



**GUÍA PRÁCTICA:
IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA
EL AISLAMIENTO, PRESERVACIÓN Y USO DE
HONGOS MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEAS**

**Erika Vanessa Ramírez Bejarano
Nicola S. Flanagan
Agustina Ventre Lespiaucq
Ana Teresa Mosquera Espinosa**



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Cali



Acciones para la
conservación
Convenio CVC-FUIJ N°129 2021



Corporación Autónoma
Regional del Valle del Cauca

GUÍA PRÁCTICA:

IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA EL AISLAMIENTO, PRESERVACIÓN Y USO DE HONGOS MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEAS



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Cali



Convenio CVC-PUJ N°129 2021



Corporación Autónoma
Regional del Valle del Cauca

Santiago de Cali, 2024

GUÍA PRÁCTICA:

IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA EL AISLAMIENTO, PRESERVACIÓN Y USO DE HONGOS MICORRÍZICOS DE ORQUÍDEAS

Erika Vanessa Ramírez Bejarano

Nicola S. Flanagan

Agustina Ventre Lespiaucq

Ana Teresa Mosquera Espinosa



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Cali



Convenio CVC-PUJ N°129 2021



Corporación Autónoma
Regional del Valle del Cauca

Santiago de Cali, 2024

Guía práctica : implementación de metodologías para el aislamiento, preservación y uso de hongos micorrízicos de orquídeas / Erika Vanessa Ramírez Bejarano [y otros 3]. -- Santiago de Cali : Pontificia Universidad Javeriana, Sello Editorial Javeriano, 2024.

78 páginas : ilustraciones, figuras, tablas ; 28 x 22 cm
Incluye referencias bibliográficas.

ISBN: 978-628-7709-36-2

ISBN(e): 978-628-7709-37-9

1. Orquídeas 2. Hongos micorrízicos 3. Micorriza 4. Ecología I. Ramírez Bejarano, Erika Vanessa II. Flanagan, Nicola Sian III. Ventre Lespiaucq, Agustina IV. Mosquera Espinosa, Ana Teresa V. Pontificia Universidad Javeriana Cali. Facultad de Ingenierías y Ciencias. Departamento de Ciencias Naturales y Matemáticas VI. Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca - CVC

SCDD 584.4 ed. 23

CO-CaPUJ
lmc/2024



Pontificia Universidad
JAVERIANA
Cali

Guía Práctica:
**Implementación de metodologías
para el aislamiento, preservación
y uso de hongos micorrízicos de orquídeas**

Autoras:

- © Erika Vanessa Ramírez Bejarano
- © Nicola S. Flanagan
- © Agustina Ventre Lespiaucq
- © Ana Teresa Mosquera Espinosa

ISBN: 978-628-7618-27-5

ISBN(e): 978-628-761-829-9

Formato: 27,94 x 21,59 cms

Fotografía:

Erika Vanessa Ramírez Bejarano
Nicola S. Flanagan
Ana Teresa Mosquera Espinosa
Natalia Espinosa González

Coordinación editorial: Claudia Lorena González González

Asistente editorial: Jennifer Ramírez Martínez

Diagramación: Kevin Nieto Vallejo

Corrección de estilo: Comunicaciones Creativas

Impresión: Carvajal Soluciones de Comunicación S.A.S

Pontificia Universidad Javeriana, Cali - PUJ, Cali

Calle 18 N°118-250

Teléfonos (57-2) 3218200

Santiago de Cali, Colombia, 2024

Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca - CVC

Carrera 56 n°11-36

PBX (57-2) 6206600

Proyecto 129 de 2021 entre CVC y PUJ, Cali

Cítese el libro como:

Ramírez Bejarano, E. V., Flanagan, N. S., Ventre Lespiaucq, A., Mosquera-Espinosa, A. T. (2024). *Guía práctica: implementación de metodologías para el aislamiento, preservación y uso de hongos micorrízicos de orquídeas*. Sello Editorial Javeriano.

El contenido de esta publicación es responsabilidad absoluta de sus autores y no compromete el pensamiento de la Institución. Este libro no podrá ser reproducido por ningún medio impreso o de reproducción sin permiso escrito de los titulares del *copyright*.

Contenido

Presentación.....	9
Abreviaturas	10
Resumen gráfico	11
Introducción a las Asociaciones Micorrízicas Orquidioides	12
Protocolos de Bioseguridad	15
1 Aislamiento de Hongos Micorrízicos Orquidioides.....	16
Recomendaciones Generales para el Trabajo de Microbiología	16
1.1 Selección y Recolección de Raíces en Campo	16
1.2 Procesamiento y Desinfestación de Porciones de Raíces de Plantas Adultas	19
1.3 Siembra a Profundidad de Cortes Transversales de Raíces	24
1.4 Obtención en Cultivos Puros de los Posibles Hongos Micorrízicos	28
1.5 Preparación de Microcultivos para la Caracterización Morfológica.....	32
1.6 Observación del Crecimiento de Posibles Hongos Micorrízicos en Microcultivos al Microscopio de Luz	34
1.7 Conservación <i>ex situ</i> de Posibles Hongos Micorrízicos Orquidioides	36
2 Identificación Molecular de Hongos Micorrízicos Orquidioides	39
Recomendaciones Generales para el Trabajo de Biología Molecular	39
2.1 Crecimiento en Medio Líquido.....	40
2.2 Extracción de ADN	43
2.3 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	45
2.4 Electroforesis	47
2.5 Purificación de Productos de PCR para Secuenciación	48
2.6 Alineamiento, Edición de Secuencias y Búsquedas en GenBank.....	50

3	Recolecta y Conservación <i>ex situ</i> de Semillas de Orquídeas.....	51
	Recomendaciones Generales para el Trabajo de Conservación <i>ex situ</i> de Semillas.....	51
3.1	Recolección de Frutos.....	52
3.2	Desinfección de Frutos Cerrados	54
3.3	Desinfección de Semillas de Frutos Abiertos	56
3.4	Pruebas de Viabilidad	57
4	Siembra de Semillas Utilizando Posibles HMO para su Germinación Simbiótica	59
	Recomendaciones Generales para el Trabajo de Siembra de Semillas, Utilizando Posibles HMO para su Germinación Simbiótica	59
4.1	Reactivación e Inoculación de Posibles HMO en Medio Celulosa.....	60
4.2	Siembra de Semillas de Orquídeas para su Germinación por Posibles HMO	61
5	Anexos	62
5.1	Preparación de Materiales.....	62
5.2	Preparación de Reactivos	64
5.3	Esquemas.....	77
	Glosario.....	79
6	Referencias.....	80

Presentación

Colombia es un país megabiodiverso y un componente importante de esta biodiversidad son las orquídeas.

En el mundo, ocupa el primer lugar en diversidad de orquídeas, con más de 4800 especies, de las cuales el 37 % son endémicas. Esto también se debe a que tiene ecosistemas que van desde el nivel del mar hasta los 4500 msnm.

Hasta 2024, 253 especies de orquídeas han sido registradas en alguna categoría de amenaza, es decir, En Peligro Crítico (CR), en Peligro (EN), o Vulnerable (VU), incluyendo la especie *Cattleya quadricolor* endémica a Colombia y presente únicamente en los departamentos del Valle del Cauca, Risaralda y Quindío.

Sin embargo, factores como la transformación del paisaje, el cambio climático, y la extracción ilegal de individuos de su hábitat, amenazan a nuestras orquídeas y sus interacciones con polinizadores y hongos formadores de micorrizas.

Sobre estos últimos, los hongos formadores de micorrizas, se ha estudiado muy poco en nuestro país, es por esto que la CVC y la Pontificia Universidad Javeriana de Cali, nos unimos para adelantar actividades enfocadas a evaluar el estado de conservación de *Cattleya quadricolor* y adelantamos un estudio encaminado a desarrollar acciones para su conservación *ex situ* y posteriormente la reintroducción para incrementar el número de individuos de la especie en poblaciones ya existentes.

El trabajo adelantado nos ha permitido generar esta guía práctica, cuyo objetivo es promover el estudio de estas interacciones esenciales a través de la diversidad de orquídeas. Hoy es motivo de orgullo, no solo presentar la Guía sino también promover el intercambio de conocimiento y la democratización de la ciencia para avanzar en metas de conservación y gestión de los recursos biológicos.

MARCO ANTONIO SUÁREZ GUTIÉRREZ

Director General

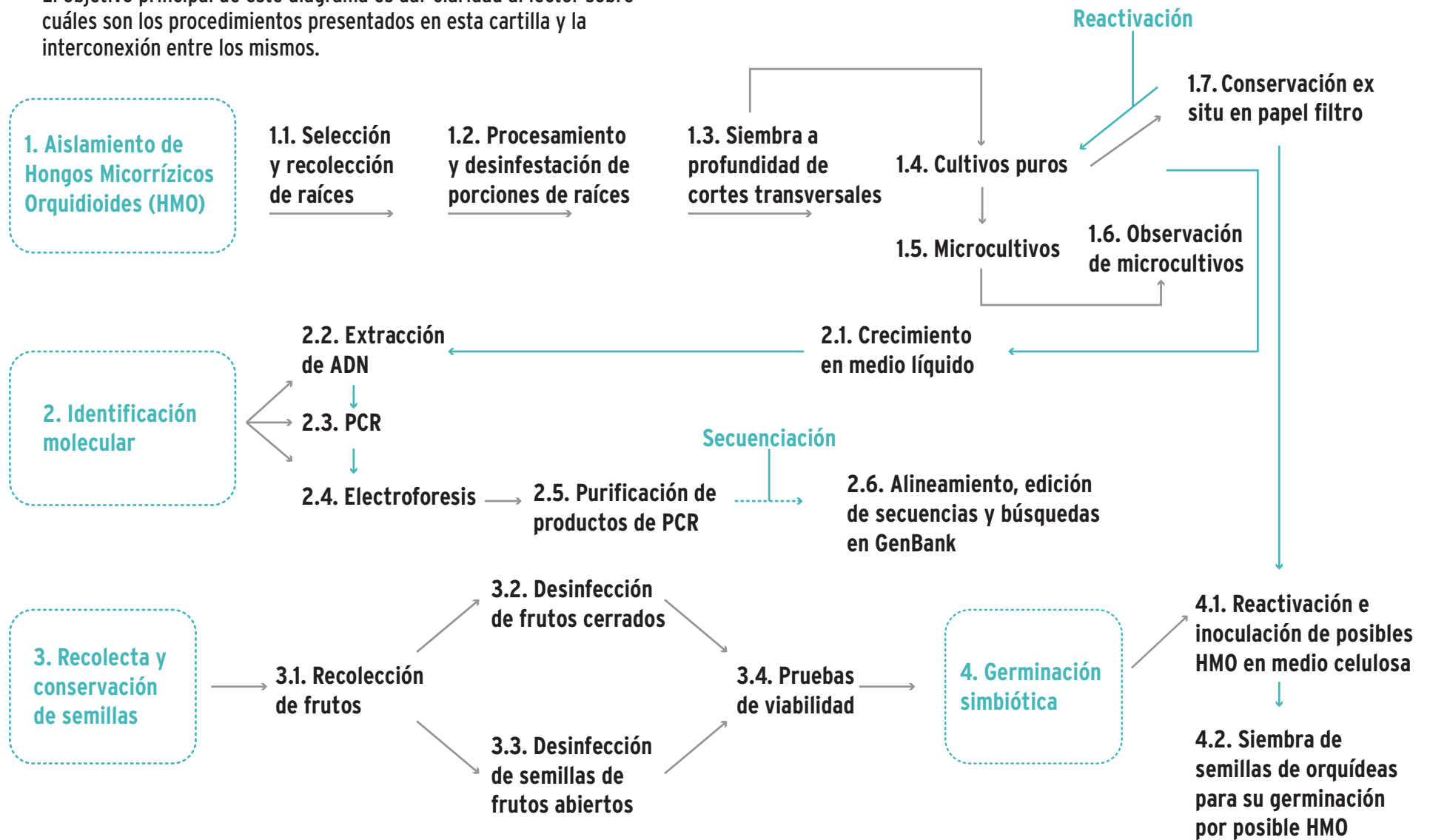
Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca - CVC

Abreviaturas

AD: agua destilada	MgCl₂: cloruro de magnesio
ADE: agua destilada estéril	MM: muestra maestra
ADN: ácido desoxirribonucleico	mM: milimolar
°C: grados centígrados	mm: milímetro
CPD: caldo papa dextrosa	MVM: medio de cultivo enriquecido con vitaminas y minerales
cm: centímetro	p / v: peso / volumen
cm²: centímetros cuadrados	pb: pares de bases
cm³: centímetros cúbicos	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato	PCI: probabilidad de identificación correcta
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	PDAa: medio agar de dextrosa y papa acidulado
g: gramos	PK: proteinasa K
h: hora	rpm: revoluciones por minuto
H₃BO₃: ácido bórico	s: segundos
HCl: ácido clorhídrico	S: unidad Svedberg
HMO: hongos micorrízicos orquidioides	SB: tampón ácido bórico / sodio
ITS: espaciador transcrito interno del ADN ribosómico	SDS: tampón de dodecilsulfato sódico
kg: kilogramo	SSU: subunidad pequeña del cistrón ribosómico nuclear
LSU: subunidad grande del cistrón ribosómico nuclear	TE: tampón hidroximetil aminometano (Tris) / ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
n: número de muestras	Tris-HCl: tampón hidroximetil aminometano-ácido clorhídrico
NaCl: cloruro de sodio	TZ: 2, 3, 5-trifeniltetrazolio
NaClO: hipoclorito de sodio	μL: microlitro
ng: nanogramos	μM: micromolar
NH₄CH₃CO₂: acetato de amonio	μm: micrómetro
NaOH: hidróxido de sodio	UV: luz ultravioleta
min: minutos	V: voltaje
M: molar	

Resumen gráfico

El objetivo principal de este diagrama es dar claridad al lector sobre cuáles son los procedimientos presentados en esta cartilla y la interconexión entre los mismos.



Introducción a las Asociaciones Micorrízicas Orquidioides

Diversidad y Estado de Conservación de las Orquídeas

La familia Orchidaceae es una de las familias vegetales con mayor número de especies. Con cerca de 28000 registradas hasta la fecha, representan alrededor del 8 % de todas las plantas con flores (Willis, 2017). Aunque las especies de orquídeas se encuentran distribuidas en una amplia gama de hábitats en todo el mundo, se reconocen por ser uno de los grupos de plantas más amenazados. El nivel de amenaza en gran parte es debido al alto nivel de endemismo de las especies (Calderón-Sáenz, 2006).

En Latinoamérica, el 33 % de las 1200 especies de orquídeas reportadas en Bolivia (Vásquez et al., 2003), el 37 % de las 4270 especies reportadas en Colombia (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible [MADS] y Universidad Nacional de Colombia [UNAL], 2015), y el 40 % de las 1200 especies reportadas en México (Castillo-Pérez et al., 2019) son endémicas.

Hasta la fecha, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) solo ha evaluado cerca del 7 % (1855) de las especies de orquídeas conocidas. De esta cifra, cerca de la mitad son clasificadas en una de las categorías de amenaza: vulnerable (VU), en peligro (EN) o en peligro crítico (CR). En Colombia, el país con la más alta diversidad de orquídeas, alrededor del 10 % (441), de un total de 4270 especies, han sido evaluadas. De estas, 54 % han sido clasificadas como amenazadas (Ospina-Calderón et al., 2021).

Por lo anterior, las orquídeas son reconocidas por su carácter prioritario, como valores objeto de conservación para el manejo de la biodiversidad. Estas plantas enfrentan múltiples amenazas, principalmente por actividades antrópicas, como la destrucción del hábitat, el cambio climático, y la recolección insostenible para el comercio ilegal (MADS y UNAL, 2015).

La vulnerabilidad de las orquídeas incrementa al tener distribuciones restringidas, las cuales se deben a los requerimientos ecológicos

específicos, incluyendo las interacciones bióticas que establece esta familia de plantas con hongos micorrízicos, polinizadores y árboles hospederos (Gale et al., 2018). Dichos requerimientos influyen en el establecimiento, crecimiento, reproducción y supervivencia de estas plantas (Andresen et al., 2018; Tedersoo et al., 2020). La alteración de estas interacciones puede acrecentar la susceptibilidad de las orquídeas a los efectos del cambio climático (Fay, 2018; Gale et al., 2018).

Hongos Micorrízicos Orquidioides

Las semillas de las orquídeas carecen de endospermo, el tejido que rodea y nutre al embrión en las semillas de angiospermas (Berger, 2003). Por ende, contienen reservas de energía limitadas, lo que dificulta que germinen por sí solas (Dearnaley et al., 2012). Para lograr la germinación y el establecimiento de nuevas plántulas en su hábitat natural, las orquídeas han evolucionado, estableciendo una relación obligatoria con algunos clados fúngicos. A esta asociación simbiótica planta-hongo se le conoce como micorriza, y a los socios fúngicos involucrados se les conoce como hongos micorrízicos orquidioides (HMO). Estos hongos les aportan a las semillas carbono orgánico para germinar, por lo cual dependen completamente de dicha asociación (Selosse et al., 2006; Smith y Read, 2008).

Esta relación micorrizica continúa en las plantas adultas, las cuales dependen de esta parcial o totalmente (Stewart y Kane, 2007; Dearnaley et al., 2012). Al interior de las raíces de las plantas adultas, los HMO forman estructuras complejas, conocidas como pelotones. Los pelotones son un enrollamiento hifal que se encuentra en el parénquima cortical de las raíces de las orquídeas y son el sitio de transferencia de nutrientes entre estos organismos (Dearnaley et al., 2012).

Hay evidencias de que esta simbiosis es mutualista, donde el hongo aporta carbono y nitrógeno a la planta, y a su vez, esta también es capaz de aportarle carbono al hongo (Cameron et al., 2006). Sin embargo, se ha observado frecuentemente que la planta puede no aportar beneficios nutricionales al hongo y, por lo tanto, aún se cuestiona que esta interacción sea un verdadero mutualismo (Rasmussen y Rasmussen,

2009). Por tanto, el nivel de dependencia de las orquídeas estará definido por las condiciones ecológicas, las estrategias tróficas de la especie para conseguir nutrientes y las combinaciones planta-hongo que se establezcan (Selosse et al., 2006).

Las relaciones micorrízicas orquidioides se establecen con hongos que pertenecen principalmente al género-forma *Rhizoctonia* (Mosquera-Espinosa et al., 2010; Rasmussen y Rasmussen, 2014). Las asociaciones más frecuentes se dan con los géneros fúngicos del filum Basidiomycota: *Ceratobasidium*, *Sebacina*, *Tulasnella*, y *Thanatephorus*, en sus expresiones anamorfas y teleomorfas (Suárez et al., 2006; Mosquera-Espinosa et al., 2010; Dearnaley et al., 2012). Aunque en algunos casos específicos también se encuentran cumpliendo una función micorrízica hongos del filum Basidiomycota menos reportados, como *Psathyrella* cf. *candolleana* orquídeas terrestres (Bayman et al., 2016).

Esta asociación micorrízica puede ser de carácter generalista o especialista, dependiendo de la cantidad de socios fúngicos y los respectivos clados con los cuales se asocie la orquídea (Otero et al., 2007). La especificidad de esta relación puede variar según el rango taxonómico de los hongos y del hospedero (Stewart y Kane, 2007). Además, el tipo de asociación que se establezca puede ser diferente a lo largo del ciclo de vida de la planta, dependiendo de las condiciones bióticas y abióticas que se presenten (Selosse et al., 2006; Bidartondo y Read, 2008). Por tanto, se hace necesario conocer la identidad de los HMO asociadas a las diferentes especies de orquídeas, para su posterior aplicación en programas de conservación.

La identificación de los hongos micorrízicos de orquídeas se realiza por medio de métodos moleculares. Para esto se caracteriza la secuencia de ADN (ácido desoxirribonucleico) de una pequeña porción del genoma de los hongos. Este proceso es conocido como código de barras de la vida, término que en su definición estricta es entendido como la identificación a nivel de especie, utilizando un único fragmento estandarizado de ADN (Valentini et al., 2009). En hongos, el locus ITS-ARNr (Espaciador Transcrito Interno del ARN

ribosómico) ha sido adoptado como código de barras, puesto que proporciona una alta resolución para la identificación de hongos a nivel de especie (Seifert, 2009).

Hongos Micorrízicos Orquidioides en Programas de Conservación de Orquídeas

La alta dependencia de las orquídeas a los HMO durante su ciclo de vida implica que en cualquier programa de conservación de orquídeas, se deban considerar los socios fúngicos asociados a cada especie (Swartz y Dixon, 2009). Para ello se debe reconocer no solo la identidad de los HMO con los cuales se asocia la especie de orquídea, sino, además, la forma de asociación con los HMO (generalista o especialista) a lo largo del ciclo de vida de la planta (McCormick et al., 2004; Zettler et al., 2013).

Las asociaciones micorrízicas pueden resultar claves en el establecimiento y la sobrevivencia de las plantas de orquídeas a largo plazo, en un ambiente con condiciones naturales (Zi et al., 2014). La importancia de esta asociación radica en las ventajas adaptativas que el hongo le da a la planta ante el suministro de nutrientes y la producción de metabolitos secundarios, como también a la fitoprotección por ataque de patógenos (Mosquera-Espinosa et al., 2013; Hajong y Kapoor, 2020). Por tanto, integrar los hongos apropiados en los proyectos de conservación y restauración puede mejorar la capacidad de las orquídeas para tolerar las perturbaciones de origen biótico y abiótico (McCormick et al., 2004).

El proceso investigativo para considerar los HMO requiere el aislamiento, identificación y conservación *ex situ* de estos. Paralelamente, es indispensable salvaguardar en condiciones *ex situ* las semillas de una amplia diversidad de especies de orquídeas (Seaton y Ramsay, 2009). Este será un paso clave para apoyar la germinación *in vitro* (*ex situ*) tanto de forma simbiótica como asimbiótica. Por ello, se hace necesario procurar tener una buena calidad de las semillas desde el momento de la recolección de los frutos. La calidad de las mismas está íntimamente relacionada con los sitios de donde provienen los frutos que las contienen (poblaciones naturales o invernaderos) y los cuidados que se

tienen al cosechar, desinfectar y almacenar las semillas correctamente. Las semillas junto con los HMO conservados se evalúan en ensayos que comprueban el proceso de germinación simbiótica y la sobrevivencia de las plantas (Seaton y Ramsay, 2009). El hecho de tener los elementos adecuados (HMO en cultivo puro, semillas viables y los medios de cultivo apropiados) para realizar los ensayos de germinación, garantiza el éxito en los programas de conservación y restauración de orquídeas (Meng et al., 2019).

El estudio de las interacciones micorrízicas de las orquídeas, en sentido amplio, requiere una gran variedad de aproximaciones. Estas incluyen ensayos tanto en campo como en laboratorio, procedimientos microbiológicos para aislar los hongos de interés en medios de cultivos artificiales, procedimientos moleculares para la identificación taxonómica, experimentos de propagación simbiótica, entre otros.

Acerca de esta Guía

Aquí presentamos una guía práctica que tiene como objetivo facilitar el estudio, conservación y uso de los HMO, como aporte a los programas de conservación y manejo de especies de orquídeas en América Latina. Se recopilan protocolos de laboratorio utilizados para las fases de aislamiento, conservación e identificación mediante características morfológicas y moleculares de los hongos del género-forma *Rhizoctonia*, la conservación *ex situ* de semillas y los experimentos de germinación simbiótica. Cada protocolo contiene un paso a paso, para asegurar su fácil implementación en laboratorios y grupos de investigación que no cuentan con experiencia previa en el tema.

Los protocolos presentados en esta guía son el resultado de investigaciones realizadas por el Grupo de Investigación Ecorquídeas de la Pontificia Universidad Javeriana seccional Cali en años anteriores (algunos estudios aún no han sido publicados), y de los trabajos desarrollados y publicados por otros investigadores externos, por ende, la presente cartilla es un producto del grupo de investigación mencionado.

Los procedimientos publicados sobre la obtención de hongos en medios de cultivo y su respectiva identificación molecular han sido desarrollados generalmente para cepas fúngicas cultivables de diversas familias de orquídeas, incluyendo las de hábitats terrestres de zonas templadas. Por tanto, nuestro equipo de trabajo ha realizado varias modificaciones en dichos procedimientos, para que estos sean implementados en los estudios de orquídeas terrestres y epífitas de zonas tropicales. De igual manera, estas modificaciones se han realizado para conservación *ex situ* de semillas. A lo largo de varios años, en investigaciones propias, los procedimientos aquí presentados se han usado y comprobado su eficacia con orquídeas terrestres y epífitas de zonas tropicales.

Protocolos de Bioseguridad

1. Al ingresar al laboratorio es obligatorio usar bata de laboratorio limpia; cabello recogido, según sea el caso; vestimenta cómoda que cubra los brazos y las piernas; y zapatos cerrados. Además, según el procedimiento, se deberá usar guantes, tapabocas y gafas de laboratorio.
2. Se recomienda colocar luz ultravioleta (UV) en la cámara de flujo laminar antes de iniciar los respectivos procedimientos, con el fin de evitar posibles fuentes de contaminación. Se sugiere colocar la luz UV durante diez minutos.
3. Antes y después de realizar los procedimientos se deben lavar las manos con agua y jabón antibacterial y ser secadas con toallas de papel. Además, se recomienda utilizar alcohol al 70 % en las manos, previo a la manipulación de los reactivos y el material biológico. Durante el procedimiento de microbiología, si no se usan guantes, se sugiere usar alcohol al 70 % durante la manipulación del material.
4. Previo a cada procedimiento, los mesones y la cámara de flujo laminar deben limpiarse con alcohol al 96 %. Además, se sugiere limpiar con este mismo reactivo, según sea el caso, los elementos a usar en cada procedimiento.
5. Los equipos que se usen durante la investigación deben limpiarse con alcohol al 96 % cada ocho días. Además, el material de descarte debe ser autoclavado en este mismo intervalo de tiempo. Estas acciones se realizan con el fin de disminuir una potencial fuente de contaminación.
6. Durante los procedimientos de laboratorio no se deben usar ninguna clase de accesorios, como manillas, anillos, relojes, gorras, entre otros, o cualquier implemento externo que sea una fuente de contaminación.
7. Se recomienda identificar los lugares en donde se encuentran localizados los elementos de bioseguridad, como la ducha de seguridad, los botes de basura, el guardián, los recipientes de desecho de reactivos y la bolsa roja para desecho de material biológico.
8. Se debe tener en cuenta que si se presenta alguna situación de carácter mayor, como quemaduras con mecheros, derrame de reactivos, entre otros, se debe remitir la situación a la persona encargada.

1 Aislamiento de Hongos Micorrízicos Orquidioides

Recomendaciones Generales para el Trabajo de Microbiología

- ✓ Se deben seguir los protocolos de seguridad requeridos. Durante estos procedimientos se debe utilizar bata de laboratorio, guantes, y si es necesario, gafas de seguridad.
- ✓ Los procedimientos de laboratorio se deben realizar en la cámara de flujo laminar y bajo condiciones de asepsia.
- ✓ Los materiales que se utilicen en cada procedimiento deben ser previamente esterilizados en autoclave y los elementos que se usen continuamente, como las pinzas de disección o la aguja hipodérmica, se deben esterilizar en la cámara de flujo laminar, sumergiéndolos en un vaso de precipitado con etanol al 96 % y flameándolos en un mechero con este compuesto a la misma concentración.
- ✓ Se proporcionan detalles para la preparación de los reactivos y los materiales de cada procedimiento en la sección de Anexos.
- ✓ Los productos de cada metodología deben ser etiquetados con la identidad y fecha correspondiente, usando rotuladores indelebles (marca: Sharpie).

1.1 Selección y Recolección de Raíces en Campo

Este procedimiento tiene como objetivo seleccionar y recolectar porciones de raíces con alta densidad de pelotones y consecuentemente, presencia de posibles HMO, sin afectar negativamente a las plantas de las cuales se colecte. Se debe tener en cuenta que las colectas realizadas deben considerar los permisos ambientales necesarios, emitidos por las autoridades competentes de cada región.

