, A. H. Grange, J.K. Harper, A.M. Arif, D.M. Grant y E.G. Kelley-Swift. 2008. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species. *Phytochemistry*. 69(4): 1049-1056.

Huapeo, P.Y. 2004. Establecimiento *in vitro* y regeneración de plantas de *Laelia autumnalis* (Llave & Lex) Lindl. (Orchidaceae). Tesis de Lic., Facultad de Biología, UMSNH. 55 pp.

INAFED (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal). 2014. [<http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM21puebla/municipios/21188a.html>] consultada febrero 2014.

Isaka, M., A. Jaturapat, K. Rukseree, K. Danwisetkanjana, M. Tanticharoen y Y. Thebtaranonth. 2001. Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *Journal of natural products*. 64(8): 1015-1018.

Janda, J. M. y S. L. Abbott. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(9): 2761-2764.

Jalgaonwala, R.E. y M.T. Raghunath. 2011. A Review: Bacterial Endophytes and their bioprospecting. *Journal of Pharmacy Research*. 4(3): 795-799.

Kaliňák, M., V. Barátová, E. Gallová, Z. Ondrušová y D. Hudecová, D. 2013. Secondary metabolite production of *Epicoccum* sp. isolated from lignite. *Acta Chimica Slovaca* 6(1): 42-48.

Kaul, S., S. Gupta, M. Ahme y M.K. Dhar. 2012. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews*. 11(4): 487-505.

Kottke, I., I. Haug, S. Setaro, J. P. Suárez, M. Weiß, M. Preußing, M. Nebel y F. Oberwinkler. 2008. Guilds of mycorrhizal fungi and their relation to trees, ericads, orchids and liverworts in a neotropical mountain rain forest. *Basic and Applied Ecology*. 9(1): 13-23.

- Lal, S. y S. Tabacchioni. 2009. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview. *Indian Journal of Microbiology*. 49(1): 2-10.
- Lange, A. y F.M. Moreira. 2002. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*. 26: 529-533.
- Lee- Espinosa, H. E., A. Laguna-Cerda, J. Murguía-González, P. Elorza-Martínez, L. Iglesias-Andreu, B. García-Rosas, F. A. Barredo-Pool y N. Santana-Buzzy. 2007. Regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista UDO Agrícola* 7(1):58-67.
- Lee-Espinosa, H., A. Laguna-Cerda, J. Murguía-González, L. Iglesias-Andreu, B. García-Rosas, M. E. Galindo T., I. Landero T., T. Ramírez H., F.A. Barredo-Pool y N. Santana-Buzzy. 2008. Rescate y multiplicación de las orquídeas *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* y *Vanilla planifolia* Andrews por métodos biotecnológicos. Plática doctoral en la XXI Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria Veracruz y I del Trópico Mexicano.
- Lu, H., W. X. Zou, J. C. Meng, J. Hu y R. X. Tan. 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science*. 151(1):67-73.
- Luyando-Moreno, L. S. ; M. E. Pedraza-Santos; J. López-Medina; J. L. Morales-García; G. M. Carrillo-Castañeda; R. Lindig-Cisneros. 2011. “Adaptación de *Laelia autumnalis* (Llave y Lex.) Lindl. a un bosque de encino en diferentes forofitos”. Pág. 87. In: Luna-Esquível, G., Rodríguez-Rodríguez, B. B., Juárez-López, P., Santillán-Ortega, C., Flores-Canales, R., Isiordia-Aquino, N., Cambero-Campos, O. J., Robles-Bermúdez, A. (compiladores). Memoria de resúmenes del XIII Congreso Nacional y VI Internacional de Horticultura Ornamental. 23 al 28 de Octubre del 2011. Nuevo Vallarta, Nayarit, México.
- Marchisio, V. F., G. Berta, A. Fontana y F. Mannina. 1985. Endophytes of wild orchids native to Italy: their morphology, caryology, ultrastructure and cytochemical characterization. *New phytologist*. 100(4):623-641.
- Marler, M., D. Pedersen, O.T. Mitchell y R.M. Callaway. 1999. A polymerase chain reaction method for detecting dwarf mistletoe infection in Douglas fir and western larch. *Canadian Journal of Forest Research*. 29:1317-1321.
- Mata-Rosas, M., R. J. Baltazar-García, P. Moon, P. Hietz, V. E. Luna-Monterrojo. 2010. *In vitro* regeneration of *Lycaste aromatica* (Graham ex Hook) Lindl. (Orchidaceae) from pseudobulb sections. *Plant Biotechnology Reports*. 4(2): 157-163
- Maushara, G. y K. Katsuya. 1994. In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae). *New Phytologist*. 127: 711-718.

Melnick, R.L., N.K. Zidack, B.A. Bailey, S.N. Maximova, M. Gultinan, y P.A. Backman. 2008. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control*. 46: 46-56.

Menchaca García, R. A., M.Á. Lozano Rodríguez y L. Sánchez Morales. 2012. Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México. *Revista Mexicana de Ciencia Forestales*. 3(13):9-16.

Molina-Paniagua, M. E., y S. Zamudio-Ruiz. 2010. Flora del Bajío y de regiones adyacentes: Estudio florístico del pedregal de Arocutin, en la cuenca del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Fascículo complementario XXV*. Instituto de Ecología AC, Centro Regional del Bajío.

Morales-García, Y. E., E. Duque, O. Rodríguez-Andrade, J. De la Torre, R.D. Martínez-Contreras, R. Pérez-y-Terrón y J. Muñoz-Rojas. 2010. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. *BioTecnología*. 14(2): 11-29

Ordóñez, N. F., J.T Otero Y M.C. Díez. 2012. Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta Agronómica*. 61(3): 283-291.