1.1.1 Materiales

- Bolsas plásticas de cierre hermético (tantas como el número de muestras independientes).
- Papel absorbente.
- Navaja y tijeras de podar.
- Etanol al 70 % y algodón para esterilizar las tijeras (Anexo 5.2.2)
- Marcador 'Sharpie' y lapiz para rotular.

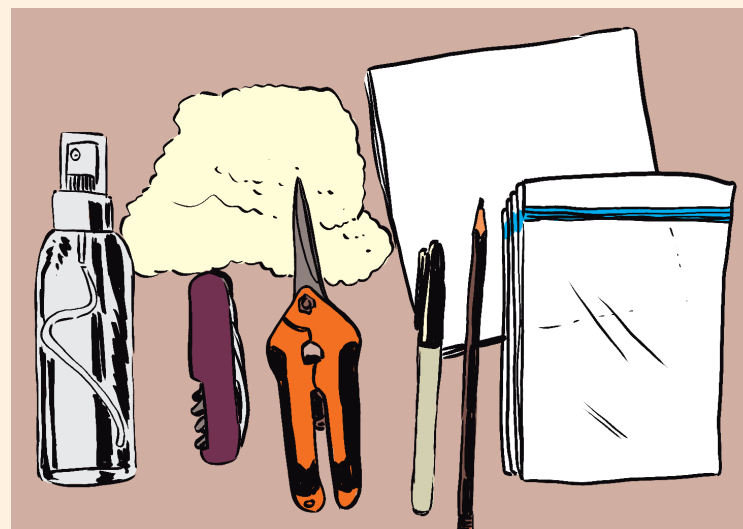


Figura 1. Materiales para la recolección de raíces en campo

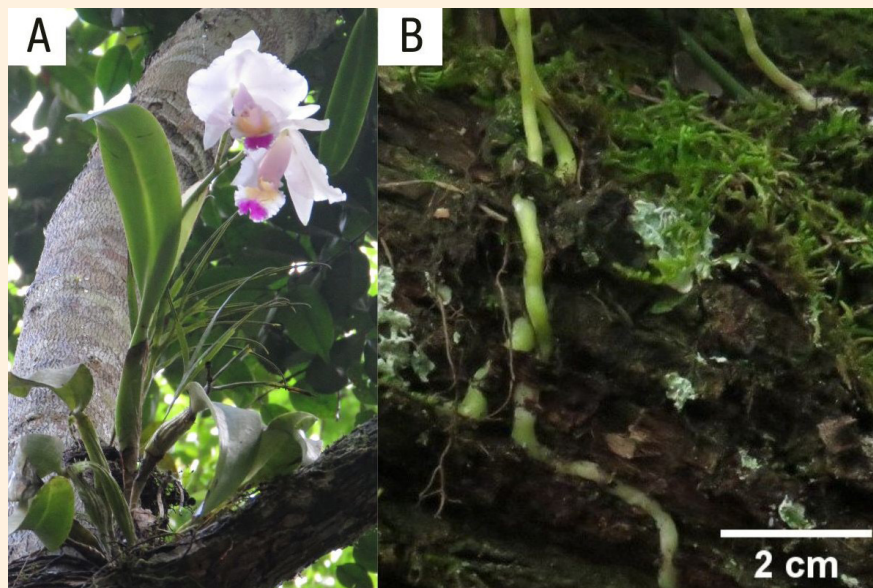


Figura 2. Individuo adulto de *Cattleya quadricolor*. A. Planta adulta en floración en ambiente natural. B. Porciones de raíces de un individuo adulto adheridos al sustrato del forófito (árbol hospedero de la planta) en ambiente natural

1.1.2 Procedimiento

1. Se seleccionan individuos de orquídeas según el diseño experimental del estudio. Se buscan plantas sanas que tengan un sistema radical bien desarrollado (Figuras 2 y 3), para evitar comprometer la supervivencia del individuo.
2. Se seleccionan al azar tres o cuatro porciones de raíz de 3 a 5 cm de longitud de partes proximales, medias y distales del sistema radical de la orquídea adulta, para obtener una representatividad adecuada de toda la longitud de una misma raíz. Esto se debe a que la densidad de pelotones puede variar entre estas zonas en la misma raíz (Figura 2B, 3B y 3C) (Bertolini et al., 2014).

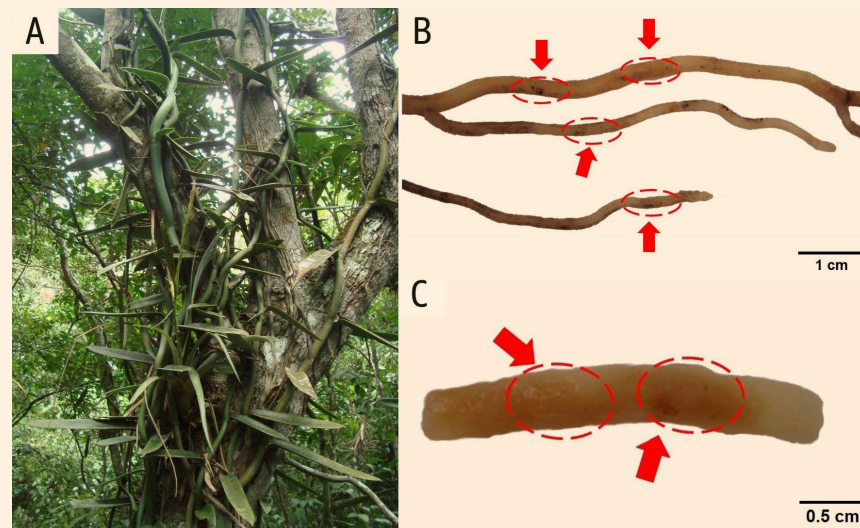
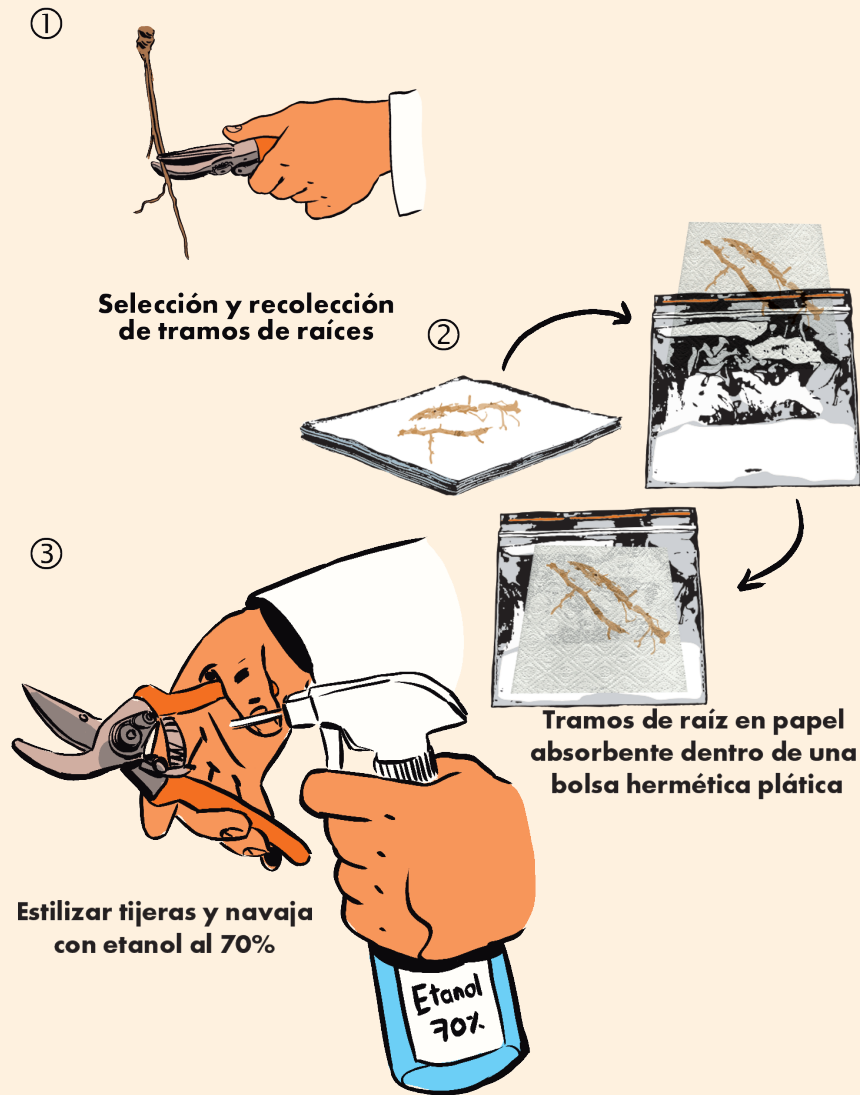


Figura 3. Individuo adulto de *Vanilla calyculata*. A. Planta adulta en ambiente natural. B y C. Porciones de raíz con zonas pardas en la superficie y presencia de velamen. La señalización indica la coloración parda en la superficie de la raíz, indicador de alta densidad de pelotones

3. Se debe tener en cuenta que las porciones de las raíces seleccionadas no deben ser muy jóvenes, ya que raíces recientemente desarrolladas pueden contener una densidad baja de pelotones; ni muy viejas, dado que los pelotones se degradan con el tiempo (Rasmussen y Whigham, 2002).
4. Se verifica si las porciones de las raíces están bien adheridas al sustrato (Figura 2B), y si a simple vista o bajo la lupa presentan una coloración parda en su superficie (Figura 3B y 3C), ya que estas pueden ser características de alta densidad de pelotones (Suarez et al., 2006). Sin embargo, se debe aclarar que estas características no son una norma y es posible encontrar tramos de raíces completamente desconectados del sustrato, los cuales poseen pelotones.



1.1.3 Procedimiento

1. Una vez seleccionada la porción de la raíz de interés, se retira cuidadosamente del sustrato con ayuda de la navaja y se corta con las tijeras de podar o con la misma navaja.
2. Se colocan las porciones correspondientes a la misma muestra con un trozo de papel absorbente húmedo dentro de una bolsa plástica con cierre hermético, debidamente etiquetada.
3. Se debe esterilizar las tijeras y la navaja entre diferentes muestras, utilizando algodón mojado con etanol a 70 %, para evitar contaminación cruzada.

Figura 4. Resumen, paso a paso, del proceso de recolección de raíces de plantas adultas



1.2 Procesamiento y Desinfestación de Porciones de Raíces de Plantas Adultas

Basado en la metodología propuesta por Mosquera-Espinosa *et al.* (2010). Al interior de las raíces de las plantas adultas de las orquídeas, comúnmente hay zonas que presentan colonización de HMO con la formación de pelotones. Por tanto, este procedimiento tiene como objetivo obtener cortes transversales de raíces con pelotones, listos para ser sembrados a profundidad en medio de cultivo artificial, luego de que el tejido pase por un proceso de desinfestación y secado.

1.2.1 Materiales

- Porciones de raíces muestreadas en campo, guardadas en bolsas de cierre hermético.
- Portaobjetos.
- Papel absorbente estéril (Anexo 5.1.1).
- Agua destilada (AD).
- Agua destilada estéril (ADE).
- Hipoclorito de Sodio 1 % (NaClO) (Anexo 5.2.3)
- Etanol al 70 % (Anexo 5.2.2).
- Jabón líquido.
- Un vaso de precipitado de 100 mL (este será usado para descarte de reactivos).
- Dos vaso de precipitado de 50 mL (uno deberá estar en condiciones estériles).
- Bisturí con cuchilla estéril.
- Pinzas de disección estériles.
- Microscopio de luz con objetivos de aumento a 4 X, 10 X.
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %.

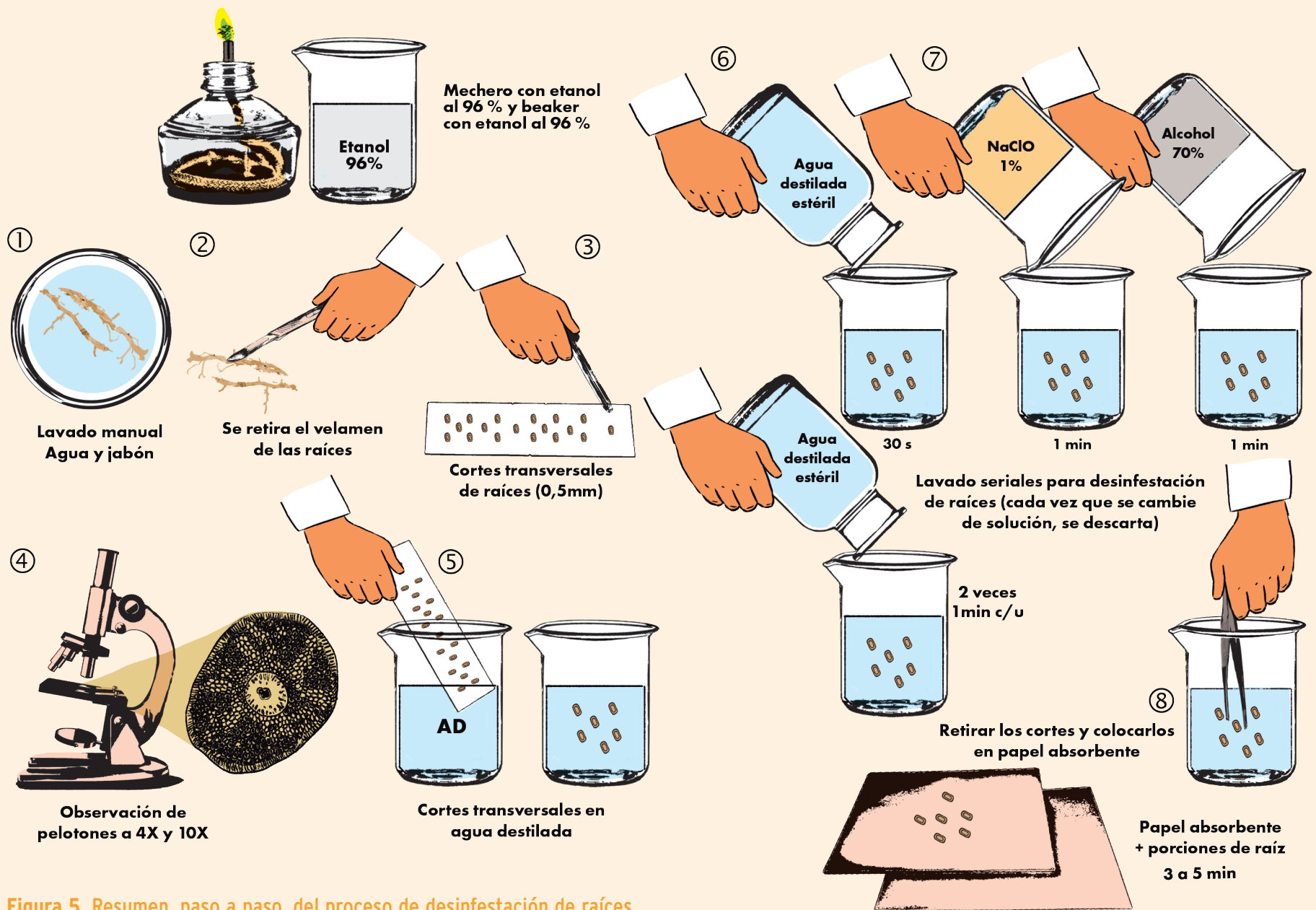


Figura 5. Resumen, paso a paso, del proceso de desinfección de raíces para el aislamiento de HMO

1.2.2 Procedimiento

1. Una vez en el laboratorio, se lavan manualmente las porciones de las raíces seleccionadas con agua y jabón para eliminar el sustrato adherido, incluyendo suelo o corteza del forófito (Figura 6). Se usa jabón líquido en proporción de 1 mL de jabón por 2 mL de agua.
2. Se retira el velamen de las porciones de raíz con ayuda de un bisturí con cuchilla estéril, raspando suavemente la superficie de la raíz longitudinalmente (Figura 7).
3. Con un bisturí, se realizan cortes transversales de la raíz de 0,5-1 mm de grosor, aproximadamente (Figura 8). Los cortes se colocan sobre un portaobjetos y se cubren con una gota de AD (Figura 9). En lo posible, se usan portaobjetos biselados y se etiquetan con el código correspondiente usando un rotulador permanente.
4. Se verifica la presencia de pelotones en los cortes de raíz, mediante el uso del microscopio a dos aumentos (4 X y 10 X). Se recomienda usar estos aumentos para facilitar la selección de los cortes transversales con pelotones sin utilizar en el cubreobjetos. Debido a lo anterior, no se puede pasar a un aumento mayor a 10 X, puesto que el lente puede entrar en contacto con el agua, lo que favorece el deterioro de este.
5. Se retiran aquellos cortes que tienen pelotones (Figura 10) y se mantienen sumergidos con AD en un vaso de precipitado pequeño (50 mL) sin esterilizar, para evitar su deshidratación.



Figura 6. Porción de raíz lavada de *Cattleya quadricolor*: la coloración oscura indica el contacto con el forófito



Figura 7. Proceso de retiro de velamen de la porción de raíz de *Cattleya quadricolor*

Los pasos posteriores se llevarán a cabo en la cámara de flujo laminar, bajo condiciones de asepsia.

6. Para la desinfección superficial de las porciones de raíz se implementan lavados por agitación, realizando movimientos circulares con el vaso de precipitado (Figura 11) durante un determinado tiempo para cada solución, y se descarta el excedente en el vaso de precipitado correspondiente (100 mL) antes de pasar al siguiente lavado. Se debe tener mucho cuidado de no perder los cortes al momento de descartar los excedentes de líquido / lavado.
7. Para empezar los lavados se descarta el AD y los cortes transversales se pasan a un vaso de precipitado de 50 mL estéril. Para el primer lavado se añaden aproximadamente 20 mL (suficiente que cubra el tejido) ADE durante 30 s, y luego se descarta el líquido. Para el segundo lavado se añaden aproximadamente 20 mL de hipoclorito de sodio al 1 % (NaClO) y se lava durante 1 min. El tercer lavado se realiza con 20 mL de etanol al 70 % y se lava nuevamente durante 1 min. Finalmente, se realizan dos lavados con ADE por 1 min cada uno y se descarta en el vaso de precipitado dispuesto para este proceso.
8. Con ayuda de las pinzas de disección esterilizadas en el mechero se retiran los cortes transversales ya desinfectados y se colocan en papel absorbente estéril dentro del área estéril que forma el mechero (Figura 12). Se espera de 3 a 5 min hasta que los cortes se sequen con el aire caliente que circula en esa zona y se procede a sembrarlos mediante el método de siembra a profundidad (Mosquera-Espinosa et al., 2010).

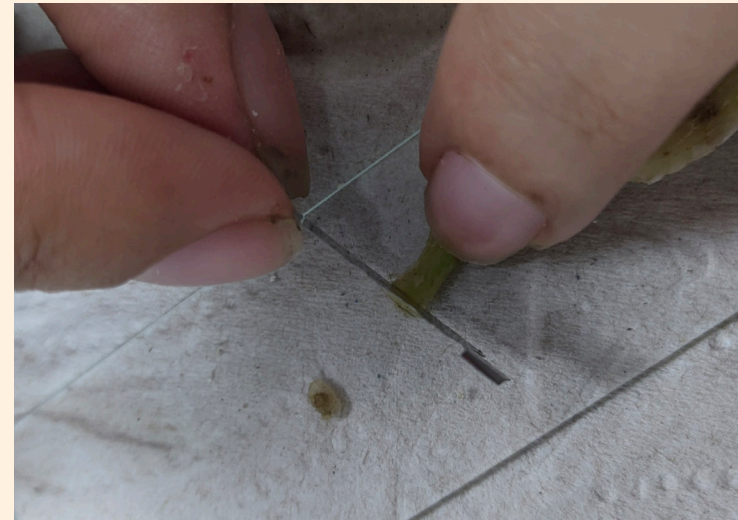


Figura 8. Proceso de cortes transversales de un grosor entre 0,5-1 mm de la porción de raíz de *Cattleya quadricolor*

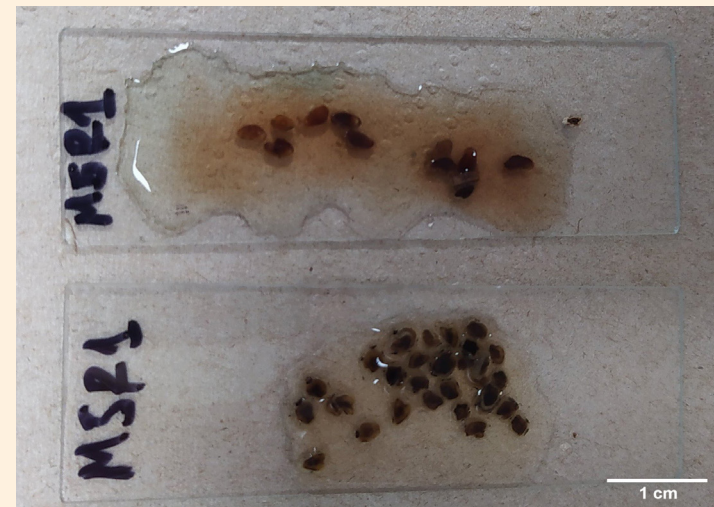


Figura 9. Cortes transversales de raíces de *Cattleya quadricolor* con agua destilada en portaobjetos, debidamente rotulado



Figura 10. Corte transversal de raíces de *Cattleya quadricolor* con pelotones en el tejido parenquimático cortical a magnificación 10 X. La flecha indica los pelotones en el corte transversal de la raíz

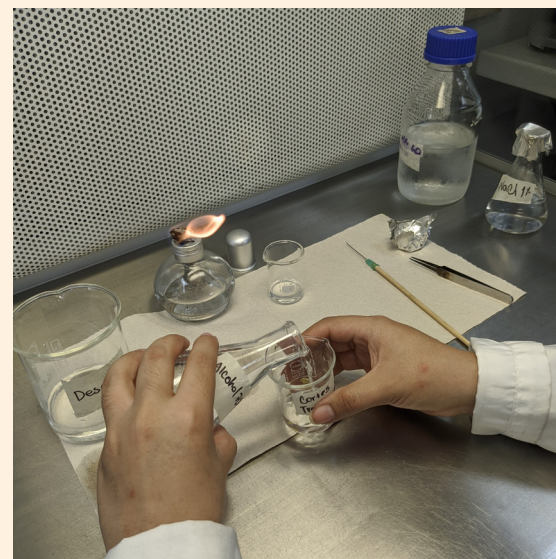


Figura 11. Proceso de desinfestación de cortes transversales de raíces



Figura 12. Cortes transversales de raíces en papel absorbente estéril, secándose frente al mechero

1.3 Siembra a Profundidad de Cortes Transversales de Raíces

Este procedimiento tiene como objetivo obtener cultivos mixtos de hongos a partir de cortes transversales de raíces con presencia de pelotones, para aislar posibles hongos micorrízicos orquídioides.

1.3.1 Materiales

- Cortes transversales de raíces desinfectadas y secas del paso anterior.
- Cajas Petri plásticas grandes estériles (9 cm x 1,5 cm).
- Medio agar de dextrosa y papa acidulado (PDAa) / medio con vitaminas y minerales (MVM) (Anexo 5.2.4 y 5.2.5).
- Pinzas de disección y aguja de inoculación (hipodérmica) de 4 cm de largo, estériles.
- Cristapel o papel film de plástico (5 cm de ancho).
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %.

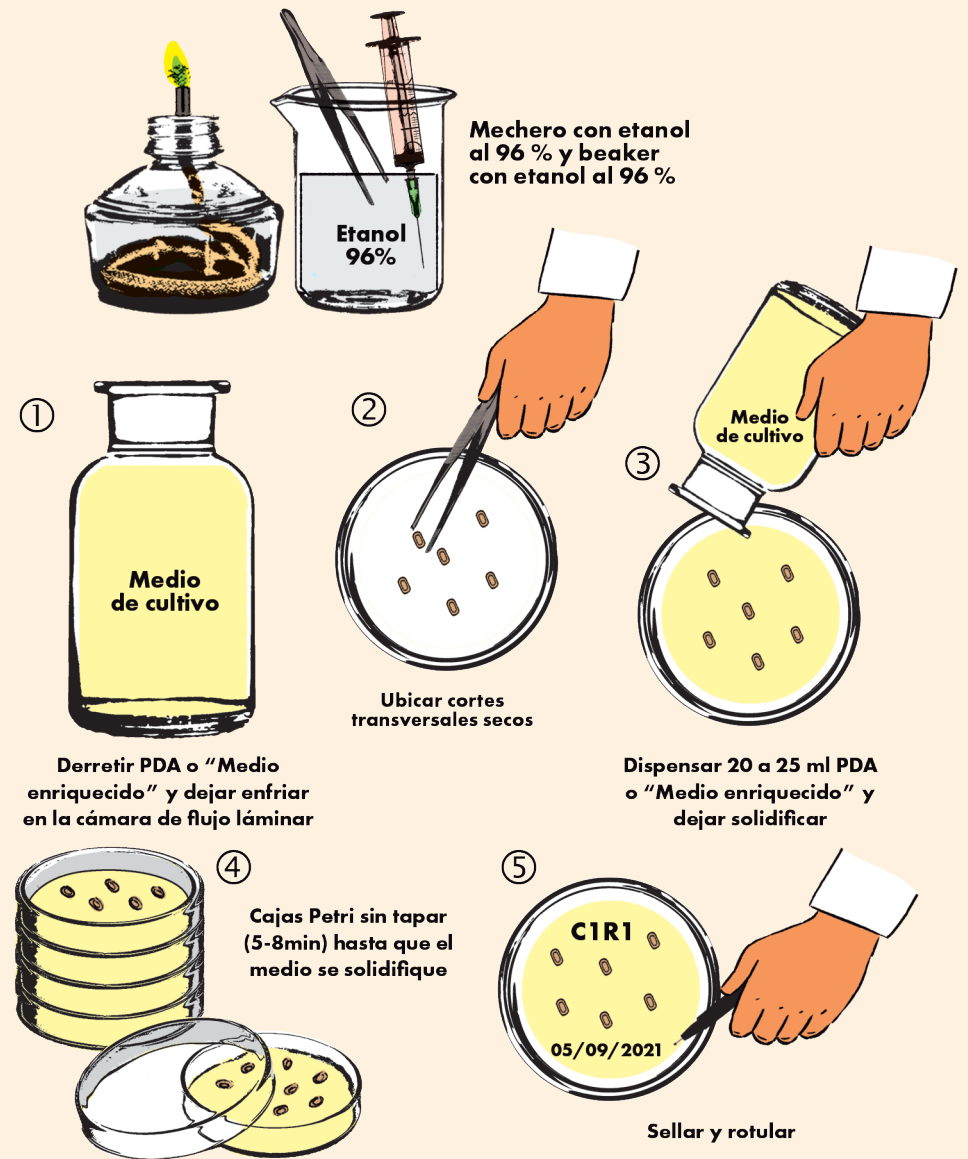


Figura 13. Resumen, paso a paso, del proceso de siembra a profundidad de cortes transversales de raíces con presencia de pelotones, para el aislamiento de HMO

1.3.2 Procedimiento

1. Se derrite el medio PDAA / MVM en el microondas. Para esto se debe aflojar la tapa del frasco que contenga el medio y colocarlo en periodos de 30 s hasta que tenga consistencia líquida. Se recomienda retirarlo del microondas antes de que llegue a su punto de ebullición, luego de aproximadamente 2 min 30 s.
2. En la cámara de flujo laminar se mantiene el medio de cultivo en constante agitación (de forma circular) y se deja enfriar durante 5 a 8 min, hasta alcanzar 38 °C, aproximadamente. Se abre la caja Petri y la tapa se coloca sobre el borde de la base de la caja, cubriendo la tercera parte de esta. Con ayuda de la aguja de inoculación y las pinzas de disección estériles se distribuyen los cortes transversales secos en la base de la caja (Figura 14). Por cada caja Petri se colocan de 4 a 6 cortes, según el diámetro de la raíz procesada (más cortes cuanto más fina sea la raíz).
3. Se dispensan entre 20 a 25 mL de medio PDAA / MVM en cada caja Petri (Figura 15). Con ayuda de la aguja de inoculación estéril se mantiene la distribución de los cortes equidistantes, para que las colonias de los microorganismos que se desarrollen no lleguen a coalescer o juntarse y facilitar, posteriormente, su aislamiento en cultivo puro (Figura 16).

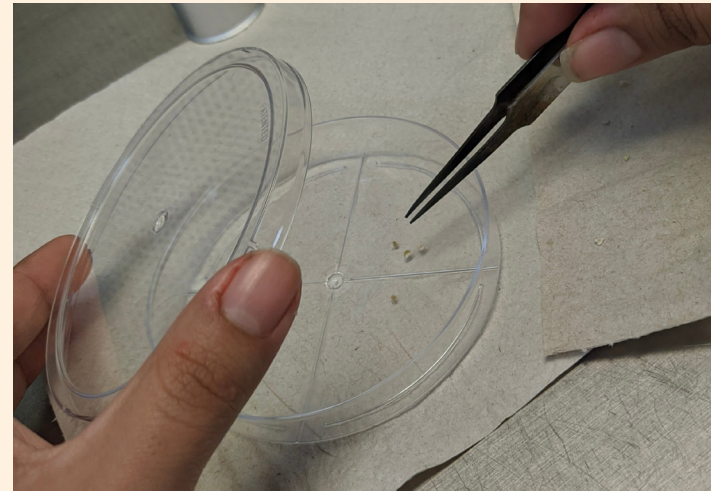


Figura 14. Distribución de los cortes transversales secos, con ayuda de la aguja de inoculación y las pinzas de disección estériles, en la base de la caja Petri



Figura 15. Proceso de dispensar el medio de cultivo en cada caja Petri

4. Se mantienen las cajas Petri sin tapar hasta que el medio se solidifique, es decir, aproximadamente de 5 a 8 min (Figura 17). De esta manera se evita condensación en la tapa para facilitar las observaciones de seguimiento en el proceso de crecimiento de los microorganismos en colonia (Figura 18).
5. Las cajas Petri se sellan con cristapel y se etiquetan en la tapa con el código de identificación correspondiente y la fecha de siembra. Se incuban a 25 °C en la oscuridad y boca abajo. Esto último para ralentizar el crecimiento de los hongos, hasta observar crecimiento micelial.



Figura 16. Distribución equidistante de los cortes transversales de raíces, con la aguja de inoculación estéril

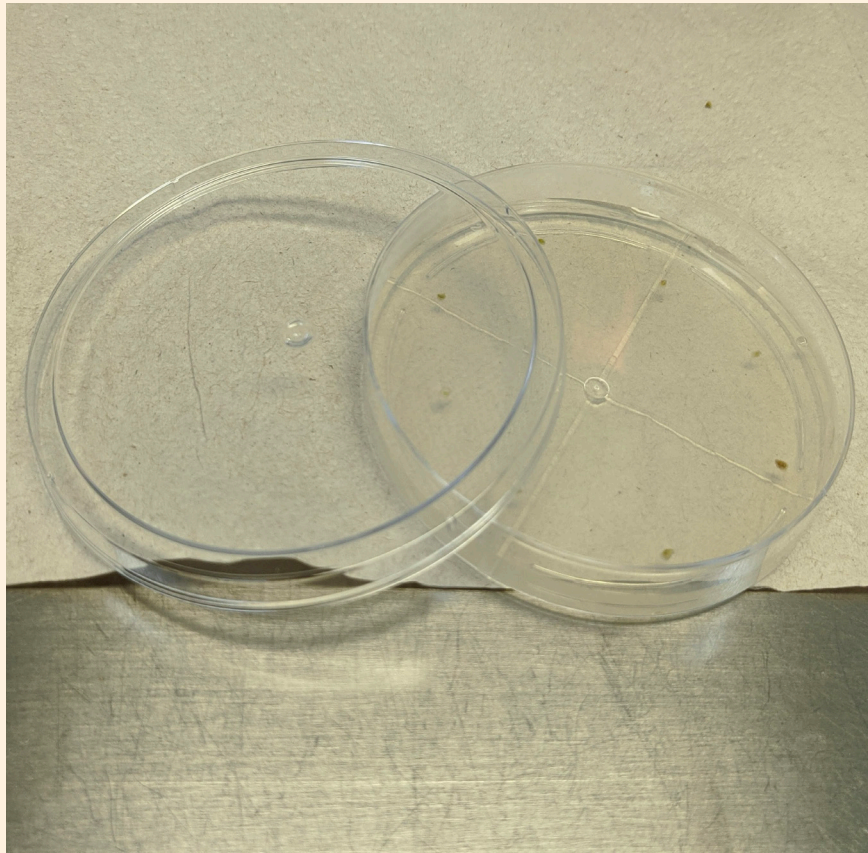


Figura 17. Caja Petri sin tapar, hasta la solidificación del medio de cultivo

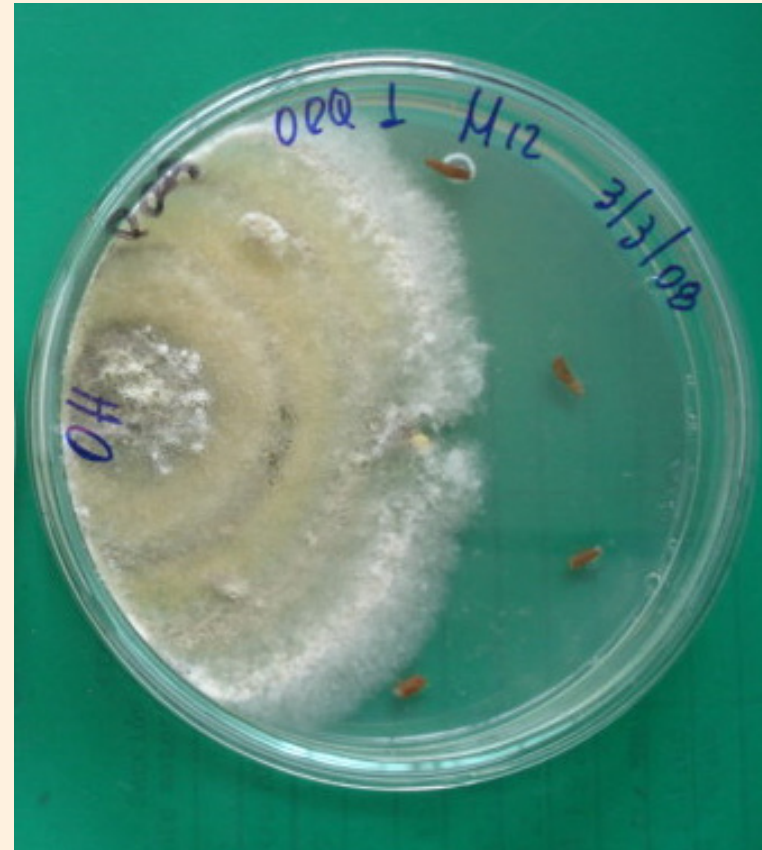


Figura 18. Crecimiento micelial a partir de cortes transversales de raíces en caja Petri

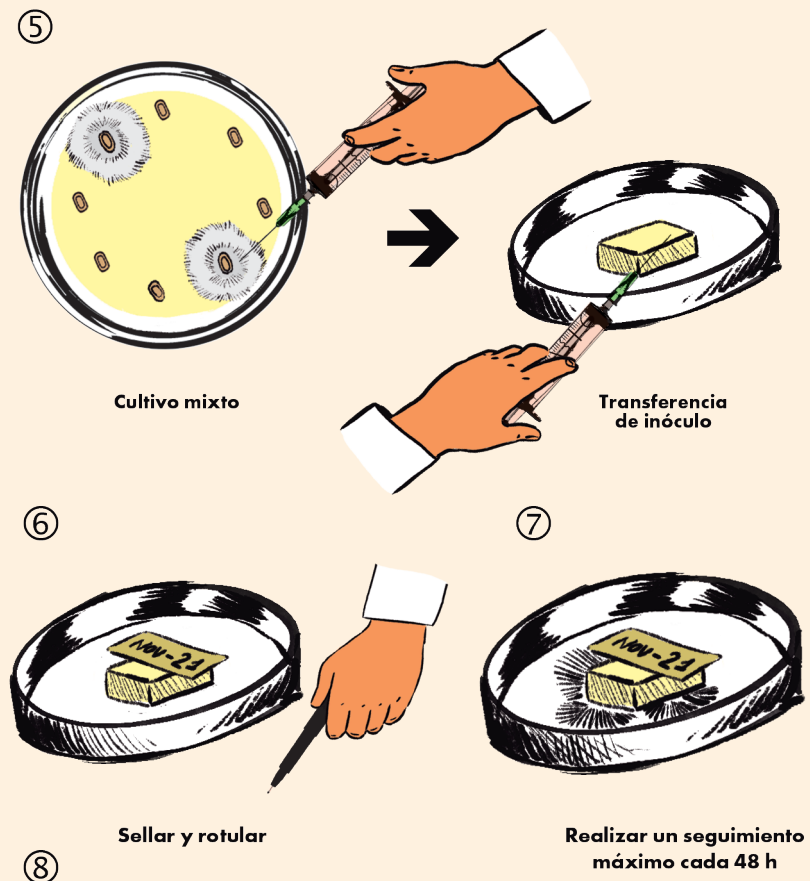
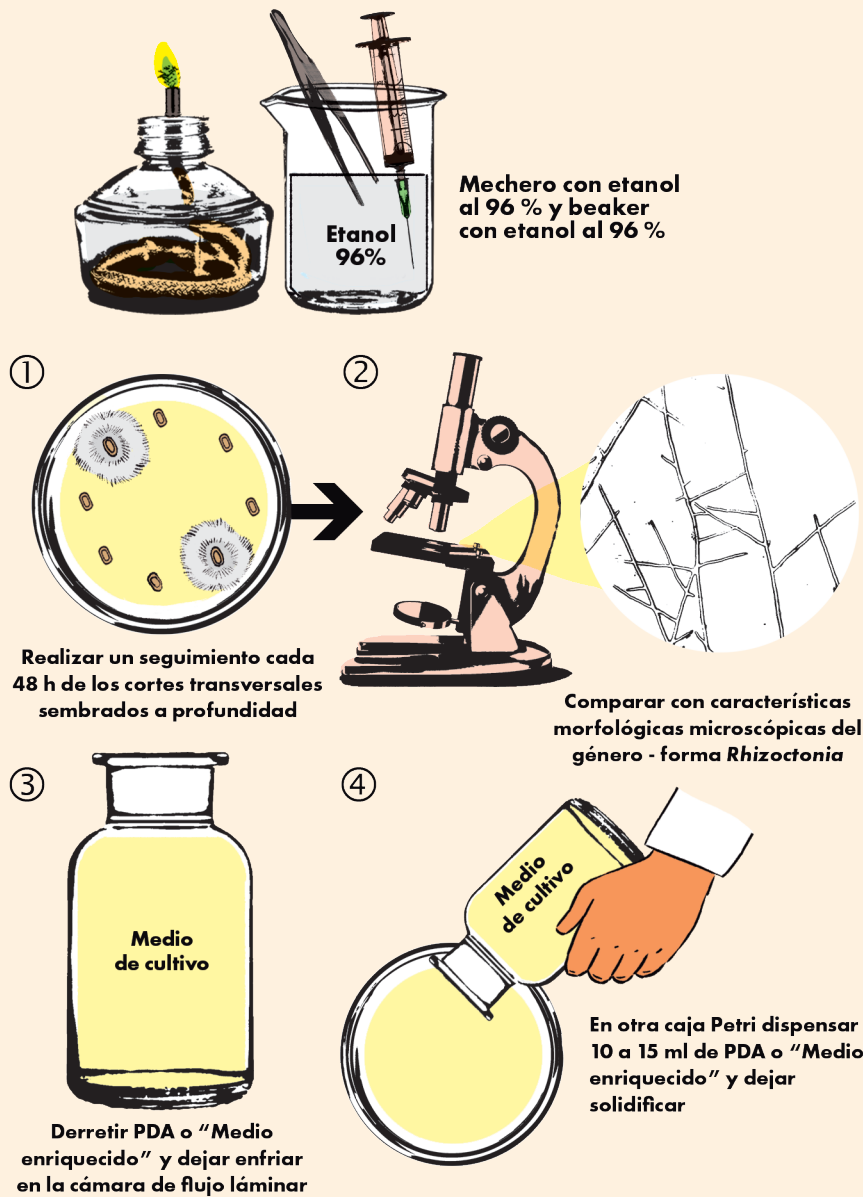


1.4 Obtención en Cultivos Puros de los Posibles Hongos Micorrízicos

Este procedimiento tiene como objetivo obtener cultivos puros de hongos con características del género-forma *Rhizoctonia*, al ser estos los más comunes, reportados como micorrízicos de orquídeas. Dichos hongos se obtienen a partir de los cultivos mixtos del procedimiento anterior.

1.4.1 Materiales

- Cajas Petri con cultivos mixtos de microorganismos del paso anterior.
- Cajas Petri plásticas pequeñas (5,5 cm x 1,5 cm).
- Medio agar de dextrosa y papa acidulado (PDAa) / medio con vitaminas y minerales (MVM) (Anexo 5.2.4 y 5.2.5).
- Pinzas de disección y aguja de inoculación (hipodérmica) de 4 cm de largo, estériles.
- Cristapel o papel film de plástico (5 cm de ancho).
- Microscopio de luz con objetivos de aumento a 4 X y 10 X.
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %.



Matriz de Excel Datos de los aislamientos

	A	B	C	D	E	F
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						

Figura 19. Resumen, paso a paso, de la obtención de cultivos puros de los posibles HMO

1.4.2 Procedimiento

1. Cada 48 h se realiza un seguimiento de los cortes transversales sembrados en profundidad. Para ello se efectúa la observación al microscopio de luz por el reverso de la caja Petri, a una magnificación de 4 X. Se realiza la identificación morfológica de los crecimientos fúngicos a partir de los cortes transversales. Se recomienda comparar características morfológicas microscópicas según lo propuesto por Sneh et al. (1991) y Agrios (2002) para el género-forma *Rhizoctonia*.
2. Las características asociadas al género-forma *Rhizoctonia* son: crecimiento esbelto de hifas (Figura 20A y B), conformación de ángulos rectos a partir de una hifa principal y una secundaria que se bifurca (Figura 21A), además de la presencia de un septo cerca de la constricción sobre la hifa secundaria (Figura 21B). Es posible que el hongo produzca células monilioides (ramilletes de células cortas y anchas, de forma oval o triangular) (Figura 22). Adicionalmente, es importante mencionar que algunas características morfológicas microscópicas no se observarán claramente hasta realizar microcultivo (por ejemplo, Figura 21 A y B).
3. Se derrite el medio PDAa / MVM en el microondas y se deja enfriar en la cámara de flujo laminar (ver sección 1.3, paso 1 del procedimiento).
4. En la cámara de flujo laminar se dispensan entre 10 a 15 mL de medio de cultivo artificial en las cajas Petri pequeñas (5,5 cm x 1,5 cm) a utilizar. Las cajas Petri se tapan parcialmente cerca del mechero, de tal manera que la tapa cubra la tercera parte de la base de la caja. Las cajas Petri se dejan de la forma descrita, hasta que el medio solidifique.

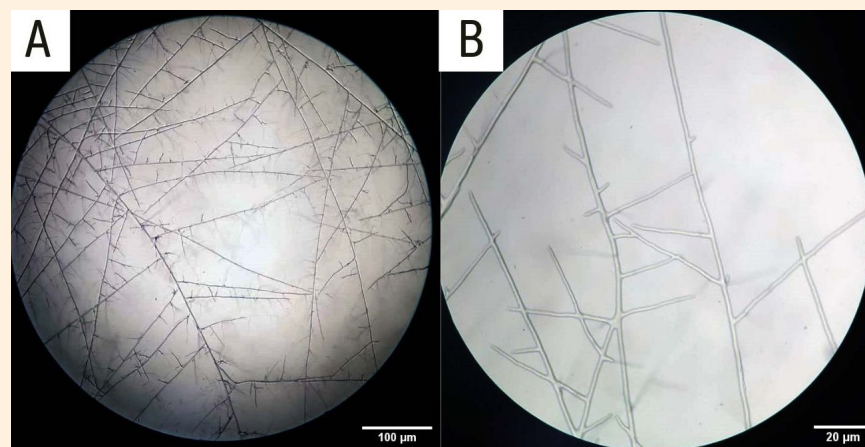


Figura 20. Crecimiento hifal esbelto del hongo del género-forma *Rhizoctonia* en cultivo puro. A. Crecimiento de hifas con márgenes continuos del género-forma *Rhizoctonia* a 10 X. B. Crecimiento de hifa principal y secundaria, formando ángulo recto, del género-forma *Rhizoctonia* a 40 X

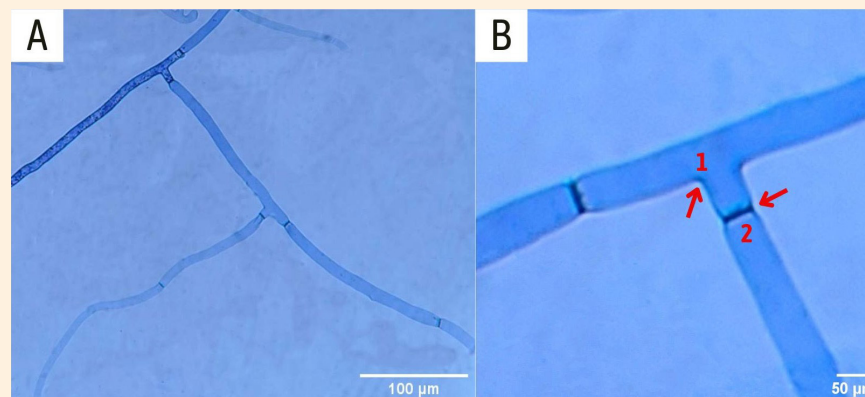


Figura 21. Crecimiento hifal esbelto de hongo del género-forma *Rhizoctonia*, visto a partir de laminillas de microcultivo con tinción de azul de metileno. A. Crecimiento hifal esbelto de hongo del género-forma *Rhizoctonia* a 10 X. B. Crecimiento hifal de hongo del género-forma *Rhizoctonia* a 40 X. 1. Zona de bifurcación de la hifa principal a la secundaria. 2. Septo cerca de la constricción

5. Utilizando una aguja de inoculación estéril se toma inóculo del hongo que es de interés para purificar. El inóculo consiste en un fragmento de medio PDAa / MVM 0,5 cm² con hifa(s) del hongo previamente vistas al microscopio. Se coloca el inóculo sobre el medio sólido en la nueva caja Petri pequeña, de tal manera que el inóculo haga contacto con el nuevo medio de cultivo PDAa / MVM. Esta operación se realiza para tener la seguridad de que las hifas del hongo de interés crezcan en la superficie del medio y, por tanto, se facilite realizar los posteriores procedimientos para su identificación morfológica y molecular.
6. Las cajas se sellan con cristapel y se etiquetan con el código y fecha correspondiente en la tapa de la caja Petri. Se incuban a 25 °C, en la oscuridad y boca abajo. Esto último para ralentizar el crecimiento del hongo.
7. Se debe realizar seguimiento de cada hongo que se aísla en cultivo puro, haciendo observaciones máximo 48 h después, ya que pueden existir contaminantes y perderse la oportunidad de aislar el posible HMO.
8. Se recomienda llevar una matriz de Excel que incluya los campos: código de la planta de la que se tomó las porciones de raíz, número de raíz, código de la caja Petri de siembra, código del hongo, fecha de siembra de los cortes transversales de las raíces, fecha de cultivo puro, fecha de microcultivo, descripción detallada de las características macroscópicas y microscópicas de los hongos, velocidad de crecimiento de los hongos y una referencia al número de fotografías o, según sea el caso, a la carpeta de fotografías correspondiente (Anexo 5.3.1.).

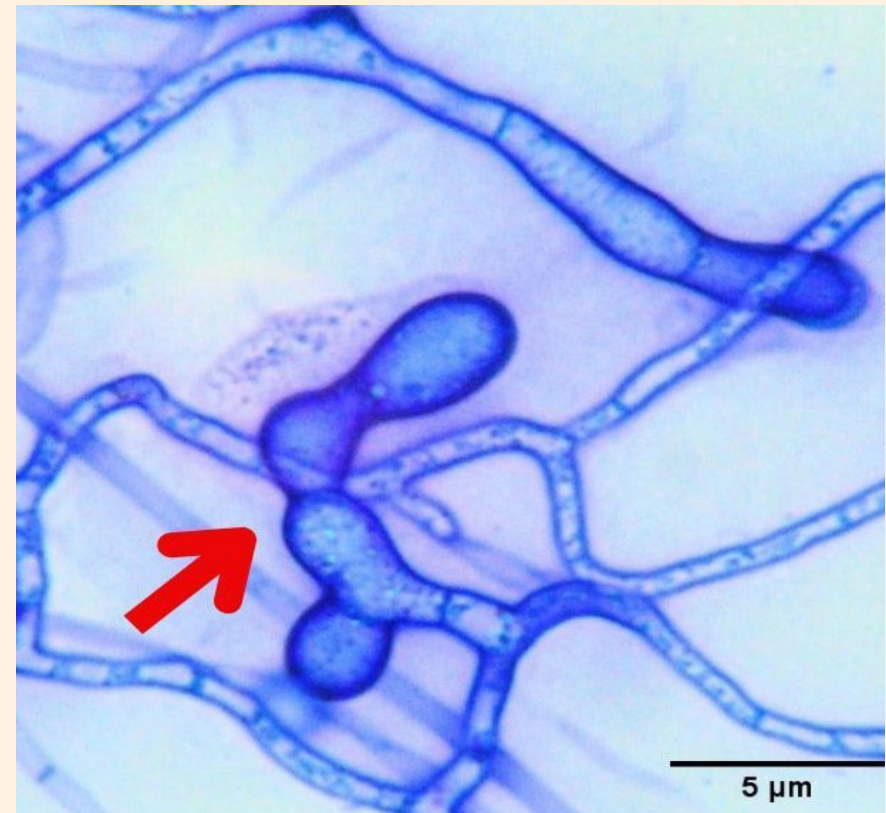


Figura 22. Células monilioides de hongo del género-forma *Rhizoctonia* a 100 X, vistas a partir de laminillas de microcultivo con tinción de azul de metileno

1.5 Preparación de Microcultivos para la Caracterización Morfológica

El microcultivo es un procedimiento que permite la observación de las estructuras microscópicas de los hongos filamentosos. Por tanto, este procedimiento tiene como objetivo obtener microcultivos para observar en detalle las características morfológicas microscópicas de los hongos en cultivo puro. Estas características se comparan con las del género-forma *Rhizoctonia*, según claves taxonómicas.

1.5.1 Materiales

- Caja Petri con cultivo puro del hongo de interés.
- Cajas Petri con material estéril para montaje de microcultivo (caja Petri grande de vidrio [10 cm x 1,5 cm], papel absorbente estéril, un portaobjeto y dos cubreobjetos).
- Caja Petri plástica pequeña (5,5 cm x 1,5 cm).
- Agua destilada estéril (ADE).
- Medio agar de dextrosa y papa acidulado (PDAa) / medio con vitaminas y minerales (MVM) (Anexo 5.2.4 y 5.2.5)
- Pinzas de disección y aguja de inoculación (hipodérmica) de 4 cm de largo, estériles.
- Cristapel o papel film de plástico (5 cm de ancho).
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %.

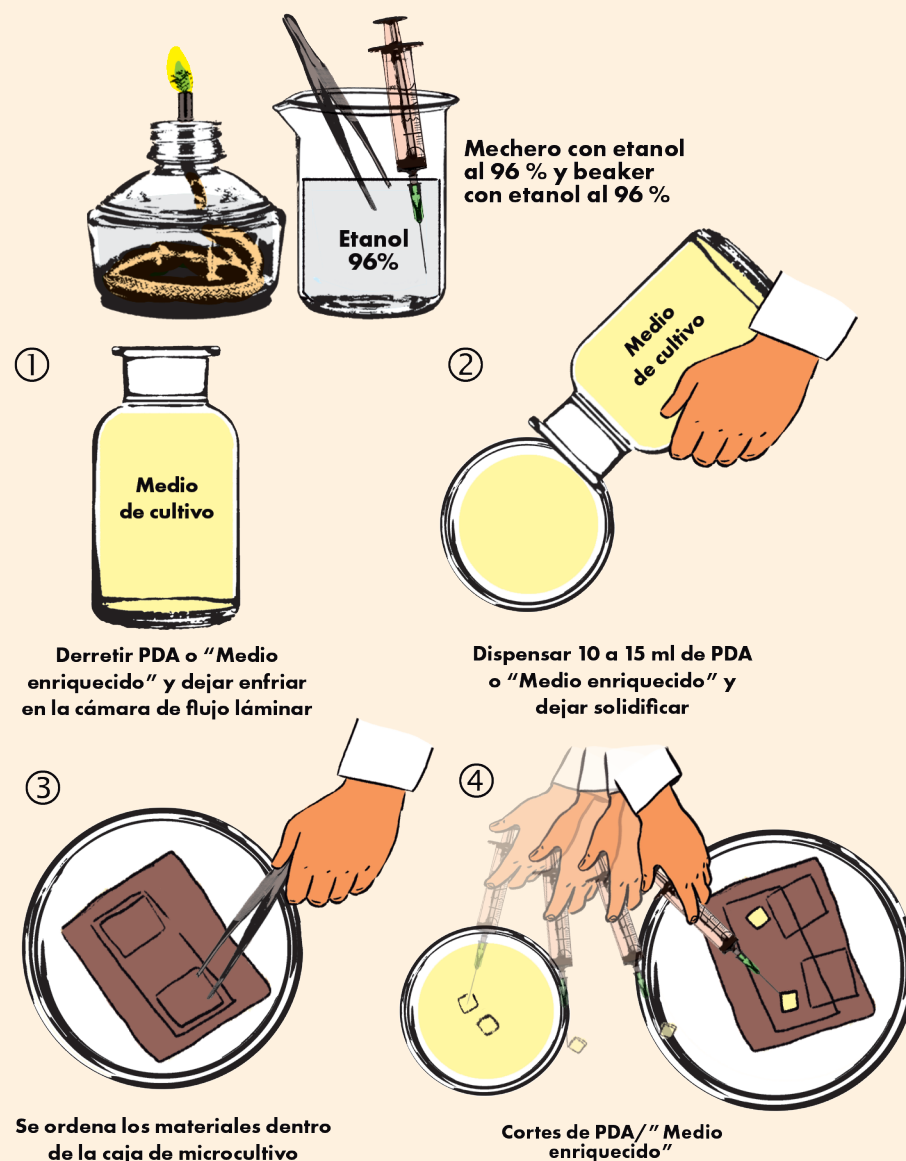


Figura 23. Resumen del paso a paso de la preparación de microcultivos para la caracterización morfológica microscópica de hongos aislados en cultivo puro

1.5.2 Procedimiento

1. Se derrite el medio PDAA / MVM (ver sección 1.3, paso 1 del procedimiento).
2. En la cámara de flujo laminar se dispensan entre 10 a 15 mL de medio en una caja Petri plástica pequeña (5,5 cm x 1,5 cm) y se dejan solidificar cerca del mechero.
3. Utilizando pinzas de disección estériles, dentro de la caja Petri con material estéril para microcultivo se coloca el portaobjeto sobre el papel absorbente estéril y se ubican los cubreobjetos encima de los bordes del portaobjeto, para facilitar su manipulación en el montaje.
4. Se toma la caja Petri pequeña con el medio sólido y con la aguja de inoculación estéril se realizan cortes, con el fin de obtener dos cuadrados del medio solidificado, de aproximadamente 1 cm². Estos cortes se transfieren usando la misma aguja de inoculación estéril, o con ayuda de las pinzas de disección, a los extremos del portaobjeto que está dispuesto en la base de la caja Petri grande de vidrio.
5. Utilizando la aguja de inoculación estéril se corta una porción de inóculo de 0,5 cm² del crecimiento del hongo de interés y se coloca sobre el trozo de medio de cultivo que se indicó previamente, de tal manera que la superficie del inóculo quede en contacto con el medio de cultivo.
6. Se coloca cada cubreobjeto sobre el inóculo dispuesto en cada extremo del portaobjeto. Luego se humedece el papel absorbente estéril con aproximadamente 30 mL de ADE. Las cajas Petri con el montaje de microcultivo se sellan con cristapel, se incuban a 25 °C en la oscuridad (al ambiente o en incubadora) (Figura 24) y se espera entre 5 a 8 días para realizar observaciones del crecimiento de hifas al microscopio.