Ortega-Larrocea, M.P., E. Sandoval, C. Ramos y V.M. Chávez-áVila. 2005. Histological development of *Bletia urbana*: an endangered terrestrial orchid from México. *Selbyana*. 26: 309.

Ortega-Larrocea, M.P. y M. Rangel-Villafranco. 2007. Fungus-assisted reintroduction and long-term survival of two mexican terrestrial orchids in the natural hábitat. *Lankesteriana*. 7(1-2):317-321.

Ortega-Larrocea, M.P., A. Martínez P. y V.M. Chávez A. 2009. Conservación y propagación de orquídeas. En: A. Lot y Z. Cano (eds.). Biodiversidad del ecosistema del pedregal de San Ángel. UNAM.

Ovando, I., A. Damon, R. Bello, D. Ambrosio, V. Albores, L. Adriano y M. Salvador. 2005. Isolation of endophytic fungi and their mycorrhizal potential for the tropical epiphytic orchids *Cattleya skinneri*, *C. aurantiaca* and *Brassavola nodosa*. *Asian Journal Plant. Sciences*. 4 (3): 309-315.

Panza, V. H. 2012. Herramientas moleculares utilizadas en estudios filogenéticos. *Elementalwatson "la" revista*. 3(8): 4

Pérez, C.A., J. Rojas S. y H. valen. 2009. Biología y Perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*. 1(2): 286-301.

Petrini, O. 1991. Fungal Endophytes of the tree leaves. In : Andrews J., Hirano S.S, eds. *Microbial Ecology of leaves*. New York: Springer Verlag, pág. 179-197.

Ramírez, J. 1996. Orquídeas de México. CONABIO. *Biodiversitas*. 5: 1-5.

- Ramos-Zambrano, E., T. Jiménez Salgado y A. Tapia Hernández. 2007. Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (Orchidaceae). *Lankesteriana*. 7(1-2): 322-325.
- Raza, W., W. Yang y Q.R. Shen. 2008. *Paenibacillus polymyxa*: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment. *Journal of Plant Pathology*. 90 (3): 419-430.
- Redman, R. S., D. D. Dunigan y R.J. Rodríguez. 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist*. 151(3): 705-716.
- Reyna, J.V. y P.D. Dávila. 1995. Clasificación de los géneros de las gramíneas (Poaceae) mexicanas. *Acta Botánica Mexicana*. 33: 37-50.
- Rico, M., C. V. Piattoni, C. González, R. Monela, M.G. Latorre y M.C. Lurá. 2004. Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. *FABICIB*. 8(1): 163-172.
- Rivas, M. 2001. Conservación *in situ* de los recursos fitogenéticos. In: Berreta, A. y M. Rivas, Eds., PROCISUR. Montevideo, Uruguay. Pág. 65-79.
- Rosenblueth, M. y E. Martínez-Romero. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 19 (8): 827-837.
- Ruíz, B.C., C.A. Laguna, A.L.G. Iglesias, A. Damon, H.T.N.J. Marín, R.H.S. Azpíroz y M.J.L. Moreno. 2008. *In vitro* germination of *Encyclia adenocaula* (La Llave & Lex.) Schltr. (Orchidaceae). *Phyton*. 77:203-215.
- Rukachaisirikul, V., U. Sommart, S. Phongpaichit, J. Sakayaroj y K. Kirtikara. 2008. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PU-D15. *Phytochemistry*. 69(3): 783-787.
- Sánchez-Fernández, R.E., B.L. Sánchez-Ortiz, Y.K.M. Sandoval-Espinosa, A. Ulloa-Benítez, B. Armendáriz-Guillén, M.C. García-Méndez y M.L. Macías-Rubalcava. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 16(2):132-146.
- San Martín, F., Y.M. Ju y J.D. Rogers. 1999. Algunas especies de *Hypoxylon* (Pyrenomycetes, Xylariaceae) de México. *Acta Botánica Mexicana*. 47: 31-53.
- Santiago, C., C. Fitchett, M. H. Munro, J. Jalil y J. Santhanam. 2012. Cytotoxic and antifungal activities of 5-Hydroxyramulosin, a compound produced by an endophytic fungus isolated from *Cinnamomum mollissimum*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. doi: 10.1155/2012/689310

Santos, H.L., E. Aguirre L., J.E. Campos C. y M. Martínez G. 2006. Conservación *in situ* de la flora mexicana. La orquídea *Laelia albida*, en una Reserva de la Biósfera. *Ciencia y Desarrollo* en internet. <http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/Revista/Articulos/Completos/pdf/Orquidea.pdf>

Schmitt, I, A. Crespo, P.K Divakar, J.D. Fankhauser, E. Herman-Sackett, K. Kalb, M.P. Nelsen, N.A. Nelson, E. Rivas Plata, A.D. Shimp, T. Widhelm y H.T. Lumbsch. 2009. New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. *Persoonia*. 23: 35–40.

Schulz, B. y C. Boyle. 2006. What are endophytes?. Microbial root endophytes. Springer Berlin Heidelberg, p. 1-13.

SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, 30 de Diciembre de 2010.

Sharma, J., M.L. Ishida y V. L. Yadon. 2007. Mycorrhizal diversity of an endemic terrestrial orchid. *Lankesteriana* 7 (1-2): 215-218.