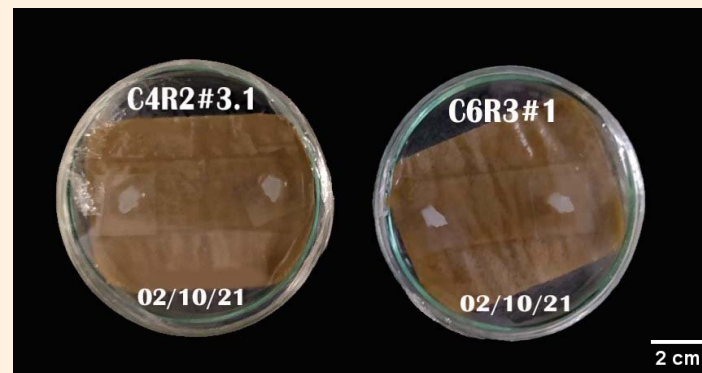
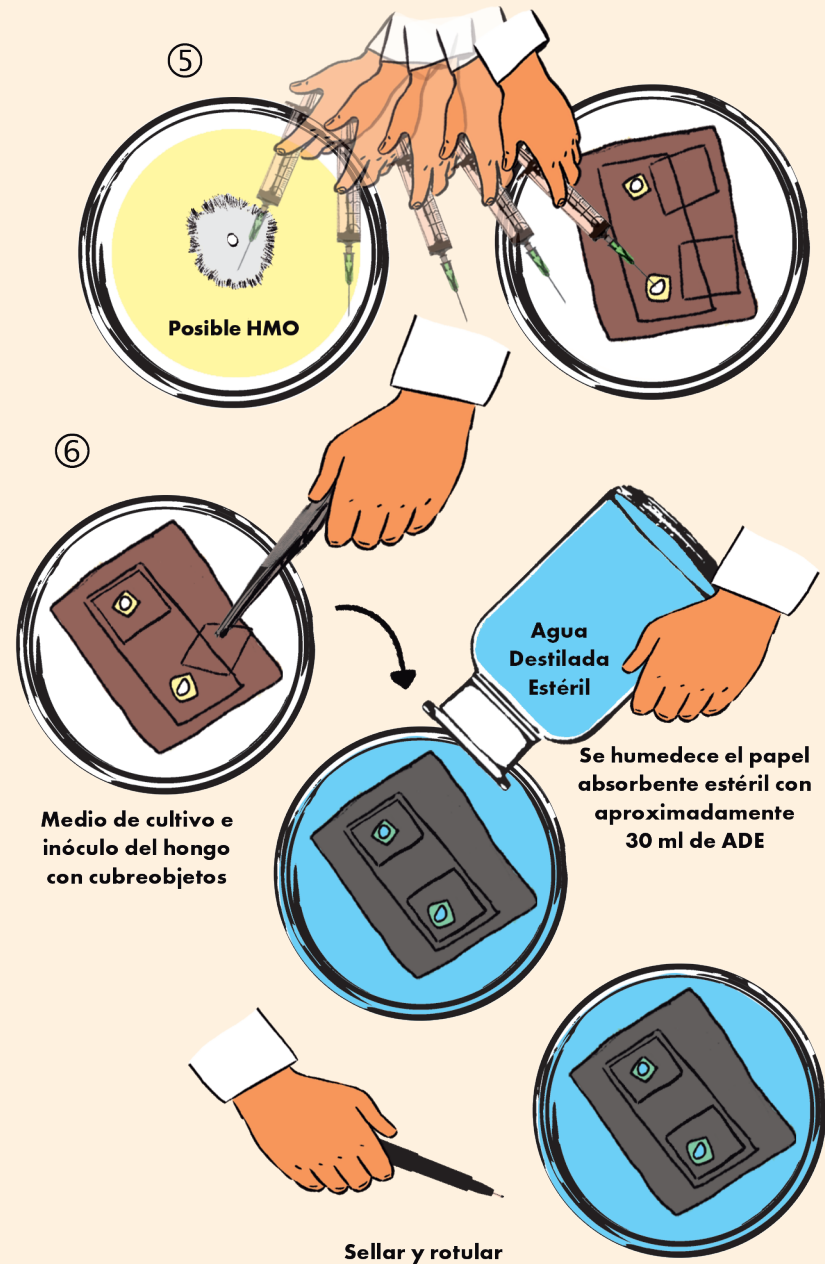


Figura 24. Montajes de microcultivos de los hongos aislados en cultivo puro

1.6 Observación del Crecimiento de Posibles Hongos Micorrízicos en Microcultivos al Microscopio de Luz

Este procedimiento tiene como objetivo revisar las laminillas de los microcultivos montados, para realizar la caracterización morfológica de los hongos en cultivo puro al microscopio de luz.

Nota: cuando hayan transcurrido entre cinco a ocho días después de montar los microcultivos, se realiza la respectiva observación solo de un cubreobjeto. Debe existir crecimiento de hifas sobre el cubreobjeto para determinar si se cumplen las características morfológicas de posibles HMO. De tener datos negativos se espera de ocho a diez días adicionales para hacer la observación del otro cubreobjeto. Se hace de esta manera para darle tiempo al hongo de crecer y desarrollar las estructuras de reproducción.

1.6.1 Materiales

- Caja Petri con montaje de microcultivo.
- Portaobjetos nuevos y previamente limpiados con etanol al 96 %, usando un trozo de gasa estéril.
- Papel absorbente.
- Pinzas de disección estériles.
- Azul de metileno.
- Microscopio de luz con objetivos de aumento a 4 X, 10 X, 40 X y 100 X.
- Aceite de inmersión para el uso del lente 100 X.
- Papel de arroz para limpiar el aceite de inmersión del lente 100 X.
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %.

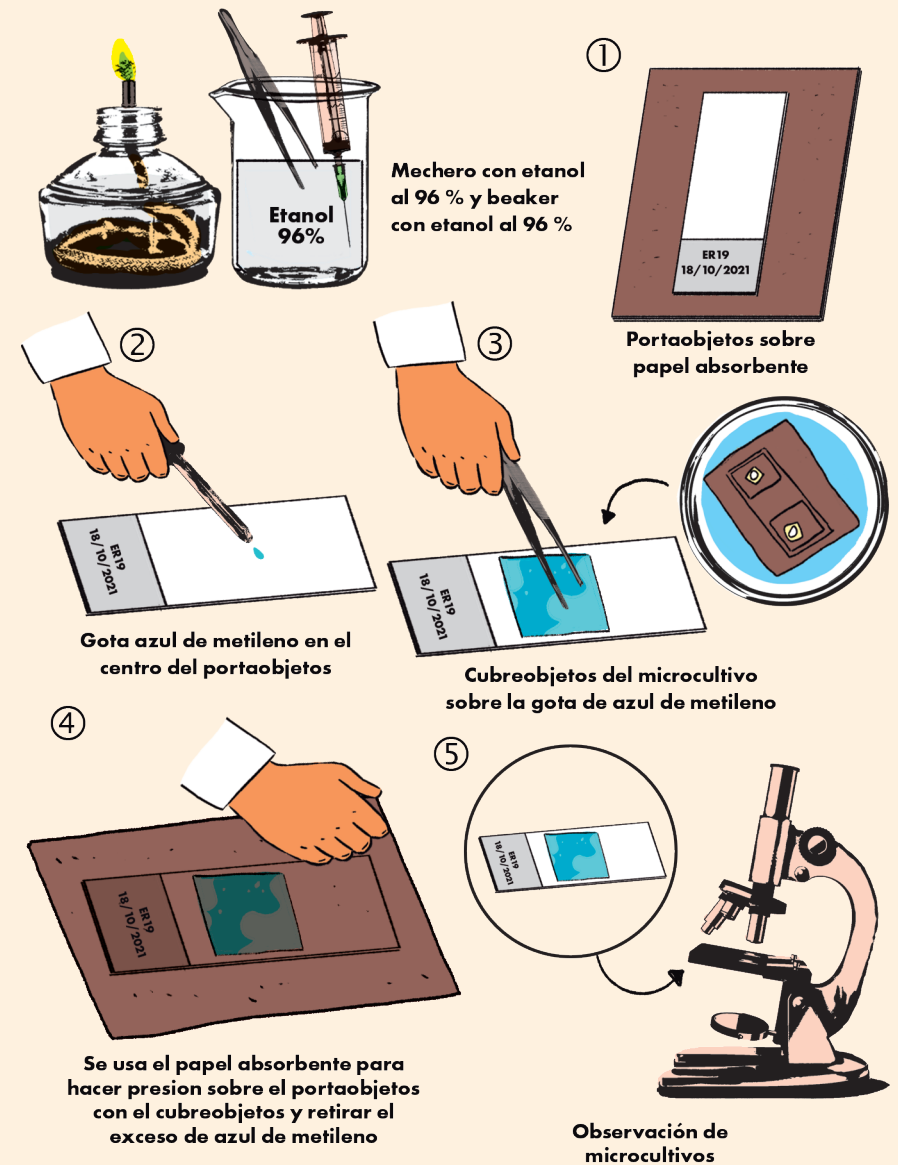


Figura 25. Resumen, paso a paso, de la observación al microscopio de luz del crecimiento micelial en microcultivos de hongos aislados en cultivo puro

1.6.2 Procedimiento

1. En la cámara de flujo laminar se coloca un portaobjeto limpio, previamente etiquetado, sobre una hoja de papel absorbente. Se debe evitar en lo posible tocar los portaobjetos con las manos, para no tener distractores, como huellas digitales, durante la observación de la laminilla al microscopio.
2. Se coloca una pequeña gota de azul de metileno en el centro del portaobjeto.
3. Con las pinzas de disección estériles se toma el cubreobjeto de uno de los dos puntos de montaje de la caja de microcultivo, el cual ha estado en contacto con el hongo de interés inoculado. Con mucho cuidado se coloca la parte que estuvo en contacto con el medio PDAa / MVM sobre la gota de azul de metileno.
4. Se usa papel absorbente para quitar el exceso de azul de metileno y limpiar la humedad del cubreobjeto. Para ello se dispone el papel absorbente sobre el cubreobjeto y se realiza una pequeña presión sobre este.
5. Se observan al microscopio las laminillas (Figura 26) en los objetivos de 4 X, 10 X, 40 X y 100 X y se realiza la identificación morfológica siguiendo las características macroscópicas de colonia y microscópicas de organización hifal, propuestas por Sneh et al. (1991) y Agrios (2002) para el género-forma *Rhizoctonia* (Figuras 21 A y B). Se toman apuntes de las características microscópicas observadas (ver sección 1.4, paso 2 del procedimiento), e igualmente se realizan fotografías para complementar la información.

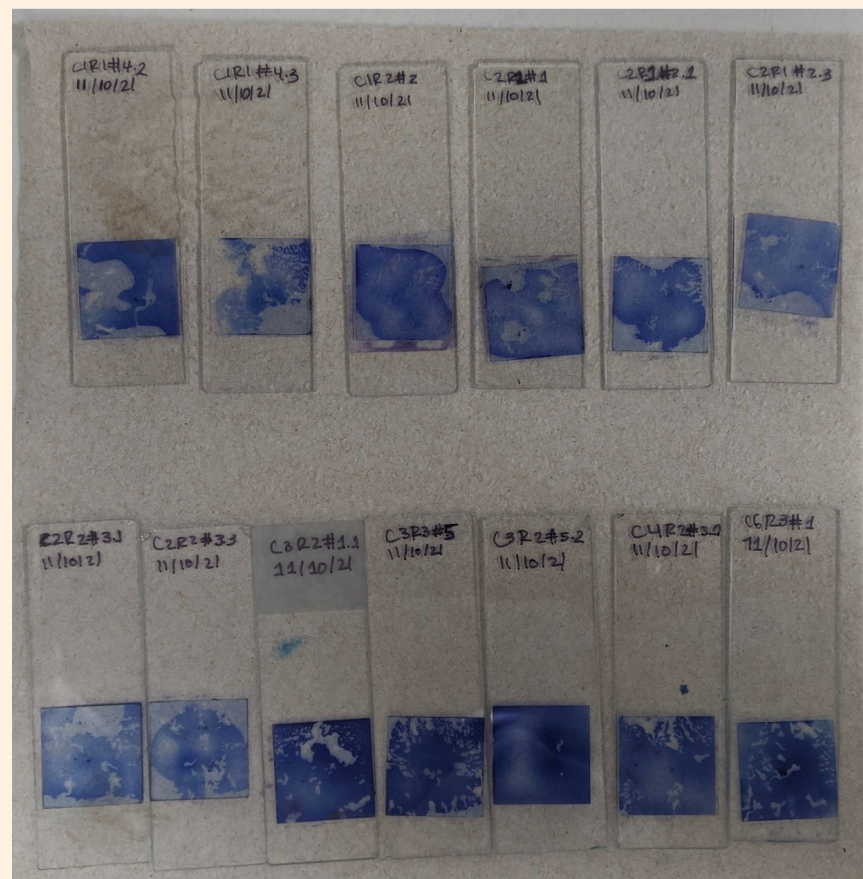
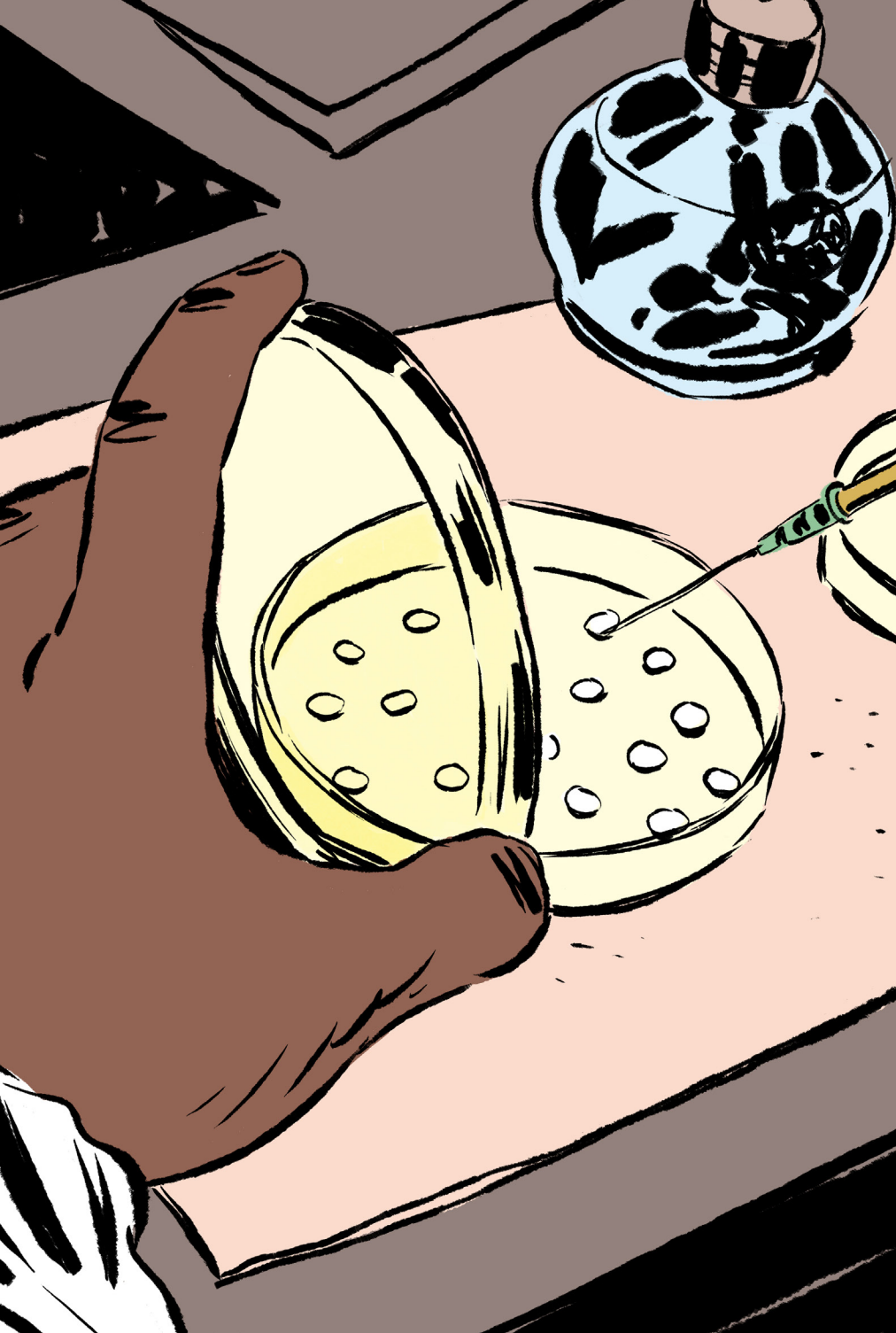


Figura 26. Laminillas de microcultivos para describir características microscópicas de hongos aislados en cultivo puro



1.7 Conservación *ex situ* de Posibles Hongos Micorrízicos Orquidioides

Basado en metodología propuesta por Castellanos *et al.* (2011), con modificaciones.

Este procedimiento tiene como objetivo preservar en condiciones *ex situ* los hongos aislados con características morfológicas del género-forma *Rhizoctonia*, para luego evaluar su función y aplicación en programas de manejo de especies de orquídeas.

Nota: este procedimiento se debe hacer de manera simultánea al protocolo 2.1. Para ello se utiliza el mismo inóculo que proviene de la repetición del hongo de interés usado en este procedimiento. Lo anterior permite asegurar que la información obtenida posteriormente en la identificación molecular coincida con los posibles HMO que se reactiven para ser usados en experimentos de germinación simbiótica.

1.7.1 Materiales

- Caja Petri inoculada con cultivo de hongo de interés.
- Discos de papel filtro estériles de diámetro 0,5 cm, con apertura de poro de 8 a 10 μm (Anexo 5.1.2).
- Papel aluminio.
- Cajas Petri de vidrio estériles (10 cm x 1,5 cm).
- Sobres de papel mantequilla (Anexos 5.1.3; Esquemas 5.3.2 y 5.3.3).
- Bolsas plásticas de cierre hermético.
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %

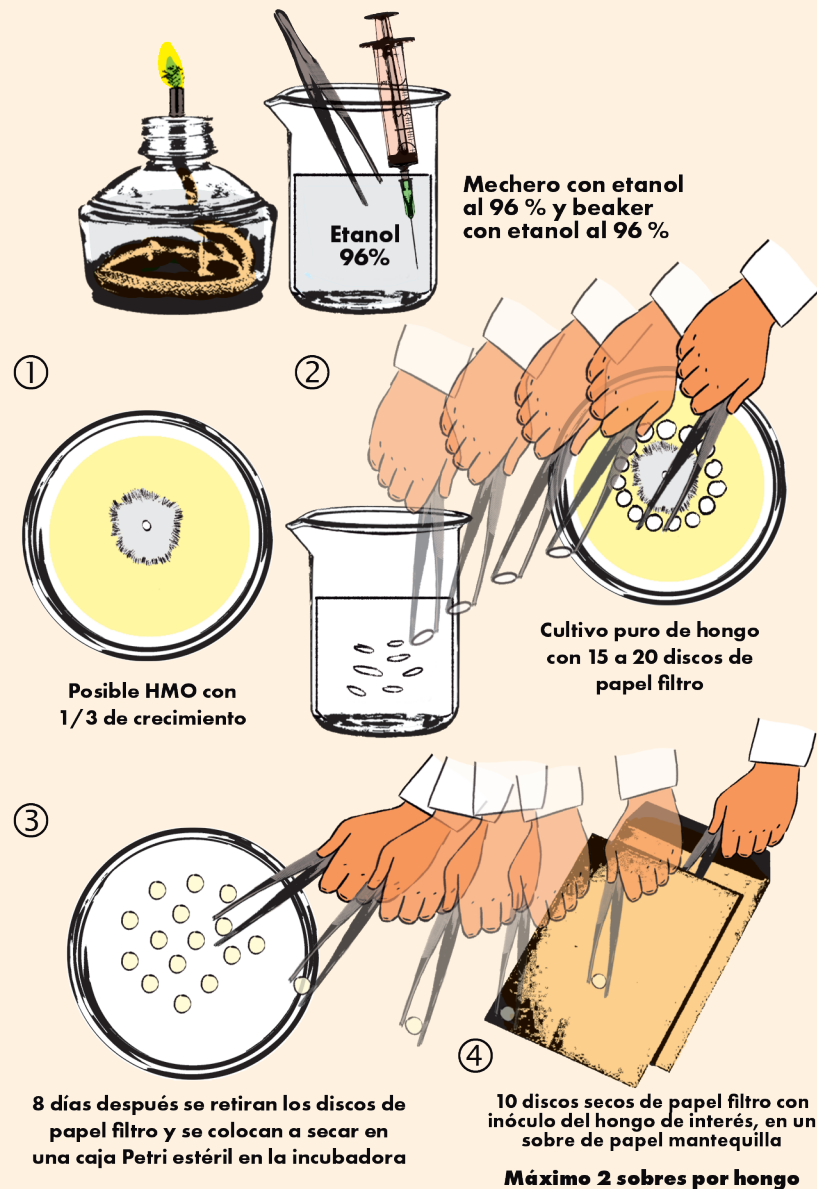


Figura 27. Resumen, paso a paso, de la conservación *ex situ* en papel filtro de posibles HMO

1.7.2 Procedimiento

1. En la cámara de flujo laminar, a partir del cultivo puro obtenido de cada hongo en la sección 1.4 y verificado por sus características morfológicas como perteneciente al género-forma *Rhizoctonia*, se realizan dos repeticiones del hongo de interés en dos nuevas cajas Petri. Cabe aclarar que solo se utilizará una de ellas tanto para la conservación *ex situ* como para el crecimiento en medio líquido, con el fin de tener un respaldo si el hongo se llega a contaminar. Cada hongo se deja crecer hasta que cubre 1 / 3 de la caja Petri (generalmente ocurre entre ocho a diez días, pero depende de la velocidad de crecimiento de cada hongo).
2. Luego de pasar los ocho a diez días, se disponen aproximadamente 20 discos de papel filtro rodeando el micelio y se dejan crecer entre ocho a diez días más, para que el micelio se desarrolle sobre los discos de papel (Figura 28).



Figura 28. Discos de papel filtro rodeando el micelio del hongo de interés

3. Pasado este tiempo se retiran los discos de papel con micelio (Figura 29) y se colocan dispersos en la base de la caja Petri de vidrio estéril (Figura 30). Este procedimiento se realiza de forma individual para cada hongo de interés. Las cajas Petri se aseguran con cristapel y se llevan a la incubadora a una temperatura de 25 °C durante un máximo diez días, para que los círculos de papel se sequen con el inóculo presente.
4. Transcurrido el tiempo indicado se guardan diez discos secos de papel filtro con inóculo en un sobre de papel mantequilla, así se tendrá un total de dos sobres por hongo. Estos sobres, a su vez, se guardan en otro sobre de papel mantequilla de mayor tamaño. Cada sobre individual se rotula con lápiz, al igual que el sobre grande que contienen los cuatro sobres pequeños. Este último sobre se envuelve en papel aluminio. Se pueden agrupar hasta cinco sobres que contienen muestras diferentes, cada uno envuelto en papel aluminio para generar un conjunto que vaya en la bolsa plástica de cierre hermético con su correspondiente rotulación, y se preservan a -20 °C. El periodo de tiempo que los hongos pueden permanecer en estas condiciones sin deterioro varía según cada cepa de hongo.



Figura 29. Retiro de discos de papel filtro con micelio

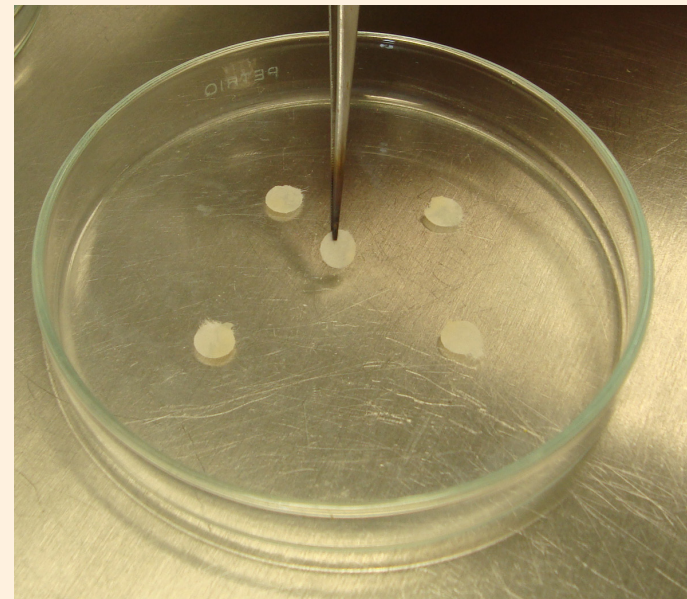


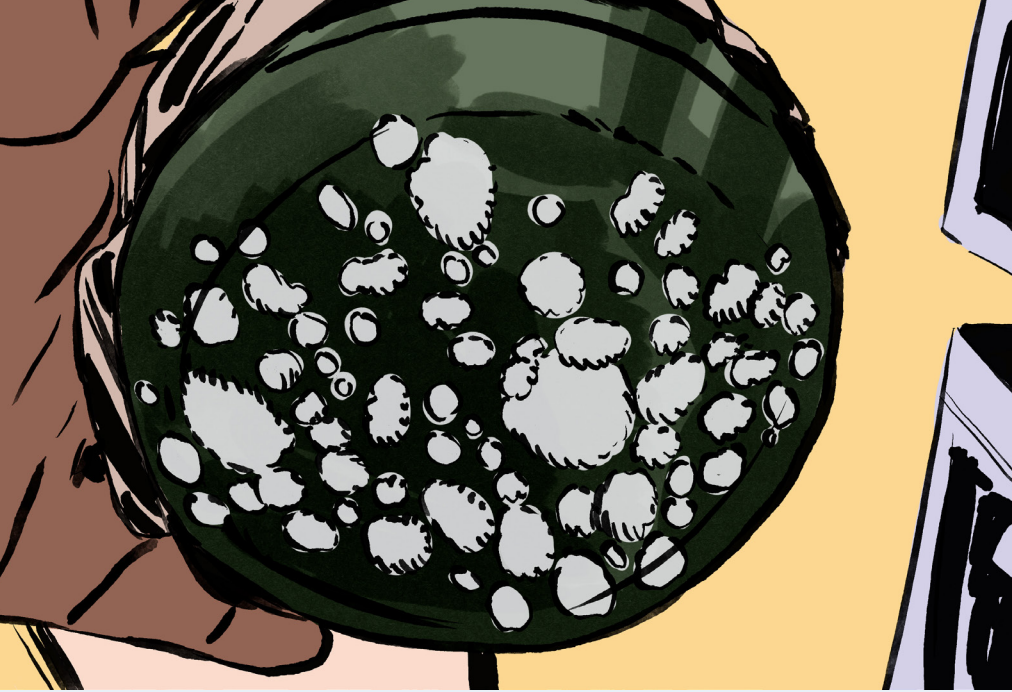
Figura 30. Discos de papel filtro dispersos en la base de la caja Petri de vidrio estéril, para su secado

2 Identificación Molecular de Hongos Micorrízicos Orquidioides

La región conocida como el espaciador transcrito interno (ITS) consiste en dos regiones no-codificantes (ITS-1 e ITS-2) que separan los genes del ARN ribosomal (ARNr). Estos genes son conocidos como 18 S, 5,8 S y 28 S. Las regiones ITS-1 e ITS-2 están separadas por el gen 5.8S ARNr. La región ITS está delimitada por el gen 18S ARNr en el extremo 5' del espaciador ITS-1 y el gen 28 S ARNr en el 3' del espaciador ITS-2. El gen 18 S codifica para el ARNr que hace parte de la subunidad pequeña (SSU), y 5,8 S y 28 S codifican para los ARNr que forman parte de la subunidad grande (LSU) del ribosoma. La región ITS tiene un largo entre 260 y 1 794 pares de bases (pb), con una longitud media de 517 pb (Yang et al., 2018). Por su nivel de variación genética, esta región tiene una alta probabilidad de identificación correcta (PCI) para una gran cantidad de linajes fúngicos y una brecha de código de barras claramente definida. Por esta razón, la región ITS es aceptada como el marcador de código de barras de la vida estándar para la identificación molecular de hongos (Schoch et al., 2012).

Recomendaciones Generales para el Trabajo de Biología Molecular

- ✓ Se deben seguir los protocolos de bioseguridad requeridos. Durante estos procedimientos es preciso utilizar bata de laboratorio, guantes y gafas de seguridad.
- ✓ Se deben cambiar los guantes en caso de que toquen directamente el material genético o los reactivos, y puedan provocar contaminación en el procedimiento.
- ✓ Los materiales que se utilicen en cada procedimiento deben ser previamente esterilizados en autoclave y los elementos que se usen continuamente, como las pinzas de disección o la aguja hipodérmica, se deben esterilizar en la cámara de flujo laminar, sumergiéndolos en un vaso de precipitado con etanol al 96 % y flameándolos en un mechero con este compuesto a la misma concentración. Se proporcionan detalles para preparación de los reactivos y materiales de cada procedimiento en el Anexo.
- ✓ Los productos de cada metodología deben ser etiquetados con la identidad y fecha correspondiente, usando rotuladores indelebles (marca: Sharpie).



2.1 Crecimiento en Medio Líquido

Este procedimiento tiene como objetivo obtener tejido de los hongos con características morfológicas del género-forma *Rhizoctonia*, para realizar su identificación molecular.

2.1.1 Materiales

- Caja Petri con cultivo puro del hongo de interés.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Plancha de agitación.
- Frascos boca ancha o Erlenmeyer (50 mL) con 20 mL de medio caldo papa dextrosa (CPD) estériles (uno por cada hongo de interés (Anexo 5.2.6).
- Agua destilada (AD) (Anexo 5.1.8).
- Cristapel o papel film de plástico (5 cm de largo).
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %.

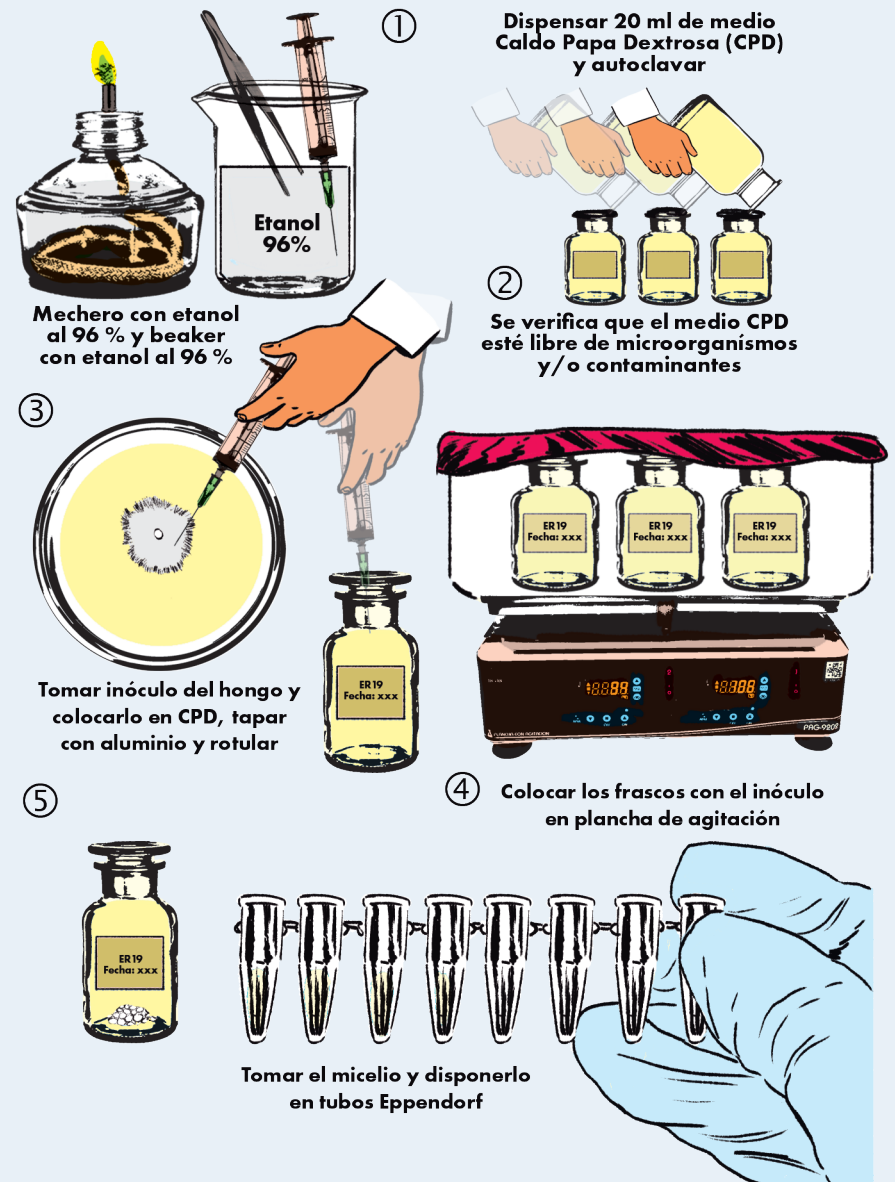


Figura 31. Resumen, paso a paso, del crecimiento en medio líquido de posibles hongos micorrízicos orquidioides, para la extracción de ADN e identificación molecular

2.1.2 Procedimiento

1. Se prepara el volumen de medio líquido caldo papa dextrosa (CPD) requerido según el número de hongos de interés a identificar. Se disponen 20 mL en cada frasco boca ancha o Erlenmeyer, se hace un tapón con doble lámina de papel aluminio y el material se lleva a autoclavar.
2. Antes de iniciar el proceso se debe verificar que el medio líquido CPD no tenga crecimiento de microorganismos y / o contaminantes y que esté a temperatura ambiente en el momento de inocular los hongos de interés. Para este procedimiento y la conservación *ex situ* de los hongos se usará una de las dos repeticiones de cultivo puro de los hongos de interés (ver sección 1.7, paso 1 del procedimiento).
3. En la cámara de flujo laminar se destapa un frasco boca ancha o Erlenmeyer y se añaden al medio líquido tres porciones de inóculo de 0,5 cm² del hongo de interés. Cada frasco boca ancha o Erlenmeyer se tapa de nuevo, se sella con cristapapel y se colocan los códigos respectivos.
4. Estos frascos se disponen en la plancha de agitación y se cubren con una tela de franela, papel aluminio o papel *Kraft*, para generar oscuridad e impedir que llegue polvo con ácaros. Se incuban a una temperatura de entre 25 °C a 28 °C durante un periodo de diez a quince días, con agitación continua a 40 rpm (Figura 32). Se debe tener en cuenta que algunos hongos tienen un crecimiento lento, razón por la cual es necesario hacer observaciones periódicas y determinar si se requiere extender el periodo para que crezcan en medio líquido.

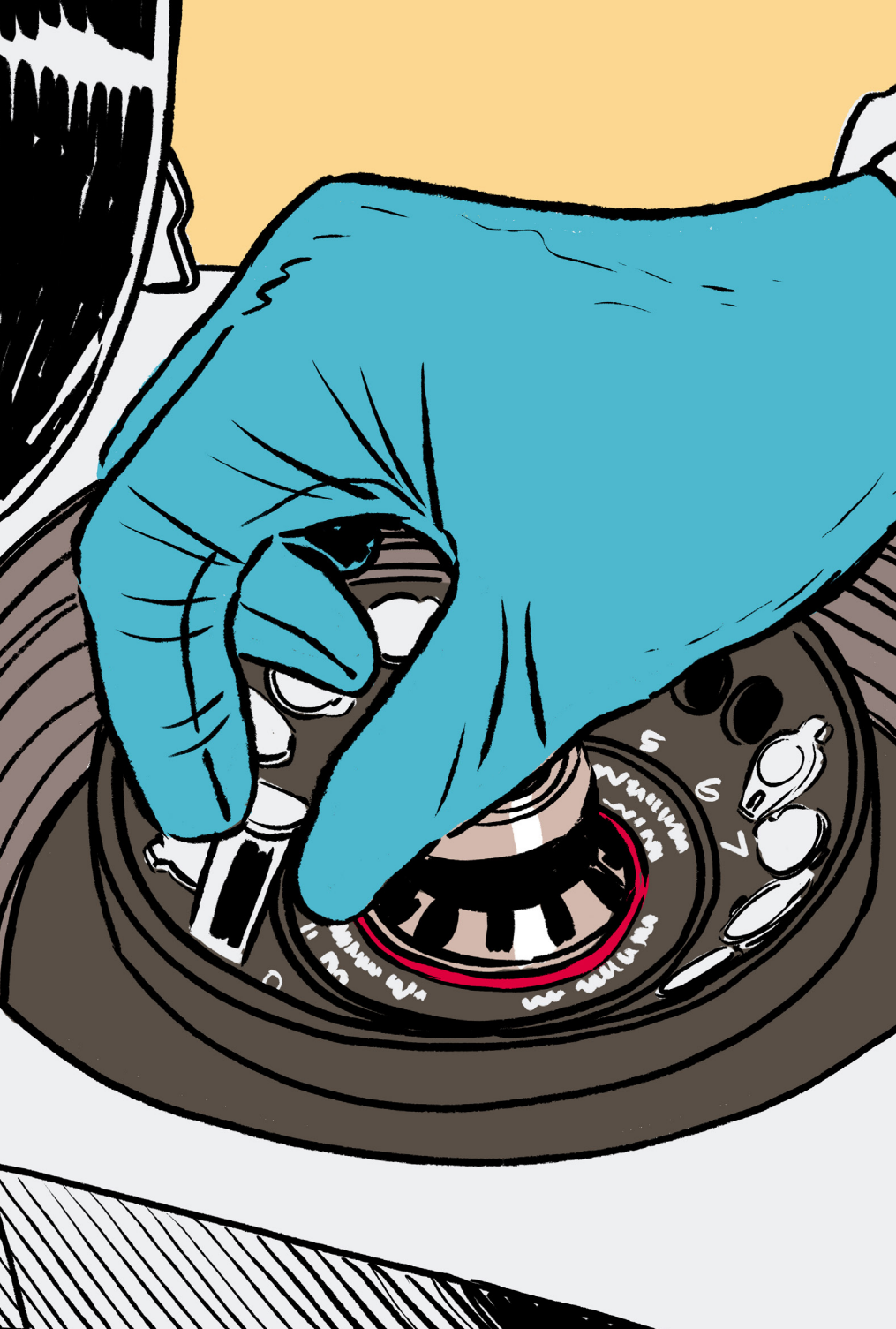


Figura 32. Frascos boca ancha o Erlenmeyer en la plancha de agitación o shaker, para crecimiento micelial



Figura 33. Micelio de los hongos de interés en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, para extracción de ADN

5. Cuando el micelio ha crecido a un volumen mayor a $1,5 \text{ cm}^3$, trabajando en la cabina de flujo laminar se dispone un volumen de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^3$ de micelio en tubos de microcentrífuga estériles de 1,5 mL (Figura 33) y se almacena a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, hasta empezar los procedimientos moleculares (tiempo no mayor a los cinco meses). Se recomienda no superar el volumen de $0,5 \text{ cm}^3$ en cada tubo de microcentrífuga, ya que esto es la cantidad estandarizada para la correcta extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) y posteriores análisis moleculares. En lo posible se sugiere realizar varias repeticiones de micelio en tubos de microcentrífuga individuales, para usar un tubo por extracción de ADN, ya que al descongelar el micelio empieza a degradarse.



2.2 Extracción de ADN

Basado en la metodología propuesta por White *et al.* (1990); Mahuku (2004), con modificaciones.

Con este protocolo se puede obtener de forma económica ADN de los posibles HMO, para realizar su identificación molecular a partir de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación tipo Sanger. Alternativamente, se puede utilizar un kit comercial para extracción de ADN a partir de tejido del micelio.

2.2.1 Materiales

- 0,5 cm³ de micelio fúngico congelado (- 80 °C).
- Tubos estériles de microcentrifuga de 1,5 mL.
- Gradillas para tubos de microcentrifuga 1,5 mL.
- Gradillas flotador para tubos de 1,5 mL.
- Pinzas de disección / espátula pequeña estériles.
- Morteros estériles.
- Arena lavada con ácido, esterilizada.
- Juego de micropipetas (1000, 200 y 20 µL).
- Puntas para micropipetas de 1000, 200 / 20 µL estériles.
- Baño maría a 65 °C.
- Agitador vortex.
- Microcentrifuga.
- Espectrofotómetro *NanoDrop* (Thermo Scientific).
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %.

2.2.2 Soluciones estériles

- Tampón de dodecilsulfato sódico (hidroximetil aminometano-ácido clorhídrico (Tris-HCl 200 mM) [pH 8,0], ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM [pH 8,0], cloruro de sodio (NaCl) 500 mM, SDS al 1 %) (Anexo 5.2.7).
- Proteinasa K (PK) (20 mg / mL).

- Acetato de amonio 7,5 M (Anexo 5.2.8).
- Cloruro de sodio 5 M (Anexo 5.2.9).
- Isopropanol al 100 %, previamente enfriado en la nevera.
- Etanol al 70 %, previamente enfriado en la nevera (Anexo 5.2.2).
- TE 1 X (Tris-HCl 10 mM [pH 8,0], EDTA 1 mM [pH 8,0]) (Anexo 5.2.10).

2.2.3 Procedimiento

1. Se etiqueta la tapa de los tubos de microcentrífuga de 1,5 mL con el código respectivo y se agrega a cada tubo una pequeña pizca de arena esterilizada (< 2 g en una espátula pequeña).
2. Se prepara la mezcla maestra (MM) agregando 5 μ L de PK a 100 μ L de tampón de extracción Dodecilsulfato sódico (SDS) por cada muestra (por ejemplo, 10 muestras = 50 μ L PK + 1000 μ L de tampón SDS), logrando una concentración final de 1 mg / mL de PK. Se agita en vortex durante 15 s, evitando que se forme espuma, y se agrega 100 μ L del tampón de extracción SDS + PK a cada tubo de muestra con arena.
3. Con ayuda de pinzas de disección estériles, se coloca la muestra de tejido directamente en el tubo que contenga la arena y el tampón. Se macera el tejido durante 2 min con un homogeneizador manual que se ajuste al tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
4. Se agrega 200 μ L adicionales de tampón de extracción SDS al tubo, lavando el homogeneizador a medida que se agrega el tampón. Se cierra el tubo y se agita en vortex durante 15 s.
5. Se repiten los pasos tres y cuatro para cada muestra. Se flamean las pinzas de disección con etanol al 96 % entre cada una.
6. Luego de agitar las muestras en vortex, se colocan en baño maría a 65 °C durante 30 min, usando una gradilla flotadora para viales de 1,5 mL. Se asegura que la tapa del tubo está elevada sobre el nivel del agua. Se mezclan por inversión cuatro veces, cada 8 min, durante la incubación.
7. Se centrifuga durante 15 min a 14000 rpm. Se etiqueta un nuevo conjunto de tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.
8. Con una pipeta de 1 000 μ L se transfieren 400 μ L del sobrenadante al nuevo tubo etiquetado para la misma muestra, teniendo mucho

cuidado de evitar transferir partículas. Se debe registrar el volumen final transferido.

9. Se agrega la mitad del volumen anterior de cloruro de sodio 5 M (máximo 200 μ L), completando un volumen máximo de 600 μ L, y se mezcla por inversión tres veces.
10. Se agrega un volumen igual de isopropanol al 100 %, previamente enfriado en la nevera, equivalente al volumen total del paso anterior (máximo de 600 μ L). Se mezcla la solución por inversión tres veces y se incuban los tubos a -20 °C durante 1 h.
11. Se coloca los tubos en la centrífuga con la bisagra hacia fuera. Se centrifuga durante 20 min a 14000 rpm para precipitar el ADN. Se decanta el sobrenadante por el lado opuesto a la bisagra.
12. Se lava el sedimento de ADN con 800 μ L de etanol frío al 70 %, y con la bisagra hacia afuera se centrifuga a 4000 rpm durante 5 min.
13. Se decanta el sobrenadante y durante la noche se da la vuelta a los tubos sobre toallas de papel limpias, para secar el ADN al aire.
14. Se resuspende el ADN del sedimento con 50 μ L de tampón TE 1 X (hidroximetil aminometano-Ácido clorhídrico (Tris-HCl) 10 mM [pH 8,0], ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] 1 mM). Este ADN se puede guardar a 4 °C en la nevera, si se va a utilizar dentro de las próximas horas / días, o para un almacenamiento prolongado, las muestras se guardan a -20 °C, en el refrigerador.
15. Según consideración del investigador, se realiza una electroforesis de prueba, para saber si hay ADN en la suspensión (ver sección 2.4), y se utiliza el espectrofotómetro *NanoDrop* para cuantificar el ADN. Se debe tener en cuenta que, para una reacción de PCR, se requieren entre 10 y 200 ng / μ L de ADN.

2.3 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Basado en la metodología propuesta por Mosquera-Espinosa et al. (2010). La reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) tiene como objetivo amplificar el locusARNr-ITS para los posibles HMO. Para amplificar este locus se usan los cebadores ITS-5 (amplifica en la dirección 5' a 3') e ITS-4 (amplifica en la dirección 3' a 5'), diseñados por White et al. (1990). Asimismo, se han diseñado cebadores específicos para taxones del género *Tulasnella* (Taylor y McCormick, 2008). Para este fin, Taylor y McCormick (2008) diseñaron ITS-4 Tul, un cebador con localización de anillamiento, cercano a ITS-4 (White et al., 1990) en el extremo 5' de la LSU. Este cebador coincide de forma cercana o perfecta con las secuencias de varias especies centrales del género *Tulasnella*, pero no con la mayoría de otras cepas fúngicas (Taylor y McCormick, 2008). Se recomienda ser usado con los cebadores ITS-1 o ITS-5, diseñados por White et al. (1990).

2.3.1 Materiales

- Minicentrífugas (para tubos de 1,5 mL y de 0,2 mL).
- Agitador vortex.
- Microcentrífuga.
- Muestras de ADN.
- Gradillas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL estériles.
- Gradillas para tubos de microcentrífuga 0,2 mL.
- Tubos y tapas de microcentrífuga de 0,2 mL (individuales; tiras x 8 o en placas de 96 pozos), estériles.
- Juego de micropipetas (200, 20 y 10 μ L).
- Puntas para micropipetas de 200, 20 y 10 μ L, estériles.

2.3.2 Soluciones estériles

- Agua destilada estéril, libre de nucleasas.
- 10 X PCR tampón.
- 25 mM cloruro de magnesio ($MgCl_2$).
- 2 mM desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) (concentración final y mezcla con los cuatro diferentes dNTPs).
- 2 μ M cebador I.
- 2 μ M cebador II.
- Taq 5 U / μ L.

2.3.3 Procedimiento

1. Para realizar las reacciones de PCR para varias muestras de ADN se debe preparar una mezcla maestra (MM) que contenga todos los reactivos, excepto el ADN molde. Dicha mezcla se divide posteriormente en alícuotas, para colocarlas en los tubos individuales y luego colocar el ADN. Este método de preparación de reacciones minimiza la posibilidad de errores de pipeteo y ahorra tiempo al reducir el número de transferencias de reactivos.
2. Se agita el ADN en el tubo de 1,5 mL en vortex durante 5 s y se centrifugan unos 5 s en la minicentrífuga.
3. Se determina cuántas reacciones de PCR se realizarán: el número de muestras que se están usando es igual a n. Además de cada muestra, se debe preparar una reacción para el control positivo (CTRL +) y el control negativo (CTRL -). En el CTRL + se utiliza ADN de una muestra que haya amplificado previamente, y en el CTRL - se usa agua destilada, libre de nucleasas, estéril, en lugar de ADN. De esta forma se ejecutarán n + 2 reacciones.
4. Se etiquetan con un rotulador indeleble los tubos de PCR de 0,2 mL de 1 a n + 2 muestras.
5. En la Tabla 1 se calcula el volumen total necesario para cada reactivo de la mezcla maestra (MM), hasta un total de n + 3. Debe incluir un volumen adicional para cubrir posibles errores en el pipeteo, por lo que su cálculo final es para n + 3.

Tabla 1. Tabla para calcular el volumen de reactivos para n + 3 reacciones de PCR de 50 μ L

Reactivo	Concentración final de la reacción	Volumen para 1 reacción de 50 μ L	Volumen para n + 3 reacciones (MM)
10 X PCR tampón	1X	5	
25 mM MgCl ₂	2,5 mM	5	
2 mM dNTP mix	0,2 mM	5	
2 μ M cebador I	0,2 μ M	5	
2 μ M cebador II	0,2 μ M	5	
Agua destilada estéril libre de nucleasas	-	19,5	
Taq ADN Polimerasa, 5U / μ L ADN	1 unidad por r x n -	0,5 5	

- En un tubo de 1,5 mL se prepara la MM, agregando los reactivos en el orden indicado en la Tabla 1. Se utiliza una punta de pipeta diferente para cada reactivo. Se agrega la Taq al final, utilizando puntas de micropipetas largas de 10 μ L, y se "enjuaga" la punta en la mezcla con dos movimientos hacia arriba y hacia abajo.
- Se agita en vortex la MM durante 3 s, evitando que se forme espuma, y se centrifuga 5 s en la minicentrífuga para recoger todas las gotas de las paredes del tubo.
- Se dispensan 45 μ L en cada tubo de reacción de PCR de 0,2 mL.
- Se dispensan cuidadosamente 5 μ L de ADN (0,01-1 ng / μ L de ADN: diluir si es necesario) en cada tubo de la reacción. Para ello se utilizan puntas de micropipeta diferentes por cada muestra de ADN. Las reacciones se colocan en un termociclador y se inicia el siguiente programa de PCR (Tabla 2).

Tabla 2. Programa de PCR para amplificación del locus ITS-ARNr de muestras de HMO

Pasos	Temperatura °C	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	94	2 min	1
Desnaturalización	94	45 s	
Anillamiento (ITS-4 e ITS-5) (White et al., 1990)	52	45 s	35
Anillamiento (ITS-4 Tul e ITS-5) (Taylor y McCormick, 2008)	54	45 s	
Extensión de ADN	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1
Reducción de temperatura	10	5 min	1



2.4 Electroforesis

La electroforesis tiene como objetivo separar las moléculas de ADN por tamaño, usando una corriente eléctrica. En este caso se utiliza para saber si se ha logrado extraer ADN y si el PCR ha amplificado la región específica de interés.

Nota: la electroforesis que se presenta a continuación se realiza para productos de PCR. Sin embargo, este mismo procedimiento se utiliza para conocer si se ha logrado extraer ADN genómico. En este último caso se debe utilizar un gel al 1 %, el marcador de tamaño molecular *Lambda DNA / Hind III* diluido 1 / 10, y en cada pozo se agregan 2 μL de ADN genómico al colorante respectivo.

2.4.1 Materiales

- ADN genómico (extracción ADN y producto PCR).
- Gel de agarosa al 1 % p / v (solo para extracción de ADN) y al 1,5 % p / v (PCR).
- Marcador de tamaño molecular (*Lambda DNA / Hind III* 1 / 10) (solo para extracción de ADN).
- Marcador de tamaño molecular (por ejemplo, *GeneRuler DNA Ladder [Thermo Fisher Scientific]* estándar de 100 pb).
- Tampón ácido bórico / sodio 1 X (Anexo 5.2.11).
- Colorante de carga EZ-vision (diluido 1 / 8) (Biotechnology grade).
- Gradillas para tubos de microcentrífuga de 0,2 mL.
- Trozo de Parafilm.
- Micropipetas de 200 μL , 20 μL y 10 μL .
- Puntas para micropipetas de 200 μL , 20 μL y 10 μL estériles.
- Bandeja de gel, peines y bandeja de electroforesis.
- Fuente de poder.

2.4.2 Realizar Gel

1. Se agregan 100 mL de tampón ácido bórico / sodio 1 X a un matraz de plástico, para preparar un gel al 1,5 % p / v. Posteriormente se agrega 1,5 g de agarosa a los 100 mL de tampón SB previamente dispuestos en el matraz.
2. Se tapa sin apretar el matraz y se hierve en el microondas durante 1 min y 30 s, asegurando que la agarosa se haya disuelto.
3. Cuidadosamente, se deja enfriar el gel hasta aproximadamente 30 °C (se verifica mediante tacto) y se vierte en una bandeja para gel preparada previamente con peines. Se deja solidificar durante aproximadamente 40 min.

2.4.3 Cargar Gel

1. Se coloca un trozo de Parafilm en una gradilla para tubos de microcentrífuga de 0,2 mL y con el pulgar se crea una depresión para cada muestra de ADN. Se agrega un pocillo más para el marcador de tamaño molecular.
2. En cada depresión se pipetea 5 µL de colorante de carga *EZ-vision* (diluido 1 / 8). Se puede usar una sola punta de micropipeta para esto.
3. Se agregan 5 µL de cada reacción de PCR a una gota de *EZ-vision*.
4. Se coloca el gel en la bandeja de electroforesis y se vierte tampón SB 1 X, hasta cubrir el gel.
5. Se cargan 10 µL de la solución en pocillos separados del gel.
6. Se tapa la bandeja de electroforesis y se verifica que los cables estén conectados correctamente a la fuente de poder.
7. Según experiencia de los investigadores, se recomienda correr la electroforesis a 100 V por 80 min. Sin embargo, el voltaje y el tiempo dependerán del tamaño de la bandeja y la cámara de la electroforesis que cada investigador use.

2.5 Purificación de Productos de PCR para Secuenciación

La purificación de productos de PCR busca separar los cebadores, dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato) y otras sustancias usadas en el proceso de PCR. Este paso es relevante para obtener secuencias de calidad.

2.5.1 Materiales

- Productos de PCR.
- Gradillas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, estériles.
- Juego de micropipetas (200 µL, 20 y 10 µL).
- Puntas para micropipetas de 200 / 20 y 10 µL, estériles.
- Gradillas para tubos de microcentrífuga de 0,2 mL.
- Acetato de amonio (NH₄OAc) 7,5 M (Anexo 5.2.8).
- Etanol al 70 %, previamente enfriado en la nevera (Anexo 5.2.2)
- Isopropanol al 100 %, previamente enfriado en la nevera.
- Agua destilada estéril libre de nucleasas.