Sharma, S., S. Rustgi, H. S. Balyan y P. K. Gupta. 2002. Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences of ribosomal DNA of wild barley and their comparison with ITS sequences in common wheat. *Barley Genetics Newsletter*. 32: 38-45.

Singer, R.B. 2009. Morfología floral y polinización de orquídeas: el segundo libro de Charles Darwin. *Acta Biológica Colombiana*. 14(S): 337-350

Smith, S. E. 1966. Physiology and ecology of orchid mycorrhizal fungi with reference to seedling nutrition. Department of Botany, Cambridge University. Pág. 488-499.

Soto-Arenas, M. A., E. Hágsater, R. Jiménez, G. A. Salazar, R. Solano, R. Flores e I. Contreras. 2007. Las orquídeas de México: catálogo digital. Instituto Chinoín, A.C., México, D.F.

Suárez-Quijada, I., M. Hernández-Altamirano, V.M. Chávez-Ávila, E. Sandoval-Zapotitla y A. Martínez-Palacios. 2007. Propagación *in vitro* y aclimatización de *Euchile mariae* (Ames) Withner (*Orchidaceae*). *Lankesteriana*. 7(1-2):388-3930

Sun, X., Q. Ding, K. D. Hyde y L. D. Guo. 2012. Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest. *Fungal Ecology*. 5(5): 624-632.

Stark, C., W. Babik y W. Durka. 2009. Fungi from the roots of the common terrestrial orchid *Gymnadenia conopsea*. *Mycological Research*. 113: 952-959.

- Strobel, G., B. Daisy, U. Castillo y J. Harper. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural products*. 67(2): 257-268.
- Tamay de Dios, L., C. Ibarra y C. Velasquillo. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*. 2(2):70-78.
- Tao, G., Z.Y. Liu, K.D. Hyde, X.Z. Lui y Z.N. Yu. 2008. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). *Fungal Diversity*. 33(1): 101-122.
- Tapia-Tussell, R., J.A. Magaña G., A. Cortés V., I. Higuera C. y D. Pérez-Brito. 2009. Protocolos para la detección molecular de fitopatógenos y organismos genéticamente modificados. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. pp 92
- Taylor, D. L. y M. McCormick. 2008. Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist*. 177:1020-1033
- Téllez, V. M. A, C.A., Hernández y C.A. Hernández. 2007. *Orquídeas terrestres de la Sierra las Navajas, Hidalgo, México*. En: López E.A.L. y Pulido-Flores G. Eds. Simposio de Biodiversidad y Conservación de algunos recursos florísticos en el estado de Hidalgo. UAEH. p 27
- Tomscheck, A. R., G. A. Strobel, E. Booth, B. Geary, D. Spakowicz, B. Knighton, C. Floerchinger, J. Sears, O. Liarzi y D. Ezra. 2010. *Hypoxylon* sp., an endophyte of *Persea indica*, producing 1, 8-cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. *Microbial Ecology*. 60(4): 903-914.
- Tsavkelova, E. A., T.A. Cherdyntseva, E.S. Lobakova, G.L. Kolomeitseva y A.I. Netrusov. 2001. Microbiota of the orchid rhizoplane. *Microbiology*,70(4): 492-497.
- Tsavkelova, E.A., T.A. Cherdyntseva y A.I. Netrusov. 2004. Bacteria associated with the roots of epiphytic orchids. *Microbiology*. 73(6):825-831
- Tsavkelova, E. A., T.A. Cherdyntseva, S.Y. Klimova, A.I. Shestakov, S.G. Botina y A.I. Netrusov. 2007. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Archives of Microbiology*, 188(6): 655-664.
- Tsuchiya, K., T. Akhter, T. Takasaki, S. Tanaka y S. Wakimoto. 1986. Bacterial Brown Spot Disease of *Cymbidium* spp. Caused by *Pseudomonas cepacia*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 52: 825-834

Vergara-Galicia, J., R. Ortiz-Andrade, P. castillo-España, M. Ibarra-Barajas, I. Gallardo-Ortiz, R. Villalobos-Molina y S. Estrada-Soto. 2008. Antihypertensive and vasorelaxant activities of *Laelia autumnalis* are mainly through calcium channel blockade. *Vascular Pharmacology*. 49: 26-31

Wagenaar, M. M., J. Corwin, G. Strobel y J. Clardy. 2000. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinocladiella*. *Journal of Natural Products*. 63(12): 1692-1695.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., New York. Pág . 315-322.

Wilkinson, K.G., K. Sivasithampam, K.W. Dixon, P.C. Fahy y J.K. Bradley. 1994. Identification and characterization of bacteria associated with western Australian orchids. *Soil Biology and Biochemistry*. 26 (1): 137-142.

Yandry, R. R. J., E. D. Fernandez, M. Rodolfi y T. Solveig. 2006. Actividad antagónica de hongos endófitos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. *Boletín Micológico*. 21: 49-53.

Yang, J.I., A. Loffredo, J. Borneman y J. Becker. 2012. Biocontrol efficacy among strains of *Pochonia chlamydosporia* obtained from a root-knot nematode suppressive soil. *Journal of Nematology*. 44 (1): 67-71

Yuan, Z. L., Y.C. Chen y Y. Yang. 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.

Zaferanloo, B., S. Bhattacharjee, M. M Ghorbani, P. J. Mahon y E.A. Palombo. 2014. Amylase production by *Preussia minima*, a fungus of endophytic origin: optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS. *BMC Microbiology*. 14(1): 55.

Zambrano, E. R., T.J. Salgado Y A.T. Hernández. 2007. Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (Orchidaceae). *Lankesteriana*. 7(1-2): 322-325.