2.5.2 Procedimiento

1. Utilizando una punta diferente para cada muestra de producto PCR, se transfiere a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
2. Teniendo en cuenta el volumen transferido de cada reacción, se agrega la mitad del mismo volumen de acetato de amonio (NH_4OAc) 7,5 M (concentración final de 2,5 M) y se mezcla con cuatro suaves golpes del dedo.
3. Se calcula el volumen total (volumen transferido de la reacción + volumen de NH_4OAc) y se agrega un volumen igual de isopropanol al 100 %, previamente enfriado en la nevera, sobre el volumen total. Se agita la solución en vortex durante 10 s.
4. Se centrifugan las reacciones (con bisagra hacia afuera) a 13 000 rpm por 30 min y se decanta el sobrenadante (por el lado opuesto del *pellet*).
5. Se lava el *pellet* con 200 μL de etanol al 70 % (se iguala este volumen de dos a cuatro veces más del volumen de la mezcla original, suficiente para lavar los lados del tubo con ayuda del agitador vortex durante 5 s).
6. Se mezcla por agitación en vortex durante 5 s y se centrifuga nuevamente a 13000 rpm, durante un máximo de 15 min.
7. Se decanta el sobrenadante, como en pasos anteriores, y se seca el *pellet* de ADN en una aspiradora de velocidad, por 5 min o hasta que esté seco.
8. Se resuspende el ADN en 20 μL de agua destilada libre de nucleasas.
9. Se registra la concentración de los productos de PCR purificados, usando un espectrofotómetro *NanoDrop*. Se debe verificar que el *ratio* $A_{260/280}$ esté en el rango 1,8-2,0, rango de valores indicativos de la pureza del ADN.
10. Con un marcador de tamaño molecular estándar de tamaño adecuado se corre un gel de agarosa al 1,5 % con 2 μL de la muestra purificada.

Nota: servicio de secuenciación *Macrogen-Korea*.

Se verifica que los productos de PCR limpios cumplen con lo requerido por el servicio de secuenciación de *Sanger*. La cantidad del producto PCR que se coloca en el plato dependerá de la fuerza de la banda en el gel de purificación. Se proporcionarán al menos 10 μL de producto PCR por cada muestra.

2.6 Alineamiento, Edición de Secuencias y Búsquedas en GenBank

Esta sección contiene la descripción de los procedimientos bioinformáticos usados para procesar las secuencias de los respectivos aislamientos fúngicos. Las herramientas bioinformáticas que se presentan en este apartado pueden ser sustituidas por las que mejor se acomoden a las necesidades del investigador.

2.6.1 Recursos Informáticos

- Secuencias en formato *ABIF File*.
- Geneious 6.0.6.
- Plataforma GenBank.

2.6.2 Procedimiento

1. Se recomienda colocar en una carpeta las secuencias en formato *ABIF File* que se van a procesar.
 2. Se abre el programa Geneious 6.0.6 (Dotmatrix. (s.f.)), o según consideración del investigador, el recurso informático que usará.
 3. Las secuencias se importan y se verifica su calidad. Las secuencias se clasifican en buena, regular o mala calidad. Esta se estima según la claridad de los nucleótidos de las secuencias y las posiciones ambiguas que existan.
 4. Las secuencias forward y reverse se alinean bajo el alineamiento predeterminado de Geneious. En este caso, se selecciona el porcentaje de similitud del 65 %, con un alineamiento global, que agrupa posiciones vacías y la opción para determinar automáticamente la dirección de la secuencia.
 5. El programa determina la secuencia consenso. Al abrir una nueva ventana se encontrarán tres secuencias: forward, reverse y consenso.
 6. Se localizan las secuencias de los cebadores usados en forward y reverse, teniendo en cuenta la dirección en la que amplificaron.
- Por ejemplo, si se usaron los cebadores ITS-5 e ITS-4, el primero amplifica en la dirección 5' a 3' (forward) y el segundo en la dirección 3' a 5' (reverse), por tanto, al momento de ubicarlos se encontrarán al inicio de la secuencia contraria a la que amplificaron.
7. Se cortan los extremos de las secuencias teniendo en cuenta el punto anterior. Si existen posiciones ambiguas, se debe ubicar el código correspondiente para esa posición.
 8. Las secuencias consenso se copian y pegan en una hoja Word en formato FASTA, con el código correspondiente. Se recomienda activar el botón mostrar para evitar añadir espacios innecesarios. Este documento se guarda como un formato de texto, con la extensión .txt.
 9. Se abre la plataforma de BLAST (U.S. National Library of Medicine. (s.f.)) y se selecciona el programa para nucleótidos Nucleotide BLAST (blastn). En la nueva ventana, se copia y se pega la secuencia en Enter Query Sequence o, dado el caso, se abre el archivo FASTA que la contenga.
 10. Se seleccionan los parámetros que se requieran. Se recomienda usar la opción Sequences from type material para limitar la búsqueda a secuencias de organismos que se hayan verificado.
 11. Se realiza la búsqueda y se espera los respectivos resultados.
 12. Las identidades obtenidas se discriminan por los porcentajes de similitud y cobertura con la secuencia ingresada. Se recomienda seleccionar las identidades de organismos que sean mayores al 90 % en cobertura y similitud.
 13. Se abren las accesiones de las identidades seleccionadas y se verifican las características de las mismas, es decir, código del organismo, género o especie del cuál fue aislado, investigación asociada al aislamiento, lugar de la investigación, entre otros.
 14. Se realizan los análisis correspondientes.

3 Recolecta y Conservación *ex situ* de Semillas de Orquídeas

Basado en las metodologías propuesta por Seaton y Ramsay (2009), con modificaciones.

La adecuada recolecta y conservación *ex situ* de las semillas de orquídeas es esencial para tener una buena calidad de estas y realizar los diversos ensayos de germinación y propagación *in vitro*. Para ello, como primer paso, es necesario tener los permisos requeridos por las autoridades competentes, si las colectas se realizan en entornos naturales (Seaton y Ramsay, 2009).

Con el objetivo de muestrear la mayor diversidad genética posible, los frutos, también conocidos como cápsulas, deben recolectarse de varias plantas dentro de las poblaciones. La recolección a gran escala de los frutos en la naturaleza puede afectar a las especies de orquídeas, por ello se recomienda que los recolectores sigan de manera estricta los debidos procedimientos de muestreo, incluso más si la recolecta se realiza en orquídeas amenazadas con poblaciones restringidas (Seaton y Ramsay, 2009; Merritt et al., 2014).

Las semillas deben cosecharse antes de la dehiscencia o inmediatamente después de que esta ocurra, asegurando que las semillas están listas para ser procesadas. El término dehiscencia se entiende como la apertura natural del fruto por maduración fisiológica, para dar salida a las semillas. El tiempo de maduración de los frutos varía entre las especies de orquídeas, e incluso puede estar influenciado por las condiciones ambientales de las diferentes temporadas del año. Una vez el fruto haya abierto, las semillas están expuestas a los diversos contaminantes del entorno, por lo anterior es esencial tomar las medidas pertinentes para tenerlas en condiciones estériles (Seaton y Ramsay, 2009; Kendon et al., 2017).

Recomendaciones Generales para el Trabajo de Conservación *ex situ* de Semillas

- ✓ Se deben seguir los protocolos de bioseguridad requeridos. Durante estos procedimientos se debe utilizar bata de laboratorio, guantes, y si es necesario, gafas de seguridad.
- ✓ Los procedimientos de laboratorio se deben realizar en la cámara de flujo laminar y bajo condiciones de asepsia.
- ✓ Los materiales que se utilicen en cada procedimiento deben ser previamente esterilizados en autoclave y los elementos que se usen continuamente, como las pinzas de disección o la aguja hipodérmica, se deben esterilizar en la cámara de flujo laminar, sumergiéndolos en un vaso de precipitado con etanol al 96 % y flameándolos en un mechero con este compuesto, a la misma concentración. En el Anexo se proporcionan detalles para la preparación de los reactivos y los materiales de cada procedimiento.
- ✓ Los productos de cada metodología deben ser etiquetados con la identidad y fecha correspondiente, usando rotuladores indelebles (marca: Sharpie).

3.1 Recolección de Frutos

Este protocolo tiene como objetivo recolectar y almacenar los frutos de orquídeas en las condiciones adecuadas. Las semillas de las orquídeas son muy pequeñas, extremadamente ligeras y se producen en gran número, y los frutos que las contienen varían en formas y tamaños, según la especie de orquídea. Por este motivo, se debe realizar un adecuado y delicado manejo durante los procedimientos de laboratorio.

3.1.1 Materiales

- Frutos cercanos a la dehiscencia (maduros).
- Bolsas de papel de tamaño adecuado para envolver los frutos. Se pueden comprar o hacer de manera casera.
- Cajas Petri estériles, de vidrio.
- Cámara de secado (Anexo 5.1.4).
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %.

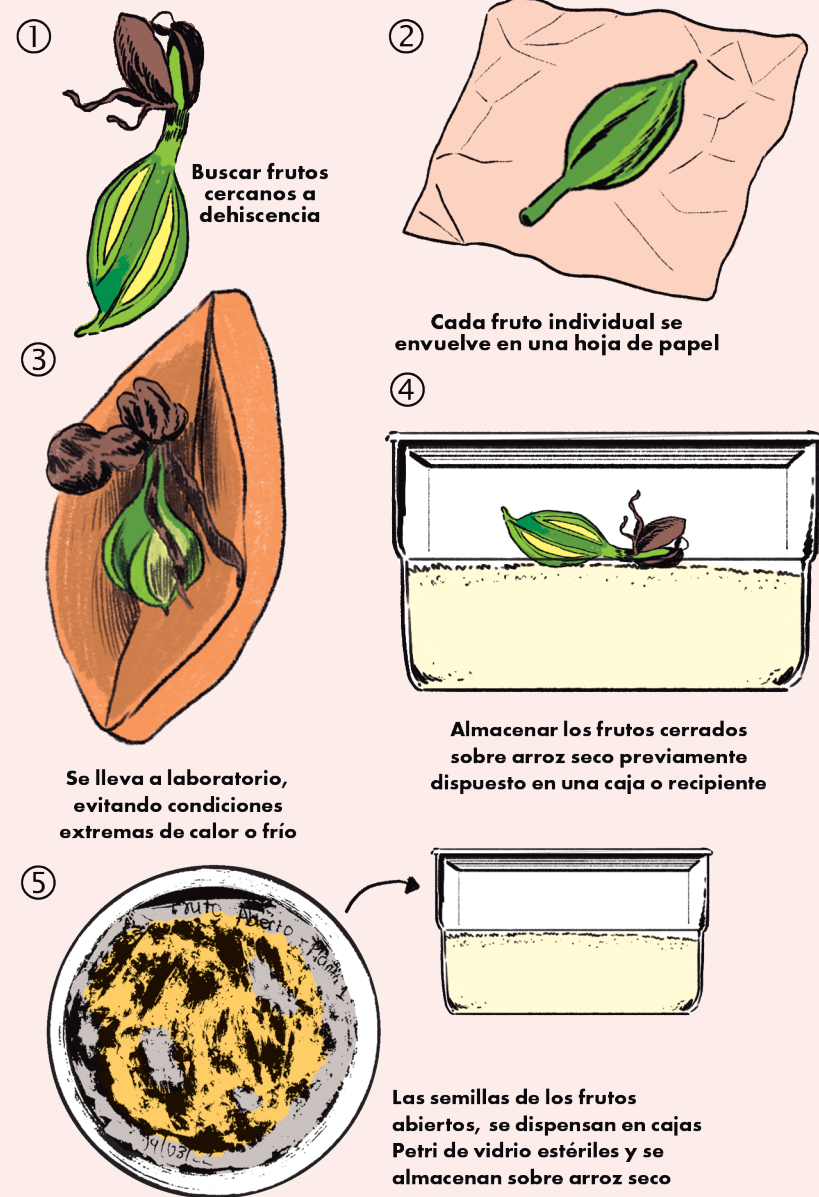


Figura 34. Colecta de frutos de *Cattleya quadricolor* cercanos a dehiscencia

3.1.2 Procedimiento

1. Se buscan frutos cercanos a la dehiscencia en ecosistemas naturales (Figura 35A), invernaderos, o según corresponda para cada caso.
2. Cada fruto individual se envuelve en una hoja de papel doblada, se dispone en una bolsa de papel y se etiqueta con el código respectivo. Se sigue el mismo procedimiento si se encuentran frutos abiertos, teniendo cuidado de mantener las semillas en su interior.
3. Los frutos se transportan al laboratorio, evitando condiciones de calor o frío extremos. No deben transcurrir más de 48 h, a partir de su recolecta.
4. En el laboratorio, los frutos cerrados (Figura 35B) se almacenan durante una semana en una cámara de secado, con el fin de absorber la humedad de los frutos.
5. Si los frutos están abiertos, las semillas se dispensan en cajas Petri de vidrio estériles (Figura 36) y durante una semana se almacenan sobre arroz seco (1 kg) en una caja hermética, para absorber la humedad.



Figura 35. Fruto cercano a la dehiscencia de *Cattleya quadricolor*, con la referencia de medida. A. Fruto en condiciones naturales *in situ*. B. Fruto en laboratorio *ex situ*

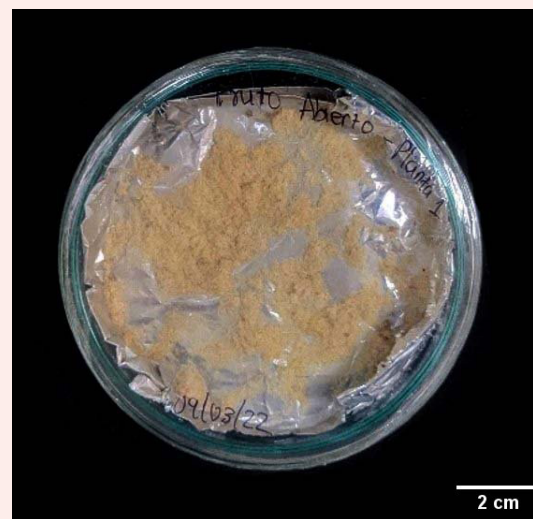


Figura 36. Semillas cosechadas de frutos abiertos de *Cattleya quadricolor*, en cajas Petri de vidrio, estériles



3.2 Desinfección de Frutos Cerrados

Este protocolo tiene como objetivo desinfectar superficialmente los frutos cerrados para conservar de forma estéril las semillas que contiene. Estas semillas se almacenan en bancos de semillas y son utilizadas para procedimientos de pruebas de germinación. Las semillas de los frutos cerrados no han sido expuestas a microorganismos del entorno, por tanto, se encuentran en condiciones estériles.

Nota: la longevidad de las semillas depende de tres factores: calidad de las semillas, contenido de humedad y temperatura de almacenamiento. Por ello, se recomienda secar las semillas antes de ser almacenadas. Si se requiere incrementar la longevidad de estas una vez estén secas, se pueden almacenar a 4-5 °C en un congelador doméstico, o a -20 °C en un congelador para investigación (Seaton y Ramsay, 2009).

3.2.1 Materiales

- Fruto cerrado cercano a la dehiscencia.
- Cajas Petri de vidrio, estériles, con una hoja de papel aluminio estéril en su interior.
- Gradilla para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, estériles.
- Frascos de vidrio 2-4 mL, herméticos, estériles.
- Etanol al 70 % (Anexo 5.2.2).
- Pinzas de disección y bisturí con cuchilla, estériles.
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %.
- Hoja de papel aluminio estéril (Anexo 5.1.5)

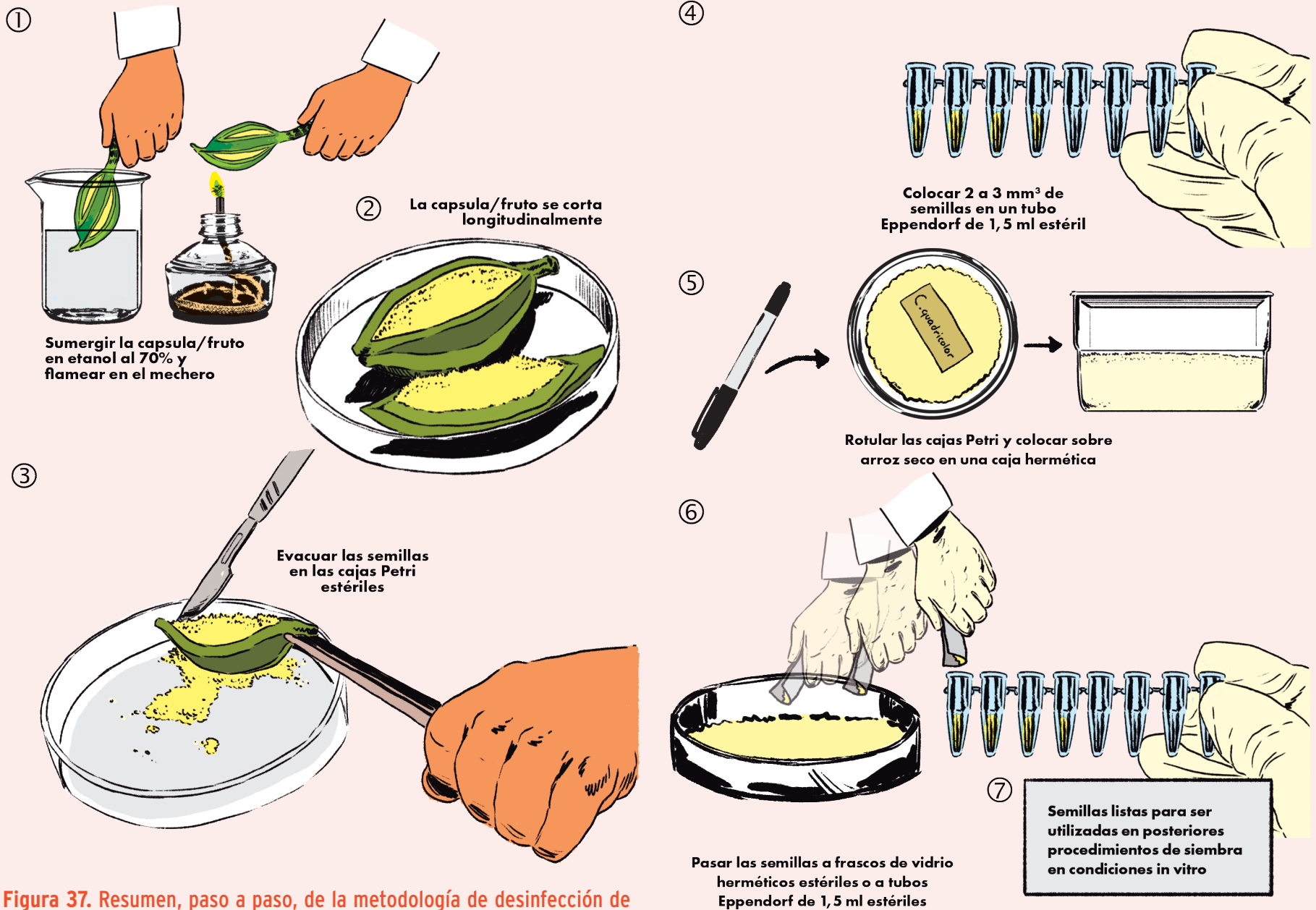


Figura 37. Resumen, paso a paso, de la metodología de desinfección de frutos cerrados y conservación de semillas de *Cattleya quadricolor*

3.2.2 Procedimiento

1. Se sumerge el fruto en etanol al 70 % durante 1 min, mediante agitación y realizando movimientos circulares. Al retirarlo se flamea superficialmente en el mechero.
2. El fruto se coloca en la caja Petri estéril y con ayuda de un bisturí estéril se corta longitudinalmente, de tal manera que se abra en dos mitades. Se recomienda utilizar cajas Petri de vidrio estériles, con una hoja de aluminio dentro, para facilitar la colecta de semillas del fruto.
3. Las semillas son evacuadas en cajas Petri estériles, usando las pinzas de disección y dando suaves golpes al fruto que contiene las semillas. En este proceso se debe evitar recoger cualquier residuo, como fragmentos internos y externos del fruto. La cámara de flujo laminar se limpia entre el procesamiento de cada fruto.
4. Se toman entre 2 y 3 g de semillas y se colocan en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL estéril, para realizar la prueba de viabilidad de semillas (ver sección 3.4).
5. Se rotulan las cajas Petri con número de identificación y fecha, y durante una semana se colocan sobre arroz seco en una caja hermética, para su secado. La función del secado es inhibir los procesos biológicos y metabólicos de las semillas y absorber el exceso de humedad que contienen las mismas, hasta un contenido adecuado (aproximadamente 5 %), que impida el crecimiento de microorganismos y evite las reacciones de deterioración (FAO, 1992).
6. Cuando las semillas estén secas, con ayuda de la hoja de papel aluminio estéril se pasan a frascos de vidrio herméticos estériles, o en su defecto, a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL estériles, debidamente rotulados, para ser depositados en el banco de semillas.
7. Las semillas provenientes de frutos cerrados, procesadas y almacenadas de esta forma, se encontrarán estériles y listas para ser utilizadas en posteriores procedimientos de siembra en condiciones *in vitro*, ya que este protocolo no altera su viabilidad innata.

3.3 Desinfección de Semillas de Frutos Abiertos

Este protocolo tiene como objetivo desinfectar las semillas de frutos abiertos, las cuales ya han sido expuestas a microorganismos del exterior. Una vez estas semillas son desinfectadas, se usan para procedimientos de germinación.

Nota: El proceso de esterilización que se usa en este procedimiento incorpora un agente humectante (dodecilsulfato sódico [SDS] al 10 %) y un desinfectante (peróxido de hidrogeno [H_2O_2]), con el fin de que el agente humectante reduzca la tensión superficial de la testa y asegure contacto entre el desinfectante y la semilla (Seaton y Ramsay, 2009).

3.3.1 Materiales

- Semillas de frutos abiertos.
- Agua oxigenada (H_2O_2).
- Solución Dodecilsulfato sódico (SDS) al 10 % (Anexo 5.2.12).
- Agua destilada estéril (ADE).
- Cajas Petri de vidrio, estériles, con una hoja de papel aluminio estéril.
- Gradilla para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, estériles.
- Micropipetas y puntas estériles de 1000 μ L y 200 μ L.
- Minicentrífuga.
- Pinzas de disección estériles.
- vaso de precipitado para descarte (100 mL).
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %.

3.3.2 Procedimiento

1. En la cámara de flujo laminar, las semillas de los frutos que abrieron en campo o en laboratorio se vacían sobre la hoja de aluminio dispuesta en la caja Petri de vidrio estéril. Este procedimiento se lleva a cabo con ayuda de una pinza de disección y dando suaves golpes al fruto. De este modo, se evita que las semillas se dispersen

- alrededor de las cajas Petri y además, entre el procesamiento de cada fruto se limpia la cámara de flujo laminar. Asimismo, se debe evitar transferir cualquier residuo, es decir, fragmentos internos y externos del fruto.
2. Se rotulan las cajas Petri con número de identificación y fecha, y durante una semana se colocan sobre arroz seco en una caja hermética.
 3. Cuando las semillas están secas, con ayuda de la hoja de papel aluminio estéril se pasan a frascos de vidrio herméticos estériles, o en su defecto, a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, estériles, debidamente etiquetados. Las semillas se pueden conservar, pero deben ser esterilizadas en el momento que se requieran utilizar para ensayos de germinación.
 4. Para el proceso de esterilización antes de la siembra, en nuevos tubos de microcentrífuga se disponen las semillas a esterilizar, hasta llegar a un volumen máximo de 0,5 mL, previamente etiquetados.
 5. En cada tubo se agregan 750 μL de ADE.
 6. Adicionalmente, a la solución anterior se agregan 250 μL de H_2O_2 .
 7. Luego se adicionan 100 μL de solución SDS al 10 %. Se agitan, se mezclan por inversión tres veces y se espera durante 10 min, con el fin de que la solución se impregne en las semillas sin dañarlas. Se elimina el sobrenadante que deben contener los microorganismos presentes. Se recomienda que el tiempo de desinfección esté en un rango de 5 a 10 min (Seaton y Ramsay, 2009).
 8. Los tubos se colocan durante 15 s en la minicentrífuga. Pasado ese tiempo, usando la micropipeta de 1000 μL se descarta la solución del tubo.
 9. Las semillas se lavan tres veces con ADE. El proceso de lavado con ADE consiste en agregar el ADE, mezclar por inversión tres veces, colocar los tubos en la minicentrífuga durante 15 s y descartar el ADE entre cada lavado.
 10. Una vez las semillas hayan sido desinfectadas, son sembradas inmediatamente.

3.4 Pruebas de Viabilidad

Este protocolo tiene como objetivo conocer la viabilidad de las semillas, tanto de frutos cerrados como abiertos. Las pruebas de viabilidad son un paso importante para poder evaluar el éxito en los procedimientos de germinación.

El uso de la sal 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (TZ), o cloruro de tetrazolio, es uno de los procedimientos más usados para comprobar la viabilidad de las semillas. Actúa como un indicador de los procesos de reducción que ocurren en las células que componen los tejidos de las semillas (Altman, 1976). Cuando el TZ entra en contacto con los tejidos de la semilla, interfiere en los procesos de reducción de las células vivas, al aceptar un ion hidrógeno, liberado en el proceso de respiración. Este ion reduce a la sal de tetrazolio a trifenilformazán o formazán, una sustancia estable de coloración rojiza, que ayuda a diferenciar zonas vivas de las semillas (coloración roja o rosada) del resto de zonas (coloración blanca) (Altman, 1976; França-Neto y Krzyzanowski, 2019).

Nota: este procedimiento consta de dos fases: pretratamiento y tratamiento de TZ. Además, se debe considerar que el procedimiento se desarrolla en tres días.

3.5.1 Materiales

- Solución de sacarosa al 10 % p / v (Anexo 5.2.13)
- Solución de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (TZ) al 1 % p / v (Anexo 5.2.14)
- Agua destilada estéril (ADE).
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Gradillas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Juego de micropipetas (1000 y 200 μL).
- Puntas para micropipetas de 1000 y 200 μL , estériles.
- Microcentrífuga Eppendorf
- Baño maría a 40 °C.
- Agitador vortex.

- Microscopio de luz con objetivos de aumento a 4 X, 10 X y 40 X, o estereoscopio.
- Pinzas de disección estériles.
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %.

3.5.2 Procedimiento

1. Se toma una cantidad de semilla (2-3 g) en un tubo de microcentrífuga. Se le agrega 1 mL de sacarosa al 10 % a cada tubo con semilla y se incuba a 25 °C, en la oscuridad, durante 24 h.
2. Transcurrido el tiempo, se centrifuga a 4000 rpm y se remueve la solución sobrenadante con micropipeta.
3. Se añade 1 mL de TZ (1 %) y se incuba en baño maría en la oscuridad, a 40 °C por 24 h.
4. Pasadas 24 h se centrifuga a 4000 rpm y se remueve la solución con micropipeta.
5. Se añade 1 mL de ADE y se evalúa su viabilidad.
6. Para evaluar la viabilidad de las semillas, la solución se agita en vortex durante 15 s y posteriormente se añaden 50 µL de la suspensión de semillas en un portaobjeto, que se cubre con un cubreobjetos y se observa por el microscopio con magnificación x. Las semillas viables son las que al observar al microscopio presentan embriones rojos o rosados, mientras que las semillas incoloras o blanquecinas, al no presentar signos de respiración, se registran como no viables (Figura 38).
7. Se estima la proporción de semillas viables con respecto al total de semillas para cada muestra. Esta estimación se realiza en cuatro o diez campos de visión al microscopio a 4 X, cuatro campos de visión en el estereoscopio, o según las consideraciones del investigador.