Zenteno, R., R. Chávez, D. Portugal, A. Páez, R. Lascurain y E. Zenteno. 1995. Purification of a specific lectin from the orchid *Laelia autumnalis*. *Phytochemistry*. 40(3): 651-655.

Zou, W. X., J. C. Meng, H. Lu, G. X. Chen, G. X. Shi, T. Y. Zhang y R.X. Tan. 2000. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of Natural Products*. 63(11): 152



## 9. ANEXOS

### 9.1. Secuencias de bacterias

>6b *Bacillus weihenstephanensis*

CGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATAGTTCGAAATTGAAAGGCGGCT  
TCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA  
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC  
CGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTT  
GAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  
GCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG

>9b *Bacillus* sp.

ACTCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATAGTTCGAAATTGAAAGGC  
GGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCA  
CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC  
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCA  
ACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCT  
AGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC  
AGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGG  
TGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAG  
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGA  
GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCGTTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGCGAAAGCGTGGG  
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAG  
GTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGC

>10b *Lysinibacillus sphaericus*

GCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACT  
GAGAACGACTTTATCGGATTAGCTCCCTCTCGCGAGTTGGCAACCGTTTGTATCGTCCATTGTAG  
CACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTT  
GTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTC  
GTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA

>11b *Bacillus weihenstephanensis*

CGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATAGTTCGAAATTGAAAGGCGGCT  
TCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA  
GGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC  
CGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTT  
GAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  
GCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAG

>12b *Bacillus* sp.

CGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATACGTTCTTTTCTCGCATGAGGGAAGATGGAAAGACGGT  
TTACGCTGTCACTTATAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCA  
AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA  
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG  
CCGCGTGAACGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGTTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCAG  
AGTAACTGCTGGTACCTTGACGGTAGGGGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC  
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAG

>13b *Paenibacillus* sp.

GAAACGGTAGCTAATACCGGATAATTTCTTTTTTCTCCTGAGAGAAGAATGAAAGACGGAGCAA  
TCTGTCACTGAGGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGC  
GACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT  
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGC  
GTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCCGGTAGAGTAA  
CTGTTACCGGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGCG  
TAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTATTT  
AAGTCTGGTGTTTAAACCTTGGGCTCAACCTGAGGTGCGACTGGAACTGGGTGGCTTGAGTAC  
AGAAGAGGAAAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAG  
TGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG  
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA

>21b *Bacillus weihenstephanensis*

ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATAGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCT  
TCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC  
GACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGT  
GATGAAGGCTTTCCGGTTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCA  
CCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTG  
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC  
CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAAT  
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAA

>2b *Bacillus weihenstephanensis*

CGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATAGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGT  
CACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGA  
TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTAC  
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAG  
TGATGAAGGCTTTCCGGTTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGC  
TGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGCGGTAAT  
ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGT  
CTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAG  
AAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTG  
GCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA  
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA

>5b *Paenibacillus polymyxa*

ACGGTAGCTAATACCCGATACATCCTTTTCCTGCATGGGAGAGGGAGGAAAGACGGAGCAATC  
TGTCACCTTGTGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGA  
CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC  
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGT  
GAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCTTGTAGAGTAACT  
GCTACAAGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
ATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTCTTTAA  
GTCTGGTGTTAATCCCGAGGCTCAACTTCGGGTCGCACTGGAAACTGGGGAGCTTGAGTGCAG  
AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG  
GCG

>14b *Achromobacter* sp.

GCGTAGCTAATACCCGATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCCTATT  
GGAGCGGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTA  
GCTGGTTTGGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGTGCGATGA  
AGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGGCAGGAAAGAAACGTCATGGGTTAATACCCCGTAAA  
CTGACGGTACCTGCAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  
GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTTCGGAAAGAAAGATG  
TGAAATCCCAGAGCTTAACTTTGGAAGTGCATTTTAACTACCGGGCTAGAGTGTGTCAGAGGG  
AGGTGGAATCCCGCGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGG  
CAGCCTCCTGGGATAACACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA  
CCCTGGTAGTCCACGCCCTA

>19b *Curtobacterium* sp.

ACGTCTAATACTGGATATGACCACCGATCGCATGGTCTGGTGGTGGAAAGATTTTTTGGTTGGG  
GATGGACTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGAGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGC  
CGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA  
GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACG  
GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAA  
GCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGAAGCGTTGTCCGGAATTA  
TTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCTGTGAAATCCCGAGGCTCAACTTCG  
GGCTTGCAGTG

>20b *Bacillus weithenstephanensis*

ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATAGTTTCGAAATTGAAAGGC  
GGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGGAGTAACGGCTCA  
CCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC  
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCA  
ACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCT  
AGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC  
AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGG  
TGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAG  
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGA  
GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTGCAGTACTGAGGCGCGAAAGCGTGGG  
GAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTA

>17b *Bacillus weithenstephanensis*

GAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATAGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTG  
TCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATG  
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG  
CTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACG  
GTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT  
TATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCT  
CAACCGTGG

>18b *Bacillus mycoides*

GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT  
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA  
ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTT  
GTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGC  
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAG  
CGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAA  
CTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATG  
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGA  
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA

## 9.2. Secuencias de hongos

>Contig-18ITS *Sordaria* sp.

TCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACAGAGTTGCAAAACTCCCACA  
AACCATCGCGAATCTTACCTGTACGGTTGCCTCGGCGCTGGCGGTCCGGAAGGCCCTCGGGCCC  
CCGAACCCCTCGGGTCTCCCGCTCGCGGGAGGCTGCCCGCCGGAGTGCCGAAACCAAACCTTTGA  
TATTTTATGTCTCTCTGAGTAACTTTTAAATAAGTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT  
CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT  
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGTATTCTGGCGAGCATGCCTGTTTCGAGCGTC  
ATTTCAACCATCAAGCTTTGCTTGCCTGGGGATCCGCGGCTGCCCGCGGTCCCTCAAAAACAG  
TGCGGGCTCGCTAGTCACACCGAGCGTAGTAACTCTACATCGCTATGGTCGTGCGGCGGGTTC  
TTGCCGTA

>Contig-31ITS *Hypohylon begae*

GTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTCTATAACTCCCACCCT  
ATGTGAATATACTACAGTTGCCTCGGCGAGGCTTCCGGGCGTCGCCGGCGGACCACCAAACCTCT  
GTTTTGTCCACTGTATCTCTGAATTAGTAACAAAATACGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTT  
GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT  
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCATTAGTATTCTGATGGGCATGCCTATTCGAGC  
GTCATTGCAACCCTTACGCCCTGTAGCGTAGTGTGGGAATCTACCGACAGGTAGTTCCTCAA  
TCGATTGGCGGCGTTAGTGCATACTCTAAGCGTAGTAATACCATTCTCGCTTCGGCAGTAGTGCT  
GACGGCTGGCCACTAAACCCCTATACTTCTAGTGGTTGACCTCGGATTAG

>Contig-32ITS *Trichoderma viride*

CGAGACCGCCACTGTATTTCCGGGGCCGGGATCCCGTCTTAGGGGTTCCCGATCCCCAACGCCGG  
ACCCCCGGAGGGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGC  
GGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCA  
TTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTT  
GAATTTTTGCTCAGAGCTGTAAGAAATAACGTCCGCGAGGGGACTACAGAAAGAGTTTTGGTTGG  
TCCCTCCGGCGGGCGCCTGGTTCCGGGGCTGCGACGCACCCGGGGCGTGACCCCGCCGAGGCA  
ACAGTTTTGGTATGGTTACATTGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTT  
CACCAACGGAGACCTTGTTAC

>Contig-33ITS *Uncultured Trichoderma*

GTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATG  
TGAACCATAACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTCACGCCCGGGTGCCTCGCAGCCCCGGAACAGG  
CGCCCGCCGGAGGGACCAACCAAACCTTTCTGTAGTCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTG  
AGCAAAAATTCAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC  
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG  
CCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGTC  
CGGCGTTGGGGATCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCG  
CAGCCTCTCATGCGCAGTAGTTGCACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGCGCTCCACGTCCGTAATAAC  
ACCAAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCA

>Contig-34ITS *Trichoderma* sp.

CGAGACCGCCACTGTATTTCTGGGGCCGGGATCCCGTCTTAGGGGTTCCCGATCCCCAACGCCGGACC  
CCCGGAGGGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGGCGC  
AATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGT  
TCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTGAATTTTTGCTCAGAG  
CTGTAAGAAATAACGTCCGCGAGGGGACTACAGAAAGAGTTTGGTTGGTCCCTCCGGCGGGGCGCCTG  
GTTCCGGGGCTGCGACGCACCCGGGGCGTGACCCCGCCGAGGCAACAGTTTGGTATGGTTACATT  
GGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTACCAACGGAGACCTTGTT

>Contig-41ITS *Epicoccum* sp.

TTTTAAGGCGAGTCTACACGCAGAGGGCGAGACAAAACACCCAACACCAAGCAGAGCTTGAAGG  
TACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG  
ATTCGATGATTACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAACCTATTATGTTTTTTCAGACGCTGATTGCA  
ACTGCAAAGGGTTTGAATGTTGTCCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGAAGGTACTC  
AAAAGACATGGGTAAGAGGTAGCAGACCGAAGTCTACAAACTCTAGGTAATGATCCTTCCGCA  
GGTTCACCTACGAAACCTTGTT

>Contig-42ITS *Hongo no cultivable*

GTTTTAAGGCGAGTCTACACGCGGAGGGCGAGACAAAACACCCAACACCAAGCAGAGCTTGAAGG  
TACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG  
ATTCGATGATTACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAACCTATTATGTTTTTTCAGACGCTGATTGCA  
ACTGCAAAGGGTTTGAATGTTGTCCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGAAGGTACTC  
AAAAGACATGGGTAAGAGGTAGCAGACCGAAGTCTACAAACTCTAGGTAATGATCCTTCCGCA  
GGTTCACCTACGAAACCTTGTT

>Contig-45ITS *Presussia* sp.

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTTGGGCTTCGGCCCATTTCGA  
GATAATACCCTTGCCTTTTTGAGTACCTTTTCGTTTCCTCGGCAGGCTCGCCTGCCAACGGGGAC  
CCTTCAAACGCCTTGTAAACCTGTAATTGTCTGATATAACAAGCAAAAATTAACCTTTCAA  
CAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATT  
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCTTAGGGCAT  
GCCTGTTTCGAGCGTCATTTAAACCTTCAAGCTCAGCTTGGTGTATGGGTGACTGTCCCCCCTTCG  
CGGGGGGACTCGCCTCAAAAACATTGGCGGCCGGTACATTGGCTTCGAGCGCAGCAGAAACGC  
GGTCTCGAGCCCGGTGGATCGTCTCCATAAGCTCCTTCTTTATTTTGACCTCGGATCAG

>Contig-46ITS *Hypocrea* sp.