Figura 38. Semillas de *Spathoglottis plicata* sometidas a la prueba de viabilidad con 2, 3, 5-trifeniltetrazolio. A. Semillas viables con coloración rojiza. b. Semillas inviables con coloración grisácea

4 Siembra de Semillas Utilizando Posibles HMO para su Germinación Simbiótica

Este procedimiento tiene como objetivo inducir la germinación de las semillas de orquídeas, utilizando hongos con características del género-forma *Rhizoctonia*, por ser los más reportados como micorrízicos en orquídeas. Además, por identificación molecular coincide con investigaciones que han evidenciado su actividad micorrízica (Mosquera-Espinosa et al., 2010). En literatura científica, este procedimiento se denomina como *germinación simbiótica* (Porras-Alfaro y Bayman, 2007). Nota: tanto semillas como hongos han sido conservados en laboratorio (*ex situ, in vitro*), según las metodologías aquí descritas (ver secciones 1.7, 3.2 y 3.3).

Recomendaciones Generales para el Trabajo de Siembra de Semillas, Utilizando Posibles HMO para su Germinación Simbiótica

- ✓ Se deben seguir los protocolos de bioseguridad requeridos. Durante estos procedimientos se debe utilizar bata de laboratorio, guantes, y si es necesario, gafas de seguridad.
- ✓ Los procedimientos de laboratorio se deben realizar en la cámara de flujo laminar y bajo condiciones de asepsia.
- ✓ Los materiales que se utilicen en cada procedimiento deben ser previamente esterilizados en autoclave, y los elementos que se utilicen continuamente, como las pinzas de disección o la aguja hipodérmica, se deben esterilizar en la cámara de flujo laminar, sumergiéndolos en un vaso de precipitado con etanol al 96 % y flameándolos en un mechero con este compuesto, a la misma concentración. Se proporcionan detalles para preparación de los reactivos y los materiales de cada procedimiento en el Anexo.
- ✓ Los productos de cada metodología deben ser etiquetados con la identidad y fecha correspondiente, usando rotuladores indelebles (marca: Sharpie).

4.1 Reactivación e Inoculación de Posibles HMO en Medio Celulosa

Basado en la metodología propuesta por Mosquera-Espinosa et al. (2010). Este procedimiento tiene como objetivo tener inóculo activo en condiciones *in vitro* y *ex situ*, de los hongos aislados con características morfológicas del género-forma *Rhizoctonia*, que fueron preservados en papel y mantenido a -20 °C. Posteriormente se evalúa su función biológica germinando semillas de orquídeas.

4.1.1 Materiales

- Discos secos de papel filtro de diámetro 0,5 cm con inóculo de posibles HMO.
- Cajas Petri plásticas grandes, estériles (9 cm x 1,5 cm).
- Medio agar de dextrosa y papa acidulado (PDAa) / medio con vitaminas y minerales (MVM) (Anexo 5.2.4 y 5.2.5)
- Medio celulosa (Anexo 5.2.15).
- Pinzas de disección y aguja de inoculación (hipodérmica) de 4 cm de largo, estériles.
- Cristapel o papel film de plástico (5 cm de ancho).
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %.

4.1.2 Procedimiento

1. En el microondas se derrite el medio agar de dextrosa y papa acidulado (PDAa) / medio con vitaminas y minerales (MVM), y se deja enfriar en la cámara de flujo laminar (ver sección 1.3, paso 1 del procedimiento).
2. También en cámara de flujo laminar se dispensan entre 20 a 25 mL de medio en las cajas Petri plásticas grandes, estériles (9 cm x 1,5 cm), que se van a utilizar. Estas cajas se dejan cerca del mechero, sin taparlas completamente, hasta que el medio solidifique.
3. Con las pinzas estériles se toma un solo disco de papel filtro de diámetro 0,5 cm con inóculo del posible HMO, y se ubica en el centro de la caja Petri que contiene el medio.
4. Las cajas Petri se sellan con cristapel y se etiquetan con el código y fecha correspondiente en la tapa. Se incuban en la oscuridad, a 25 °C.
5. Se debe realizar seguimiento de cada hongo, haciendo observaciones máximo 48 h después, ya que pueden existir contaminantes. De ser así, debe retirar de la incubadora el material contaminado, para no perder el resto de los hongos de interés.
6. Cada hongo se deja crecer hasta que cubre 1 / 3 de la caja Petri (generalmente ocurre entre ocho a diez días, pero depende de la velocidad de crecimiento de cada hongo).
7. Luego de pasar los ocho a diez días, con un sacabocado se obtiene el inóculo en círculos de diámetro 0,5 cm. Dicho inóculo será transferido a medio celulosa.
8. En este punto se repite desde el paso uno al seis, haciendo uso tanto del medio celulosa, como el inóculo de los HMO obtenidos en los medios PDAa / MVM.
9. Cada hongo se deja crecer hasta que cubre 1 / 3 de la caja Petri (generalmente ocurre entre ocho a diez días, pero depende de la velocidad de crecimiento de cada hongo).
10. Una vez reactivados los posibles HMO, en medio celulosa se procede a hacer el montaje, para ser evaluado en la germinación de semillas de orquídeas.

4.2 Siembra de Semillas de Orquídeas para su Germinación por Posibles HMO

Basado en las metodologías propuesta por Otero et al. (2004) y Porras-Alfaro y Bayman (2007).

Este procedimiento tiene como objetivo evaluar la germinación simbiótica de semillas de orquídeas en condiciones *in vitro* y *ex situ*, usando los hongos aislados con características morfológicas del género-forma *Rhizoctonia*, que fueron preservados en papel y mantenidos a -20 °C. De ser exitoso el proceso, es posible su aplicación en programas de restauración ecológica con especies de orquídeas.

Nota: las semillas han sido conservadas en laboratorio, pasando por un proceso de desinfección, que según sea el caso se hace sobre frutos cerrados o semillas de frutos abiertos. Igualmente, se realiza la prueba de viabilidad de las semillas (ver secciones 3.2, 3.3 y 3.4).

4.2.1 Materiales

- Cajas Petri grandes (9 cm x 1,5 cm) con medio celulosa y HMO cubriendo un 1 / 3 de la caja Petri.
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL con semillas estériles, según las secciones 3.3 y 3.4.
- Agua destilada estéril (ADE).
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Micropipeta y puntas estériles de 1 000 y 200 μ L.
- Estereoscopio y microscopio de luz, con objetivos de aumento a 4 X, 10 X y 40 X.
- Pinzas de disección y aguja de inoculación (hipodérmica) de 4 cm de largo, estériles.
- Cristapel o papel film de plástico (5 cm de ancho).
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %.

4.2.2 Procedimiento

1. En la cámara de flujo laminar, utilizando el mechero, a cada tubo de microcentrífuga de 1,5 mL con semillas estériles se les añade 1 mL de ADE para suspender dichas semillas, y se agitan de forma suave.
2. Del tubo con semillas en uso, con micropipeta se toma una alícuota de 200 μ L y se deposita sobre un portaobjetos. Seguido se dispone el cubreobjetos para hacer observaciones al microscopio de luz a 4 X o 10 X, según lo considere el investigador. Generalmente, la cuantificación de semillas arroja un número aproximado entre 200 y 300, los cual depende de la especie de orquídea. Se procede a hacer cinco lecturas para calcular un valor promedio de semillas. Dicho valor es el que se registra para determinar el porcentaje de germinación final.
3. Se abren las cajas Petri grandes con medio celulosa, donde creció cada posible HMO y que cubrieron hasta 1 / 3 de la caja Petri. Posteriormente, se dispersa sobre el medio de cultivo una alícuota de 200 μ L, que contendrá las semillas, según el valor promedio calculado anteriormente. Para que haya mejor dispersión de las semillas, se puede hacer uso de las pinzas y la aguja.
4. Este procedimiento se realiza de forma individual para cada caja Petri que contiene el posible HMO de interés. Las cajas se sellan con cristapel y se mantienen en condiciones ambientales según la zona de estudio, utilizando una estantería que debe mantenerse limpia y libre de polvo para evitar contaminación por ácaros. Se debe suministrar luz, ya sea natural o artificial, por aproximadamente 12 horas / día.
5. Las cajas Petri serán observadas al estereoscopio y microscopio durante cuatro a seis meses, realizando observaciones cada quince días, por dos razones: 1. para reconocer las diferentes etapas de germinación que ocurren y las cuales finalizan con la obtención de plántulas, y 2. para asegurarse que no existe contaminación por microorganismo (hongos o bacterias) y / o ácaros.

5 Anexos

5.1 Preparación de Materiales

5.1.1 Preparación de Papel Absorbente Estéril

5.1.1.1 Materiales

- Hoja de papel absorbente de 25 cm x 20 cm.
- Tijeras.
- Papel aluminio de 15 cm x 10 cm.
- Cinta indicadora de esterilización.

5.1.1.2 Procedimiento

1. Se toma una hoja de papel absorbente de 25 cm x 20 cm. Se dobla dos veces horizontalmente y se realizan dos cortes verticales. Se obtienen tres trozos de papel absorbente de aproximadamente 7 cm x 5 cm en varias capas.
2. Se toma papel aluminio de 15 cm x 10 cm (o según criterio del investigador) y se envuelven los trozos de papel absorbente, procurando que no queden espacios, para evitar que entre aire y contamine. Se coloca la cinta indicadora de esterilización y se lleva a autoclavar (autoclave marca *sturdy* [SA-300 H]), bajo las siguientes condiciones: temperatura 121°C, presión 1,5 kg / cm³, tiempo por etapa 20 min. Luego se coloca en el horno a 50 °C, de 24 h a 48 h.

5.1.2 Discos de Papel Filtro Estériles

5.1.2.1 Materiales

- Hoja de papel filtro (diámetro de papel: 12,5 cm, apertura de poro: 8 a 10 μm).
- Perforadora.
- vaso de precipitado de 100 mL.
- Dos láminas de papel aluminio de 10 cm x 10 cm.
- Cinta indicadora de esterilización.

5.1.2.2 Procedimiento

1. Se realizan discos de papel filtro de 0,5 cm de diámetro con una perforadora convencional, usando una hoja de papel filtro (*Munktell ahlstrom*). Según el criterio del investigador, se puede maximizar el material doblando la hoja en cuatro partes y realizando discos uno al lado del otro, intentando que no se traslapen entre sí.
3. Cuando se tengan los discos de papel suficientes, se colocan en un vaso de precipitado de 100 mL y se tapan con dos capas de papel aluminio. Se coloca la cinta indicadora de esterilización, la cinta con el nombre y la fecha correspondiente, y se llevan a autoclavar bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1, paso 2 del procedimiento. Luego, para su secado se colocan en el horno a 50 °C, en un periodo de 24 a 48 h.

5.1.3 Sobres de Papel Mantequilla

5.1.3.1 Materiales

- Un pliego de papel mantequilla.
- Tijeras y pegante.
- Hoja de papel aluminio.
- Cinta indicadora de esterilización.

5.1.3.2 Procedimiento

1. Se realizan dos tipos de sobres de papel mantequilla: pequeños y grandes. Los sobres pequeños tienen las dimensiones de 11 cm de largo, 7 cm de ancho y 1 cm de ancho por cada pestaña (Anexo 5.2.2); y los sobres grandes miden 12,5 cm de largo, 8,5 cm de ancho y 1 cm de ancho por cada pestaña (Anexo 5.2.3).
2. Los sobres se recortan y se pegan con pegante líquido. Se verifica que no haya excedente de pegante en lugares no necesarios, que pueda interferir en la apertura de los sobres una vez estén secos. Estos sobres se utilizarán para guardar inóculo de HMO a -20 °C.
3. Una vez los sobres están secos, se realizan paquetes conformados de la siguiente manera: dos sobres pequeños y uno grande (en cada sobre pequeño se colocarán 10 discos de papel filtro con el inóculo del hongo y se guardarán en el sobre de papel mantequilla grande). Cada paquete se envuelve en papel aluminio. Se coloca la cinta indicadora de esterilización a cada paquete y se llevan a autoclavar, bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1, paso 2 del procedimiento. Luego se secan en un horno a 50 °C, durante 24 h a 48 h.

5.1.4 Cámara de Secado

5.1.4.1 Materiales

- 1 kilogramo (kg) de arroz.
- Papel aluminio.
- Recipiente de vidrio o plástico.
- Horno a 80 °C.

5.1.4.2 Procedimiento

1. Se toma un recipiente de vidrio o plástico y se cubre su base con papel aluminio.
2. Se dispensa 1 kg de arroz sobre el recipiente.
3. Se lleva al horno a 80 °C durante 24 h.
4. Una vez el arroz esté seco, se puede usar como cámara de secado, cuya función es absorber la humedad de lo que se coloque en su interior.
5. La cámara se puede cubrir con papel aluminio, o según consideración del investigador.

5.1.5 Hoja de Papel Aluminio Estéril

5.1.5.1 Materiales

- Hoja de papel aluminio 10 cm x 5 cm.
- Papel aluminio.
- Papel absorbente húmedo con etanol al 96 %.
- Cinta indicadora de esterilización.

5.1.5.2 Procedimiento

1. Se corta una hoja de papel aluminio de 10 cm x 5 cm y se limpia de los dos lados con papel absorbente, humedecido con etanol al 96 %.
2. Una vez limpia, la hoja se dobla por la mitad y se envuelve en un trozo de papel aluminio.
3. Se coloca la cinta indicadora de esterilización y se lleva a autoclavar, bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1, paso 2 del procedimiento. Al terminar, se pone a secar en el horno a 50 °C por 24 h.

5.2 Preparación de Reactivos

5.2.1 Ecuaciones para la Preparación de Reactivos

5.2.1.1 Procedimiento

1. A continuación se muestran las ecuaciones a utilizar para la preparación de reactivos moleculares.
 - Molaridad = (número de moles) / (litros de solución)
 - Moles = (gramos de soluto) / (peso molecular)
 - Concentración₁ x Volumen₁ = Concentración₂ x Volumen₂ ó $(C_1V_1 = C_2V_2)$
2. De cada ecuación se puede despejar lo que se requiera encontrar. En este caso, se requiere:
 - Número de moles = (molaridad) x (litros de solución)
 - Gramos = (moles) x (peso molecular)
 - Volumen₁ = (Concentración₂ x Volumen₂) / (Concentración₁)
ó $(V_1 = (C_2V_2) / (C_1))$

Nota: antes de hacer las operaciones, se debe tener en cuenta que las unidades de medida coincidan, según corresponda.

1 L = 1000 mL

1 M = 1000 mM

5.2.2 Preparación de Etanol al 70 %

5.2.2.1 Materiales

- Etanol al 96 %.
- Agua destilada (AD).
- Frasco de vidrio de 200 mL.
- Cinta de enmascarar o formato de identificación y rotulador permanente.

5.2.2.2 Procedimiento

1. Se utiliza la ecuación [iii] y se despeja la variable que se quiere encontrar (ecuación [vi]).
2. Para este caso se tiene una concentración inicial de 96 % para etanol. El volumen inicial se desconoce. La concentración final corresponde al 70 % y el volumen que se quiere tener es 100 mL.
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - $96 \% = 0,96$
 - $70 \% = 0,7$
 - $V_1 = (0,70 \times 100 \text{ mL}) / (0,96)$
3. Se opera, se cancelan las unidades respectivas y da como resultado $V_1 = 72,91 \text{ mL}$ de etanol al 96 %.
 - El volumen restante se complementa con AD, es decir, 27,08 mL.
 - La solución se almacena a temperatura ambiente.

5.2.3 Preparación de Hipoclorito de Sodio al 1 %

5.2.3.1 Materiales

- Hipoclorito de sodio (NaClO) al 16,79 %.
- Agua destilada (AD).
- Frasco de vidrio de 200 mL.
- Cinta de enmascarar o formato de identificación y rotulador permanente.

5.2.3.2 Procedimiento

1. Se utiliza la ecuación [iii] y se despeja la variable que se quiere encontrar (ecuación [vi]).
2. Para este caso se tiene una concentración inicial de 16,79 % para hipoclorito de sodio (NaClO). El volumen inicial se desconoce. La concentración final corresponde al 1 % y el volumen que se quiere tener es 100 mL.
3. La ecuación se reemplaza con los valores:
 - $16,79 \% = 0,1679$
 - $1 \% = 0,01$
 - $V_1 = (0,01 \times 100 \text{ mL}) / (0,1679)$
4. Se opera, se cancelan las unidades respectivas y da como resultado $V_1 = 5,95 \text{ mL}$ NaClO al 16,79 %
 - El volumen restante se complementa con AD, es decir, 94,05 mL.
 - La solución se almacena a temperatura ambiente.

5.2.4 Preparación de Ácido Láctico al 25 %

5.2.4.1 Materiales

- Ácido láctico concentración original (100 %).
- Agua destilada (AD).
- Frasco de vidrio tapa rosca de 200 mL.

5.2.4.2 Procedimiento

1. Se utiliza la ecuación $C_1V_1 = C_2V_2$ y se despeja la variable que se requiere encontrar.
2. Para este caso la concentración inicial del ácido láctico es de 100 %. Se desconoce el volumen inicial. La concentración final corresponde al 25 % y el volumen que se quiere preparar es 100 mL. Se despeja el volumen inicial, dando como resultado 25 mL de ácido láctico puro. La cantidad de volumen restante se complementa con agua destilada (AD), es decir, 75 mL.
3. La solución se almacena a temperatura ambiente.

5.2.5 Preparación de Medio Agar de Dextrosa y Papa Acidulado (PDAa) / Medio con Vitaminas y Minerales (MVM)

5.2.5.1 Materiales

- Medio Agar de dextrosa y papa (PDA) / agar-agar en polvo o gránulos.
- Ácido láctico.
- Agua destilada (AD).
- Azúcar.
- Frasco con nutrientes en presentación líquida.
- Balanza analítica.
- Plancha de agitación y calentamiento.
- Frasco de vidrio tapa rosca de 250 mL, para preparar 200 mL.
- Cinta indicadora de esterilización.
- Cinta de enmascarar o formato de identificación y rotulador permanente.

5.2.5.2 Procedimiento

1. Para preparar el medio agar de dextrosa y papa acidulado (PDAa) se deben tener en cuenta las indicaciones del fabricante. En este caso se usó PDA (*Merck*), para lo cual se utilizan 39 g por cada litro de AD. La solución se mezcla en plancha de agitación por 15 min a 121 °C hasta disolver. Al frasco para autoclavar se le coloca la cinta indicadora de esterilización, la cinta con el nombre del medio y la fecha, y se autoclava con las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1, paso 2 del procedimiento. Luego, cuando el medio de cultivo se enfríe, por cada litro se agregan 5 mL de ácido láctico al 25 % (Anexo 5.2.4), y según sea el caso, se dispensa el medio en las cajas Petri, o se deja enfriar y se guarda en la nevera a 4 °C, hasta su uso.

2. Para preparar 200 mL del medio con vitaminas y minerales (MVM) se necesitan 4 g de agar-agar (*Loba Chemie Ltda.*), 1,3 g de azúcar y 200 mL de AD, o el volumen que se necesite preparar.
3. Se coloca la cinta indicadora de esterilización al frasco para autoclavar, la cinta con el nombre del medio y la fecha de preparación, y se lleva a autoclavar bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Luego se deja enfriar por 5 min y se agregan 100 μ L de vitaminas y minerales por cada 100 mL de medio. Se agita suavemente, y según sea el caso, se dispensa el medio en las cajas Petri, o se deja enfriar y se guarda en la nevera a 4 °C.

5.2.6 Preparación de Medio Líquido Caldo Papa Dextrosa Para Crecimiento de Micelio

5.2.6.1 Materiales

- Caldo papa dextrosa (CPD) en polvo o gránulos.
- Agua destilada (AD).
- Erlenmeyer o vaso de precipitado de 500 mL.
- Balanza analítica.
- Plancha de agitación y calentamiento.
- Dos láminas de papel aluminio de 10 cm².
- Probetas de 100 mL y 25 mL.
- Frascos boca ancha o Erlenmeyer de 50 mL.
- Cinta indicadora de esterilización.
- Cristapel o papel film de plástico (5 cm de ancho), cinta de enmascarar y rotulador permanente.
- Mechero con etanol al 96 % y vaso de precipitado con etanol al 96 %.

5.2.6.2 Procedimiento

1. Para preparar el medio caldo papa dextrosa (CPD) se deben tener en cuenta las indicaciones del fabricante. En este caso se utilizan 24 g de CPD por cada litro de AD.
2. Se debe tener en cuenta el volumen total de medio a preparar, conociendo que por cada hongo del cual se requiera obtener micelio se necesitan 20 mL de medio CPD.
3. Los reactivos y el AD se disponen en un vaso de precipitado y se utiliza una plancha de agitación y calentamiento para mezclar la solución por aproximadamente 5 min.

4. Se utiliza una probeta de 25 mL y se miden 20 mL de medio para ser dispuestos en los diferentes frascos boca ancha o Erlenmeyer (50 mL). Posteriormente, los frascos se tapan con dos capas de papel aluminio. Se coloca la cinta indicadora de esterilización, la cinta de enmascarar con el nombre del medio y la fecha correspondiente. A continuación se llevan a autoclavar, bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1, paso 2 del procedimiento.
5. Se deja enfriar el medio a temperatura ambiente por aproximadamente 15 min. Los frascos se sellan con cristapel, y según sea el caso, el medio se utiliza el mismo día o se conserva en la nevera a 10 °C por un periodo máximo de dos días.

5.2.7 Tampón de Extracción Dodecilsulfato Sódico (SDS)

Basado en la metodología de Velasco-Mosquera (2005).

5.2.7.1 Materiales

- Hidroximetil aminometano (Tris)-ácido clorhídrico (HCl) 200 mM [pH 8,0].
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mM [pH 8,0].
- Cloruro de sodio (NaCl) 500 mM.
- Dodecilsulfato Sódico (SDS) al 1 %.
- Agua destilada (AD).
- Frascos de vidrio de 200 mL.
- Frasco de vidrio estéril de 200 mL.
- Probeta graduada.
- Balanza analítica.
- Plancha de agitación y agitador magnético.
- Medidor de pH.
- Espátula.
- Cinta de enmascarar o formato de identificación y rotulador permanente.
- Cinta indicadora de esterilización.

5.2.7.2 Procedimiento

A continuación se muestra cómo se prepara cada reactivo de manera individual, para luego ser mezclado y preparar el tampón de extracción SDS.

Hidroximetil Aminometano-Ácido Clorhídrico (Tris-HCl) 1 M

1. Se identifica el peso molecular del hidroximetil aminometano (Tris), el cual es 121,14 g / mol. Se van a preparar 200 mL de solución madre de Tris de concentración 1 M (mol / L).
2. Se utilizan las ecuaciones [i] y [ii], respectivamente. De la ecuación [i] se despeja el número de moles (ecuación [iv]).
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - 200 mL = 0,2 L
 - $n = 1 \text{ M (mol / L)} \times 0,2 \text{ L}$
 - Se opera, se cancelan las unidades correspondientes y se obtiene como resultado $n = 0,2$ moles.
3. De la ecuación [ii] se despejan los gramos de la sustancia (ecuación [v]).
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - Gramos = (0,2 moles) x (121,14 g / mol)
 - Se opera y se cancelan las unidades correspondientes. Se obtiene que se necesitan 24,23 g para preparar una solución de Tris 1 M.
4. Se pesan 24,23 g en la balanza y lentamente se agregan 170 mL de AD en el frasco de vidrio. Se agitan durante 15 s y se usa ácido clorhídrico (HCl) para ajustar el pH de la solución a 8. Luego se completa el volumen a 200 mL con AD, se coloca la cinta indicadora de esterilización y se lleva a autoclavar, bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1, paso 2 del procedimiento.
5. La solución se almacena a temperatura ambiente o en la nevera a 4 °C, durante un tiempo aproximado de seis meses.

Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,1 M

1. Se identifica el peso molecular del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el cual es 372,24 g / mol. Se preparan 200 mL de solución madre de EDTA de concentración 0,1 M (mol / L).

2. Se utilizan las ecuaciones [i] y [ii], respectivamente. De la ecuación [i] se despeja el número de moles (ecuación [iv]).
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - 200 mL = 0,2 L
 - $n = 0,1 \text{ M (mol / L)} \times 0,2 \text{ L}$
 - Se opera, se cancelan las unidades respectivas y da como resultado $n = 0,02$ moles.
3. De la ecuación [ii] se despejan los gramos de la sustancia (ecuación [v]). La ecuación se reemplaza con los valores:
 - Gramos = 0,02 moles x 372,24 g / mol
 - Se opera y se cancelan las unidades correspondientes. Se obtiene que se necesitan 7,44 g para preparar una solución de EDTA 0,1 M.
4. Se pesan 7,44 g en la balanza de precisión y lentamente se agregan 170 mL de AD en el frasco de vidrio. Se agitan durante 15 s y se usan perlas de hidróxido de sodio (NaOH) para ajustar el pH de la solución a 8. Luego se completa el volumen a 200 mL con AD, se coloca la cinta indicadora de esterilización y se lleva a autoclavar, bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1, paso 2 del procedimiento.
5. La solución se almacena a temperatura ambiente o en la nevera a 4 °C, durante un tiempo aproximado de seis meses.

Cloruro de Sodio (NaCl) 5 M

1. Se identifica el peso molecular de cloruro de sodio (NaCl), el cual es 58,44 g / mol. Se preparan 200 mL de solución madre de NaCl de concentración 5 M (mol / L).
2. Se utilizan las ecuaciones [i] y [ii], respectivamente. De la ecuación [i] se despeja el número de moles (ecuación [iv]).
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - 200 mL = 0,2 L
 - $n = 5 \text{ M (mol / L)} \times 0,2 \text{ L}$
 - Se opera, se cancelan las unidades respectivas y da $n = 1$ mol.

3. De la ecuación [ii] se despejan los gramos de la sustancia (ecuación [v]).
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - Gramos = 1 mol x 58,44 g / mol
 - Se opera y se cancelan las unidades correspondientes. Se obtiene que se necesitan 58,44 g para preparar una solución de NaCl 5 M.
4. Se pesan 58,44 g en la balanza de precisión y lentamente se agregan los 200 mL de AD en el frasco de vidrio y se agitan durante 15 s. Luego se coloca la cinta indicadora de esterilización y se lleva a autoclavar, bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1, paso 2 del procedimiento.
5. La solución se almacena a temperatura ambiente o en la nevera a 4 °C, durante un tiempo aproximado de seis meses.

Dodecilsulfato Sódico (SDS) al 10 % (P / V)

1. Se reconoce la unidad de concentración de la solución, la cual corresponde a % p / v.
2. En este caso, la concentración a obtener (10 %) indica que la solución presenta 10 g de Dodecilsulfato Sódico (SDS) por cada 100 mL de solución.
3. Se requiere obtener 200 mL de solución, por lo cual, usando los datos disponibles, se plantea una regla de tres.
 - 10 g de SDS → 100 mL de solución
 - X → 200 mL
4. Se opera, se cancelan las unidades respectivas y da como resultado X= 20 g de SDS para obtener una solución al 10 %.
5. Se pesan 20 g en la balanza de precisión y lentamente se agregan los 200 mL de AD en el frasco de vidrio y se agitan durante 15 s. Luego se coloca la cinta indicadora de esterilización y se lleva a autoclavar, bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1, paso 2 del procedimiento.
6. Se deja enfriar y se almacena a temperatura ambiente o en la nevera a 4 °C, durante un tiempo aproximado de seis meses.

Preparación de tampón de Extracción SDS

En la Tabla 3 se presenta un resumen de los reactivos y su concentración para la preparación del tampón de extracción SDS. Además, las concentraciones de las soluciones madre, previamente preparadas.

Tabla 3. Resumen de reactivos con su concentración, para preparación del tampón de extracción SDS

Nombre del reactivo	Concentración de solución madre	Concentración para la preparación del tampón SDS
Tris-HCl	1 M	200 mM
EDTA	0,1 M	10 mM
NaCl	5 M	500 mM
SDS	10 %	1 %

1. Se preparan 200 mL de tampón de extracción. Para ello se usa la ecuación [iii] y se despeja el volumen (ecuación [vi]).
 - La ecuación se reemplaza con los valores para cada reactivo usado, para hacer la solución.
2. Para Tris-HCl:
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - $V_1 = (200 \text{ mM} \times 200 \text{ mL}) / (1000 \text{ mM})$
 - Se opera, se cancelan las unidades respectivas y da como resultado $V_1 = 40 \text{ mL Tris-HCl}$.