AGACCGCCACTGTATTTTCGAGACGGCCACCCGCTAAGGGAGGGCCGATCCCCAACGCCGACC  
CCCGGAGGGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGG  
GCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATT  
TCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTCG  
AAACGCCTACGAGAGGCGCCGAGAAGGCTCAGATTATAAAAAACCCGCGAGGGGGTATACAAA  
AAGAGTTTTGGTTGGTCTCCGGCGGGCGCCTTGGTCCGGGGCTGCGACGCACCCGGGGCAGAG  
ATCCCGCCGAGGCAACAGTTTGGTAACGTTACATTGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATG  
ATCCCTCCGCTGGTTACCAACGGAGACCTTGTT

>Contig-47ITS *Hypocrea* sp.

GCCACTGTATTTTCGGAGACGGCCACCCGCTAAGGGAGGGCCGATCCCCAACGCCGACCCCCCG  
GAGGGGTTTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCA  
ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCT  
GCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTTTCGAAACG  
CCTACGAGAGGGCGCGGAGAAGGCTCAGATTATAAAAAACCCGCGAGGGGGTATACAAAAAGA  
GTTTTGGTTGGTCCTCCGGCGGGCGCCTTGGTCCGGGGCTGCGACGCACCCGGGGCAGAGATCC  
CGCCGAGGCAACAGTTTGGTAACGTTACATTGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCC  
CTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTAC

>Contig-48ITS *Hypocrea* sp.

GTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCC  
AATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGATCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGG  
ACCAAGGCGCCCCGGGAGGACCAACCAAAACTCTTTTTGTATACCCCTCGCGGGTTTTTTAT  
AATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAATCAAAACTTTCAACAACGG  
ATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA  
TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGT  
CCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCCCTTA  
GCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTG

>Contig-22ITS *Hypohylon begae*

GTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTCTATAACTCCTACCCT  
ATGTGAATATACTACAGTTGCCTCGGCGAGGCTTCCGGGCGTCGCCGGCGGACCACCAAACCTCT  
GTTTTGTCCACTGTATCTCTGAATTAGTAACAAAATACGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTT  
GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT  
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTGATGGGCATGCCTATTCGAGC  
GTCATTTCAACCCTTACGCCCTGCAGCGTAGTGTGGGAATCTACCGACAGGTAGTTCCTCAAAT  
CGATTGGCGGCGTTAGTGCATACTCTAAGCGTAGTAATACCATTCTCGCTTCGGCAGTAGTGCT  
GACGGCTGGCCACTAAACCCCTATACTTCTAGTGGTTGACCTCGGATTAGGTAGGAATACCCGC  
TGAACCTAAGCATATCA

>Contig-36ITS *Xylaria* sp.

CTCCGCCACTCAATTTAGGGAGCTACAGCCAGAGCCGTAGGCCCCAACGCTAAGCAACAGAGGCTT  
AAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCACTAGAATACTAATGGGCGCAATGTGCGTTCAAAG  
ATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCA  
GAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATAATTTCTTATTTAGGTTTCAGAATAACATAATAACAGAA  
TTTAAACAGGCCACCGGCAGGCGGGGCCATCCCGTGCCTGGTGACACGGTATAACACAACCTGCCGAG  
GCAACAACAGTGGTAAAGTTCACATGGGTTAG

>Contig-38ITS **Hongo endófito no cultivable**

TCCGCCACTATATTTGAGGAATTACGTCTCCGTAAACTCCCAACGTCAAGCAAATAGGGCTTGGGGGTT  
GAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCTAACAGAATACTATTAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGAT  
GATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAA  
GAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTTATTTGTATAATAAACTCAGAGATACAGGTGCAAAAACAGAGTTT  
AGGGGTCTTTCGGCAGGCCTGTTGGCGCGCCGCGGGGCGGGCCGCTCCCGCTACAGGGTAGCTAC  
TCCAGGGTAGCTACCCACGCGGGGGGTGGGCGATCCAGCCGCGCAGCACGGCCTGCCGAGGCAAC  
AGTAGGTATGTTACATGGGTTTGGAGTTTGTAAATTAACCTCGCTAATGATCCCTCCGCTGGTTACCAA  
CGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCC

>Contig-39ITS **Sordariomycetes sp.**

CTATATTTGAGGAATTACGTCTCCGTAAACTCCCAACGTCAAGCAAATAGGGCTTGGGGGTTGAAATGA  
CGCTCGAACAGGCATGCCTAACAGAATACTATTAGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACT  
GAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCC  
GTTGTTGAAAGTTTTAACTTATTTGTATAATAAACTCAGAGATACAGGTGCAAAAACAGAGTTTGGGGTCT  
CTTCGGCAGGCCTGTTGGCGCGCCGCGGGGCGGGCCGCTCCCGCTACAGGGTAGCTACTCCAGGGT  
AGTACCCACGCGGGGGGTGGGCGATCCAGCCGCGCAGCACG

>Contig-40ITS **Phoma sp.**

GTTTTGAGGCGAGTCTGCGCGCAGAGGCGAGACAAACACCCAACCAAGCAGAGCTTGAAGGTACA  
AATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGA  
TTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGA  
GATCCGTTGTTGAAAGTTGTAACCTATTAAGTTTTTTCAGACGCTGATTGCAACTGCAAATGGTTTAAATT  
GTCCAATCGGCGGGCGGACCCGCCGAGGAAACGAAGGTAATCAAAAGACATGGGTAAGAGATAGCA  
GGCAAAGCCTACAACCTTAGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTT

>Contig-55ITS **Preussia sp.**

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGTTGGGCTTCGGCCCATTTCGAGATA  
ATACCCCTGCTTTTTGAGTACCTTTTCGTTTCTCGGCAGGCTCGCCTGCCAACGGGGACCCCTTCAA  
ACGCCTTGAATACCTGTAATTGTCTGATATAACAAGCAAAAATTAACCTTCAACAACGGATCTCTTG  
GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT  
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCTTAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTAAAC  
CTTCAAGCTCAGCTTGGTGATGGGTGACTGTCCCCCTTCGCGGGGGGACTCGCCTCAAAAACATT  
GGCGGCCGGTACATTGGCTTCGAGCGCAGCAGAAACGCGGTCTCGAGCCCGGTGGATCGTCTCCCA  
TAAGCTCCTTTATTTTACCTCGG

>Contig-56ITS **Colletotrichum sp.**

CACTACCTTTGAGGGCTACGTTCGACCGTAGAGCCCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATG  
ACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATT  
ACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGAT  
CCGTTGTTAAAAGTTTTGATTATTTGCTTATGCCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAAATAGCGTTTGGTT  
ATCTCCGGCGGGCGCCGGGCCCCGCCCCACAGGGGGTCCGGTCCCGGCCGGGAGGCGTCTTTTT  
CAGGGGACGGCCTACCCGCCGAAGCAACAGTTGTAGGTATGTTCAAAAAGGGTTATAGAGCGGTAAC  
TCAGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTAC



>Contig-58ITS *Hypoxyylon begae*

AGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTCTATAACTCCCACCCT  
ATGTGAATATACTACAGTTGCCTCGGCGAGGCTTCCGGGCGTCGCCGGCGGACCACCAAACCTGTGTT  
TGTCACAGTATCTCTGAATTAGTAAACAAATACGTTAAAACTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC  
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT  
TGAACGCACATTGCGCCCATTAGTATTCTGATGGGCATGCCTATTGAGCGTCATTTCAACCCCTACGC  
CCTGCAGCGTAGTGTGGGAATCTACCGACAGGTAGTTCTCAAATCGATTGGCGGGCGTTAGTGCATA  
CTCTAAGCGTAGTAATACCATTCTCGCTTCGGCAGTAGTGCTGACGGCTGGCCACTAAACCCCCTATA  
CT

>Contig-59ITS *Phomopsis* sp.

GTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTGCTGGAACCGCGCCCCAGGCGCACCCA  
GATACCCTTTGTGAACCTTATACCTTTACTGTTGCCTCGGCGCATAGCTGGCCCCCTCGGGGGCCCCC  
GGAGACGGGGAGCAGGCACGCCGGCGGCCAAGTTAACTCTTGTITTTACACTGAACTCTGAGTATTC  
AAACATAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA  
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCT  
GGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCCTGGCTTGGTGTATGGGGCA  
CCGCTGTAAAAGGGCGGGCCCTGAAATTCAGTGGCGAGCTCGCCAGGACCCCCGAGCGCAGTAGTT  
AAACCCCTCGCTTTGGA

>Contig-60ITS *Colletotrichum* sp.

ACTACCTTTGAGGGCCTACGTCGACCGTAGAGCCCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGA  
CGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCA  
CTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATC  
CGTTGTTAAAAGTTTTGATTATTTGCTTATGCCACTCAGAAGAAACGTGTTAAAATAGCGTTTGGTTAT  
CCTCCGGCGGGCGCCGGGCCCGGCCACAGGGGGTCCGGTCCCGGCCGGGAGGCGTCCTTTTCA  
GGGGACGGCCTACCCGCCGAAGCAACAGTTGTAGGTATGTTCAAAAGGGTTATAGAGCGGTAATC  
AGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTAC

>Contig-62ITS *Colletotrichum* sp.

GTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTACCGCTCTATAACCCTTTGT  
GAACATACTACAAGTGTGCTTCGGCGGGTAGGCGTCCCCTGAAAAGGACGCCTCCCGGCCGGGA  
CCGGACCCCTGTGGGGCCGGGCCCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACGCTATTTTAAACGACGT  
TTCTTCTGAGTGGCATAAGCAAAATAATCAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA  
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA  
CATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTT  
GGTGTGGGGCTCTACGGTCGACGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCT

>Contig-63ITS *Colletotrichum* sp.

CGCCACTACCTTTGAGGGCCTACGTCGACCGTAGAGCCCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAA  
ATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGA  
TTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGA  
GATCCGTTGTTAAAAGTTTTGATTATTTGCTTATGCCACTCAGAAGAAACGTGTTAAAATAGCGTTG  
GTTATCCTCCGGCGGGCGCCGGGCCCGGCCACAGGGGGTCCGGTCCCGGCCGGGAGGCGTCTCT  
TTTACGGGGACGGCCTACCCGCCGAAGCAACAGTTGTAGGTATGTTCAAAAGGGTTATAGAGCGGTA  
ACTCAGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTA

### **9.3. Medios de cultivo para bacterias**

#### **MEDIO B DE KING (BK)**

1L

Agua	1 000 ml
Proteasa peptona	20g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O	1.5g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1.5g
Agar	15 g
Glicerol	15 ml

#### **CALDO NUTRITIVO**

1L

Agua	1000 ml
Peptona	5g
Extracto de carne	3g
NaCl	5g

Para ambos casos, adicionar al agua cada reactivo hasta que se haya disuelto el anterior. Esterilizar a 120 °C, durante 25 min.

#### 9.4. Características generales de las bacterias endófitas en *L. autumnalis*

<i>Especie</i>	<i>Características</i>
<i>Bacillus</i> sp.	Bacilos Gram+; forman endosporas, poseen cápsula polisacarídica o polipéptídica; aerobios o anaerobios facultativos; productores de enzimas hidrolíticas; se les encuentra en suelo, agua y aire; degradan la materia orgánica en condiciones aerobias.
<i>Paenibacillus polymyxa</i> Prazmowski	Bacilos Gram +;móviles, presentan flagelos peritricos; esporas elipsoidales, terminales o subterminales,cuya superficie es estriada; esporangios abultados; aerobias o anaerobias facultativas; la multiplicación se da principalmente en plantas en descomposición, produce antibióticos (polimixina). Asociada con la rizósfera, provee protección a la planta y ayuda en la síntesis de reguladores de crecimiento. Muchas cepas fijan nitrógeno atmosférico en condiciones anaeróbicas.
<i>Bacillus weihenstephanensis</i> Lechner et al., 1998	Bacilos Gram +; móviles; esporas paracentrales, subterminales, elipsoidales o cilíndricas;anaerobias facultativas; aisladas de leche pasteurizada;crecen en presencia de lisozimas.
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> Meyer y Neide	Gram +;móviles, abundantes flagelos peritricos o por un solo flagelo polar; esporas esféricas, subterminales o terminales;colonias opacas, no pigmentadas,lisas, frecuentemente brillantes, se les encuentra en el suelo; aerobias;se requiere biotina y tiamina para su crecimiento.
<i>Acromobacter</i> sp.	Bacilos Gram - ; móviles, poseen 20 flagelos peritricos; estrictamente aerobios, se les encuentra en el agua y el suelo.
<i>Curtobacterium</i> sp.	Gram +; habitan el suelo
<i>Bacillus mycoides</i> Flügge	Bacilos Gram +; no móviles; esporas elipsoidales,centrales, paracentrales o subterminales, no presentan cápsula y se arreglan en cadenas.las colonias son blancas a crema, opacas y se caracterizan por formar rizoides; anaerobias facultativas.

## 9.5. Características generales de los hongos endófitos identificados en *L. autumnalis*.

<b>División</b>	<b>Ascomycota</b>
<b>Subdivisión</b>	<b>Pezizomycotina</b>
<b>Clase</b>	<b>Sordaryomicetes</b>

**Orden Hypocreales:** este grupo posee peritecios, ascos ovoides a cilíndricos, ascosporas de una a varias células, forzadamente descargadas y conidias enteroblásticas en conidióforos filídicos. Sus interacciones incluyen endofitismo, parasitismo en plantas y animales, e incluso pueden ser saprófitos. Son un grupo muy notable por su capacidad de producir metabolitos secundarios activos en vertebrados. Las familias *Hypocreaceae*, *Nectariaceae* y *Clavicipitaceae*, pertenecen a este grupo.

Entre los hongos hipocráceos están *Hypocrea*, el cual es común en madera y hojas en descomposición, posee ascosporas de dos células en una sola serie, las cuales se parten por el septo y sus especies poseen anamorfos en *Trichoderma* y *Gliocladium*.

**Orden Xylariales:** tradicionalmente reconocidos como pirenomicetos, los xilariales poseen peritecios oscuros, acartonados, carbonáceos o de apariencia leñosa. Los ascos son cilíndricos o subglobosos, usualmente con un anillo apical y con la particularidad de madurar a diferente velocidad dentro del mismo ascocarpo, por lo que se pueden encontrar ascosporas de muy disímil edad en su cuerpo fructífero. Las ascosporas son de una o varias celdas, hialinas u oscuras y con poros o suturas de germinación. Sus estados asexuales muestran una característica conidiogénica holoblástica.

Se considera que el nicho preferido de los xilariales es la descomposición de la madera y demás materiales orgánicos, pero se reconocen varias especies que son patógenas importantes en los géneros *Hypoxylon*, *Rosellinia*, *Kretzschmaria* y *Biscongniauxia*. El género tipo *Xylaria*, se caracteriza por especies saprótrofas o parásitos débiles en plantas leñosas que poseen estromas elongados y erectos.

**Orden Diaporthales:** los diaporthales producen peritecios en medio de un estroma formado por sus hifas y por el sustrato en el que crecen, así como también los pueden producir directamente de hifas sobre el sustrato. Las ascosporas pueden ser hialinas hasta color marrón y con uno o más septos. Existen varios tipos de anamorfos celomicetosos y muchas especies son importantes patógenos y saprótrofos.

*Phomopsis*, anamorfo de *D. phaseolorum* (fitopatógeno), es un hongo mitospórico aislado como hongo endófito. El hongo aparece durante la estación de crecimiento del hospedero y produce conidiomas loculados en el estroma, para desarrollar peritecios cuando el hospedero ha muerto, dentro de los cuales hay una alta presión interna que permite una dispersión forzada de las ascosporas.

## Clase

## Dothideomycetes

**Orden Pleosporales:** estos hongos poseen ascostromas variables, que pueden ser con muchos lóculos o casi como un cleistotecio. Los ascos son basales y crecen hacia arriba produciendo ascosporas variables en forma y oscuras o hialinas. Entre ellos hay fitopatógenos, saprótrofos y formadores de líquenes, así como también se ha registrado la existencia de especies acuáticas. Varias especies del orden, por ejemplo entre las pleosporáceas, son importantes modelos en estudios genéticos y moleculares.

A este grupo pertenece el género *Phoma*, *Preussia*, *Epicoccum*.