3. Para EDTA:
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - $V_1 = (10 \text{ mM} \times 200 \text{ mL}) / (1000 \text{ mM})$
 - Se opera, se cancelan las unidades respectivas y da como resultado $V_1 = 20 \text{ mL EDTA}$.
4. Para NaCl:
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - $V_1 = (500 \text{ mM} \times 200 \text{ mL}) / (5000 \text{ mM})$
 - Se opera, se cancelan las unidades respectivas y da como resultado $V_1 = 20 \text{ mL NaCl}$.
5. Para SDS:
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - $1\% = 0,01$
 - $V_1 = (0,01 \times 200 \text{ mL}) / (0,10)$
 - Se opera, se cancelan las unidades respectivas y da como resultado $V_1 = 20 \text{ mL SDS}$.
6. Se agrega a un frasco estéril el volumen de cada solución y se ajusta el volumen a 200 mL con AD. Luego se homogeneiza la solución usando el agitador magnético y la plancha de agitación.
7. La solución madre se almacena a temperatura ambiente o en la nevera a 4 °C, durante un tiempo aproximado de seis meses.

5.2.8 Acetato de Amonio 7,5 M

5.2.8.1 Materiales

- Acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$) 7,5 M.
- Agua destilada (AD).
- Frasco de vidrio estéril de 200 mL.
- Balanza analítica.
- Espátula.
- Cinta indicadora de esterilización y rotulador permanente.

5.2.8.2 Procedimiento

1. Se preparan 200 mL de acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$) 7,5 M (mol / L). Para ello se utilizan las ecuaciones [i] y [ii], respectivamente. De la ecuación [i] se despeja el número de moles (ecuación [iv]).
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - $200 \text{ mL} = 0,2 \text{ L}$
 - $n = 7,5 \text{ M (mol / L)} \times 0,2 \text{ L}$
 - Se opera, se cancelan las unidades correspondientes y se obtiene como resultado $n = 1,5 \text{ moles}$.
2. De la ecuación [ii] se despejan los gramos de la sustancia (ecuación [v]).
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - $\text{Gramos} = 1,5 \text{ moles} \times 77,0825 \text{ g / mol}$
 - Se opera y se cancelan las unidades correspondientes. Se obtiene que se necesitan 115,62 g de $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ 7,5 M para preparar 200 mL de solución.
3. Se pesan 115,62 g en la balanza de precisión y lentamente se agregan 200 mL de AD en el frasco estéril. Se agitan por 15 s, se coloca la cinta indicadora de esterilización y se lleva a autoclavar, bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1, paso 2 del procedimiento.
4. La solución se almacena a temperatura ambiente durante un tiempo aproximado de seis meses.

5.2.9 Cloruro de Sodio 5 M

5.2.9.1 Materiales

- Cloruro de sodio (NaCl) 5 M (g).
- Agua destilada (AD).
- Frasco de vidrio estéril de 200 mL.
- Balanza analítica.
- Espátula.
- Cinta indicadora de esterilización y rotulador permanente.

5.2.9.2 Procedimiento

1. Se preparan 200 mL (0,2 L) de cloruro de sodio (NaCl) 5 M (mol / L). Para ello se utilizan las ecuaciones [i] y [ii], respectivamente. De la ecuación [i] se despeja el número de moles (ecuación [iv]).
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - $200 \text{ mL} = 0,2 \text{ L}$
 - $n = 5 \text{ M (mol / L)} \times 0,2 \text{ L}$
 - Se opera, se cancelan las unidades correspondientes y se obtiene como resultado $n = 1 \text{ mol}$.
2. De la ecuación [ii] se despejan los gramos de la sustancia (ecuación [v]).
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - $\text{Gramos} = 1 \text{ mol} \times 58,44 \text{ g / mol}$
 - Se opera y se cancelan las unidades correspondientes. Se obtiene que se necesitan 58,44 g de NaCl 5 M para preparar 200 mL de solución.
3. Se pesan 58,44 g en la balanza y lentamente se agregan 200 mL de AD en el frasco estéril. Se agitan durante 15 s, se coloca la cinta indicadora de esterilización y se lleva a autoclavar, bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1, paso 2 del procedimiento.
4. La solución se almacena a temperatura ambiente, durante un tiempo aproximado de seis meses.

5.2.10 Tampón Tris-EDTA (TE) 1 X

5.2.10.1 Materiales

- Hidroximetil aminometano (Tris)-ácido clorhídrico (HCl) 10 mM [pH 8,0].
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM [pH 8,0].
- Agua destilada (AD).
- Frasco de vidrio estéril de 200 mL.
- Probeta graduada.
- Balanza analítica.
- Plancha de agitación y agitador magnético.
- Medidor de pH.
- Espátula.
- Cinta de enmascarar o formato de identificación y rotulador permanente.
- Cinta indicadora de esterilización.

5.2.10.2 Procedimiento

A partir de las soluciones madre de Tris-HCl y EDTA, preparadas en la sección 5.1.13, se prepara el tampón TE 1 X, teniendo en cuenta las concentraciones necesarias para esta solución (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de reactivos con su concentración para la preparación del tampón TE 1 X

Nombre del reactivo	Concentración de solución madre	Concentración para la preparación del tampón SDS
Tris-HCl EDTA	1 M 0,1 M	10 mM 1 mM

1. Se preparan 200 mL de tampón Tris-EDTA (TE) 1 X. Para ello se usa la ecuación [iii] y se despeja el volumen (ecuación [vi]).
2. Para Tris-HCl:
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - $V_1 = (10 \text{ mM} \times 200 \text{ mL}) / (1000 \text{ mM})$
 - Se opera, se cancelan las unidades respectivas y da como resultado $V_1 = 2 \text{ mL Tris-HCl}$.
3. Para EDTA:
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - $V_1 = (1 \text{ mM} \times 200 \text{ mL}) / (1000 \text{ mM})$
 - Se opera, se cancelan las unidades respectivas y da como resultado $V_1 = 0,2 \text{ mL EDTA}$.
4. Se agrega a un frasco estéril el volumen de cada solución y se ajusta el volumen a 200 mL con AD. Luego se homogeneiza la solución, usando el agitador magnético y la plancha de agitación.
5. La solución madre se almacena a temperatura ambiente o en la nevera a 4 °C, durante un tiempo aproximado de seis meses.

5.2.11 Tampón ácido bórico (SB) 50 X

5.2.11.1 Materiales

- Ácido bórico (H_3BO_3).
- Hidróxido de sodio (NaOH).
- Agua destilada (AD).
- Balanza analítica.
- Frasco de vidrio de 1 L.

5.2.11.2 Procedimiento

1. Se calcula la cantidad de hidróxido de sodio (NaOH) y de ácido bórico (H_3BO_3) que se necesita para preparar el volumen deseado de la solución. Se debe tener en cuenta que para preparar 1 L de tampón SB se necesitan 20 g de NaOH y 100 g de H_3BO_3 .
2. En un frasco de vidrio se agregan los 20 g de NaOH en 300 mL de AD y se realizan movimientos circulares para mezclar los ingredientes. Luego se agrega H_3BO_3 en pequeñas cantidades y se va revolviendo con el AD, hasta alcanzar un volumen de 1 L.
3. Se coloca la cinta indicadora de esterilización y la solución se lleva a autoclavar, bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1, paso 2 del procedimiento.
4. La solución madre se almacena a temperatura ambiente o en la nevera a 4 °C, durante un tiempo aproximado de seis meses. Se realizan las diluciones que se requieran usando la ecuación [iii] y [vi].

5.2.12 Dodecilsulfato Sódico (SDS) al 10 % (P / V)

5.2.12.1 Materiales

- Dodecilsulfato sódico (SDS) en polvo o gránulos.
- Agua destilada (AD).
- Frasco de vidrio de 200 mL.
- Probeta graduada.
- Balanza analítica.
- Plancha de agitación y agitador magnético.
- Espátula.
- Cinta de enmascarar o formato de identificación y rotulador permanente.
- Cinta indicadora de esterilización.

5.2.12.2 Procedimiento

1. Se reconoce la unidad de concentración de la solución, la cual corresponde a % p / v.
2. En este caso la concentración a obtener (10 %) indica que la solución presenta 10 g de dodecilsulfato sódico (SDS) por cada 100 mL de solución.
3. Se requiere obtener 200 mL de solución, por lo cual, usando los datos disponibles se plantea una regla de tres.
 - 10 g de SDS → 100 mL de solución
 - X → 200 mL
 - Se opera, se cancelan las unidades respectivas y da como resultado X= 20 g de SDS para obtener una solución al 10 %.
4. Se pesan 20 g en la balanza de precisión y lentamente se agregan los 200 mL de AD en el frasco de vidrio y se agita durante 15 s. Luego se coloca la cinta indicadora de esterilización y se lleva a autoclavar, bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1, paso 2 del procedimiento.
5. Se deja enfriar y se almacena a temperatura ambiente, o en la nevera a 4 °C, durante un tiempo aproximado de seis meses.

5.2.13 Preparación de Sacarosa al 10 %

5.2.13.1 Materiales

- Sacarosa ultra pura.
- Agua destilada (AD).
- Balanza analítica.
- Frasco de vidrio de 200 mL.
- Cinta indicadora de esterilización y rotulador permanente.

5.2.13.2 Procedimiento

1. Se utiliza la formula [iii] y se despeja la variable que se quiere encontrar (ecuación [vi]).
2. Se tiene una concentración de 100 %, que corresponde a 100 g / 100 mL de sacarosa. En este caso, el volumen inicial se desconoce. La concentración final corresponde al 10 % (0,1 g / mL) y el volumen que se quiere obtener es 100 mL. El volumen por obtener dependerá del número de muestras que se quieran colocar en sacarosa, teniendo en cuenta que por cada muestra se añade 1 mL de esta solución. Se despeja el volumen inicial, dando como resultado 10 g de sacarosa diluidos en 100 mL de AD.
3. Se agita la solución y se almacena a temperatura ambiente.

5.2.14 Preparación de 2, 3, 5-Trifeniltetrazolio al 1 %

5.2.14.1 Materiales

- 2, 3, 5-trifeniltetrazolio concentración original (TZ) (100 %).
- Agua destilada (AD).
- Balanza analítica.
- Frasco de vidrio oscuro de 200 mL.
- Cinta indicadora de esterilización y rotulador permanente.

5.2.14.2 Procedimiento

1. Se utiliza la ecuación [iii] y se despeja la variable que se quiere encontrar (ecuación [vi]).
2. Se tiene una concentración inicial de 100 % para 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (TZ). El volumen inicial se desconoce. La concentración final corresponde al 1 % y el volumen que se quiere tener es 100 mL.
 - La ecuación se reemplaza con los valores:
 - 100 % = 1
 - 10 % = 0,1
 - $V_1 = (0,01 \times 100 \text{ mL}) / (1)$
 - Se opera, se cancelan las unidades respectivas y da como resultado $V_1 = 1 \text{ mL}$ de TZ al 10 %.
3. Se despeja el volumen inicial, dando como resultado 1 mL de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio al 100 %. La cantidad de volumen restante se complementa con AD, es decir 99 mL.
4. La solución se agita y se almacena a 4 °C en la nevera.

5.2.15 Preparación de Medio Celulosa / 1L

5.2.15.1 Materiales

- Frasco de vidrio tapa rosca de 250 mL para preparar 200 mL de medio, con el fin de evitar contaminación y facilitar la manipulación al dispensar el medio.
- Probeta de 1000 mL.
- Plancha de agitación y calentamiento.
- Balanza analítica.
- Agua destilada (AD).
- Cinta indicadora de esterilización.
- Cinta de enmascarar o formato de identificación y rotulador permanente.
- Agar-agar 12 g en polvo o gránulos.
- Celulosa 10 g.
- Extracto de levadura 0,1 g.
- Cloruro de potasio (KCl) 0,1 g.
- Sulfato de magnesio (MgSO₄) 0,1 g.
- Fosfato de potasio dihidrogenado (KH₂PO₄).
- Nitrato de sodio (NaNO₃).
- 5 mL de ácido láctico al 25 %.

Nota: se obtienen resultados confiables usando reactivos de la marca de laboratorios *Merck*.

5.2.15.2 Procedimiento.

1. Se hace uso de la probeta para medir el AD requerida, de acuerdo con la cantidad medio que se vaya a preparar.
2. El agua se dispone en el frasco de vidrio tapa rosca, el cual se ubica sobre la plancha de agitación con temperatura a 50 °C, la que a su vez contiene un imán de agitación.

3. Se pesan los reactivos en la balanza analítica utilizando un recipiente de acetato, para evitar perder reactivo al depositarlo en el frasco de vidrio. El último reactivo que se pesa es la celulosa, puesto que es muy liviano y se puede perder con la mínima corriente de aire generada.
4. La solución conseguida se mezcla hasta incorporar y homogenizar todos los reactivos. Se puede aumentar la temperatura y la agitación para acelerar el proceso. Se tapa el frasco sin sellar completamente, para que se esterilice de forma correcta. Sobre la tapa se coloca la cinta indicadora de esterilización y la cinta de enmascarar con el nombre del medio y la fecha de preparación. Posteriormente esta solución se lleva a autoclavar, bajo las condiciones mencionadas en la sección 5.1.1, paso 2 del procedimiento.
5. Al finalizar el proceso de autoclavado el frasco se retira de la máquina y se deja que el medio de cultivo enfríe sobre un mesón, hasta alcanzar 38 °C. Al momento de dispensar el medio en cajas Petri, por cada litro se agregan 5 mL de ácido láctico al 25 % (Anexo 5.2.4). Se debe agitar el frasco con movimientos circulares suaves para que se distribuya la celulosa y quede bien homogenizado el medio en las cajas Petri. Este se deja enfriar dentro de la cámara de flujo laminar.
6. De tener que utilizar el medio. Posteriormente, se guarda en la nevera a 4 °C. Al momento de hacer uso se derrite en el microondas, se dispensa en las cajas Petri y se dejar enfriar en la cámara de flujo laminar (ver sección 1.3, paso 1 del procedimiento).

5.3 Esquemas

5.3.1 Esquema 1

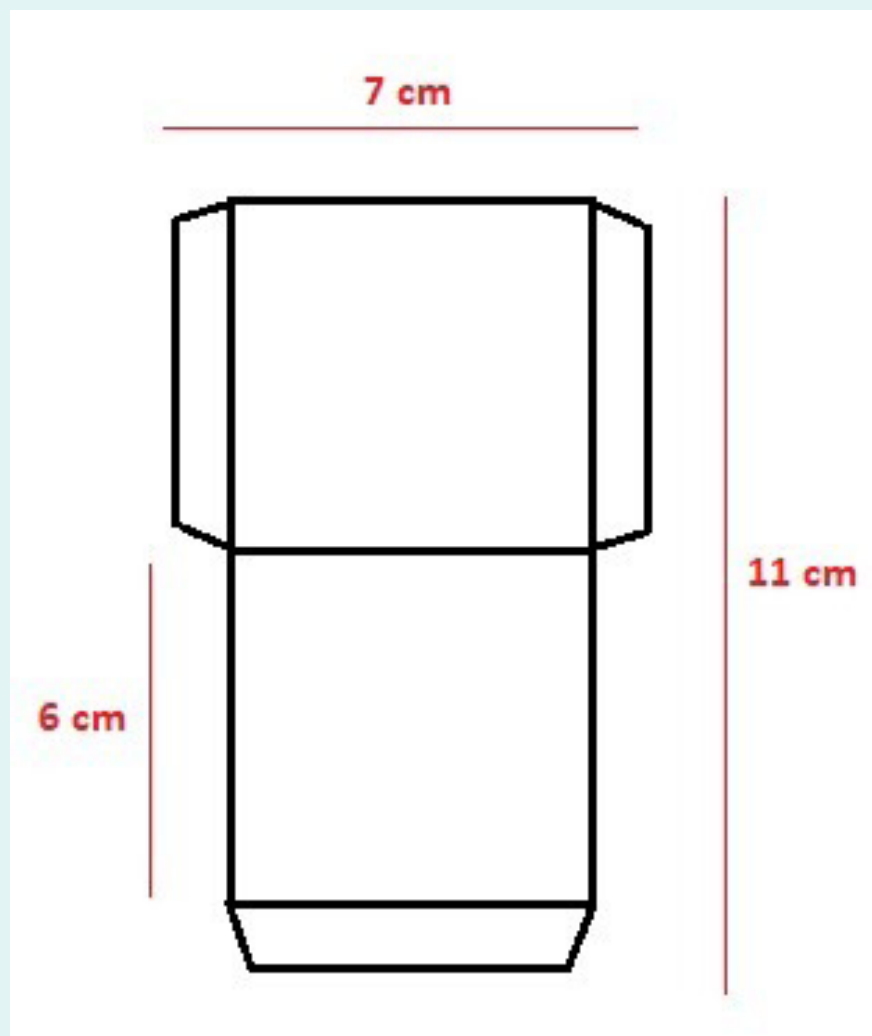
Ejemplo de matriz de Excel para ordenar los respectivos datos

Código planta	Número raíz	Código caja Petri	Código hongo	Fecha desiembrade cortes transversales	Fecha de cultivo puro	Descripción del aislamiento	
						Macroscópicas	Microscópicas
C3	C3R2	C3R2#1.1	C3R2#1.1	08/09/21	15/09/21	Colonia irregular e hialina. En seis días abarca toda la caja Petri.	Formación de ángulos rectos, crecimiento esbelto.

Nota. El investigador puede agregar o eliminar columnas según su criterio.

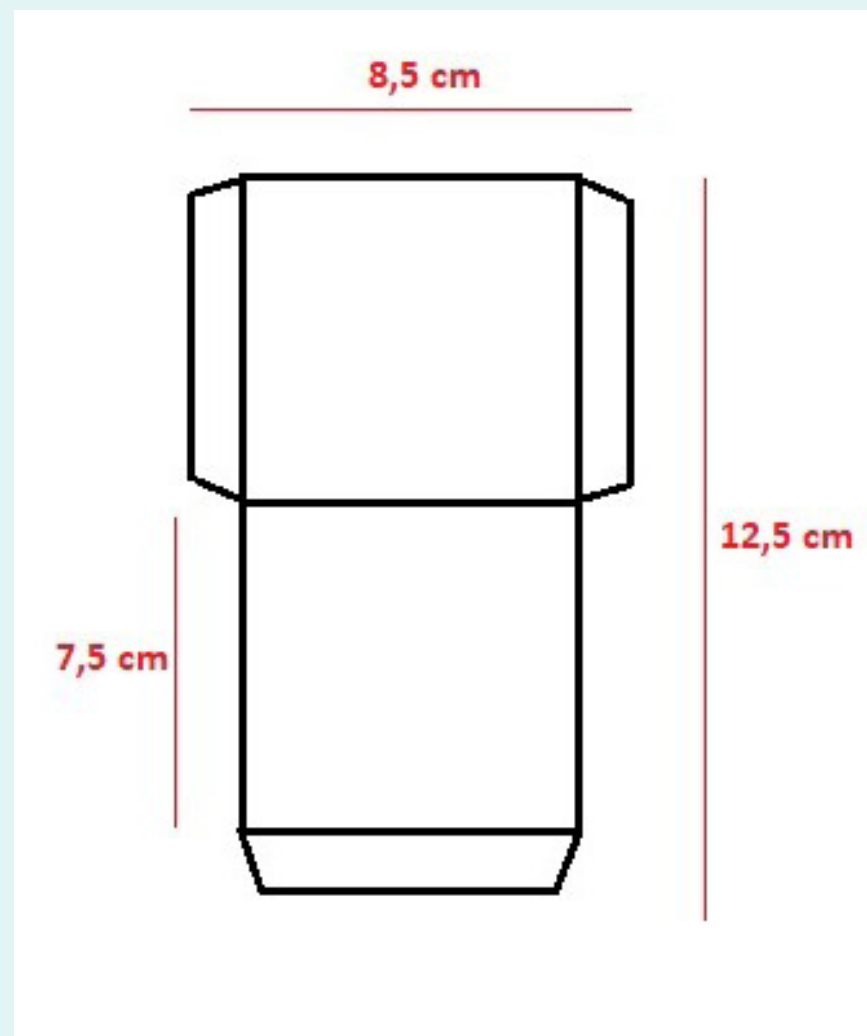
5.3.2 Esquema 2

Plantilla de paquetes pequeños para conservación *ex situ* de HMO.



5.3.3 Esquema 3

Plantilla de paquetes grandes para conservación *ex situ* de HMO.



Glosario

ABIF: formato de archivo binario para almacenar datos.

Anamorfo: expresión de reproducción asexual de un hongo.

Clado: filogenéticamente, es una rama de un árbol filogenético, la cual agrupa un conjunto de linajes emparentados que comparten un ancestro en común.

Células monilioides: ramilletes de células cortas y anchas, de forma oval o triangular, que en conjunto pueden originar esclerocios.

Córtex: región de la raíz, comprendida entre la rizodermis y el cilindro central.

Cebador: secuencia monocatenaria de nucleótidos, conocida como oligonucleótido. En el método de PCR, un par de cebadores se hibridan con el ADN de muestra y acotan la región que se amplificará.

Dehiscencia de frutos: al alcanzar la madurez, los frutos abren naturalmente para dejar salir y dispersar sus semillas.

Desinfectar: eliminar todos los microorganismos del tejido.

Desinfestar: eliminar parcialmente los microorganismos del tejido.

Endospermo: tejido que rodea y nutre al embrión en las semillas de angiospermas.

Esclerocios: estructura somática de resistencia de los hongos; son masas compactas de micelio.

Epífitas: plantas que crecen sobre otro organismo vegetal, con el fin de tener un soporte para su crecimiento y desarrollo, sin afectar negativamente al hospedero.

Espectrofotómetro: equipo que mide la capacidad de absorbancia de luz en un compuesto presente en una solución muestra.

Ex situ: fuera de su habitat natural.

Flamear: método de desinfección térmico por fuego directo, al colocar en la llama del mechero el objeto que se desea esterilizar.

Forófito: árbol hospedero de las orquídeas epífitas.

Género-forma *Rhizoctonia*: grupo de hongos que generalmente forman asociaciones micorrízicas con orquídeas.

Hialino(a): término usado en biología para indicar transparencia de un tejido.

Inóculo micelial: conjunto de hifas de un hongo, que al ser transferido a otro medio de cultivo artificial u hospedero tiene la capacidad de crecer y desarrollarse.

In situ: en el habitat natural.

In vitro: bajo condiciones controladas en laboratorio o invernadero.

Locus: sitio físico en el genoma (gen u otro segmento de ADN de interés).

ARNr-ITS: es la región del espaciador transcrito interno (ITS) del cistron ribosómico nuclear. Este locus ha sido adoptado para la identificación de hongos por medio de código de barras de la vida.

Micelio: soma (cuerpo) del hongo o del protista.

Micorriza: asociaciones simbióticas entre algunos hongos y las raíces de las plantas vasculares.

Microcultivo: procedimiento que permite la observación de las estructuras microscópicas de los hongos filamentosos o protistas.

Mutualismo: relación estrecha entre dos poblaciones en el que ambas se benefician.

Pelotón: enrollamiento hifal que se encuentra en el córtex (parénquima cortical) de las raíces de las orquídeas.

Pellet: porción de material aglomerado o comprimido.

Secuencia forward: también conocida como secuencia directa, es una cadena de nucleótidos delimitada por el cebador que amplifica en la dirección 5' a 3'.

Secuencia reverse: también conocida como secuencia inversa, es una cadena de nucleótidos delimitada por el cebador que amplifica en la dirección 3' a 5'.

Simbiosis mutualista: relación obligatoria dependiente entre dos organismos o poblaciones diferentes, en la que ambas se benefician.

Sobrenadante: líquido que queda sobre un precipitado.

Taq ADN Polimerasa: enzima termoestable que cataliza la reacción de replicación de ADN en PCR.

Teleomorfo: expresión de la reproducción sexual de un hongo.

Estrategias tróficas: formas en que los organismos obtienen nutrientes o alimento.

Velamen: tejido modificado de la epidermis de las raíces de las plantas, que cumplen la función de albergar humedad.

6 Referencias

- Agrios, N. G. (2002). *Fitopatología* (2 ed.) (Plant Pathology, trad.). Editorial Limusa, S.A.
- Altman, F. P. (1976). Tetrazolium Salts and Formazans. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 9(3), III-51. [https://doi.org/10.1016/S0079-6336\(76\)80015-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6336(76)80015-0)
- Andresen, E., Arroyo-Rodríguez, V. y Escobar, F. (2018). Tropical biodiversity: The importance of biotic interactions for its origin, maintenance, function, and conservation. En W. Dáttilo y V. Rico-Gray (eds.), *Ecological networks in the tropics* (pp. 1-13). Springer y Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68228-0_1
- Bayman, P., Mosquera-Espinosa, A. T., Saladini-Aponte, C. M., Hurtado-Guevara, N. C. y Viera-Ruiz, N. L. (2016). Age-Dependent Mycorrhizal specificity in an invasive orchid, *Oeceoclades Maculata*. *American Journal of Botany*, 103(11), 1880-1889. <https://doi.org/10.3732/ajb.1600127>
- Berger, F. (2003). Endosperm: The crossroad of seed development. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(1), 42-50. <https://doi.org/10.1016/S1369526602000043>
- Bertolini, V., Cruz-Blasi, J., Damon, A. y Mora, J. V. (2014). Seasonality and mycorrhizal colonization in three species of epiphytic orchids in southeast Mexico. *Acta Botanica Brasilica*, 28(4), 512-518. <https://doi.org/10.1590/0102-33062014abb3436>
- Bidartondo, M. I. y Read, D. J. (2008). Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology*, 17(16), 3707-3716. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03848.x>
- Calderón-Sáenz, E. (2006). *Libro rojo de plantas de Colombia* (vol. 6). *Orquídeas, primera parte*. Instituto Alexander von Humboldt-Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. <http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/31410>
- Cameron, D. D., Leake, J. R. y Read, D. J. (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. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01767.x>
- Castellanos, G., Jara C. E. y Mosquera, G. (2011). *Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Castillo-Pérez, L. J., Martínez-Soto, D., Maldonado-Miranda, J. J., Alonso-Castro, A. J. y Carranza-Álvarez, C. (2019). The endemic orchids of Mexico: a review. *Biología*, 74(1), 1-13. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0147-x>
- Dearnaley, J. D., Martos, F. y Selosse, M. A. (2012). 12 orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects. En B. Hock (ed.), *Fungal associations* (2 ed.) (vol. 9) (pp. 207-230). Springer. Recuperado desde https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-30826-0_12
- Dotmatics. (s.f.). *Bioinformatics software for Sequence Data Analysis*. Geneious. Recuperado desde <https://www.geneious.com/>
- Fay, M. F. (2018). Orchid conservation: how can we meet the challenges in the twenty-first century? *Botanical Studies*, 59(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s40529-018-0232-z>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (1992). Guide de manipulation des semences forestières dans le cas particulier des régions tropicales. En R. L. Willan (ed.), *Guide de manipulation des semences forestières*. FAO. Recuperado desde <https://www.fao.org/3/ad232f/ad232f00.htm>
- França-Neto, J. de B. y Krzyzanowski, F. C. (2019). Tetrazolium: An important test for physiological seed quality evaluation. *Journal of Seed Science*, 41(3), 359-366. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n3223104>
- Gale, S. W., Fischer, G. A., Cribb, P. J. y Fay, M. F. (2018). Orchid conservation: Bridging the gap between science and practice. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 186(4), 425-434. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy003>
- Hajong, S. y Kapoor, R. (2020). An amalgam of pathogenic and beneficial endophytic fungi colonizing four *Dendrobium* species from Meghalaya, India. *Journal of Basic Microbiology*, 60(5), 415-423. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900631>
- International Union for Conservation of Nature (s.f.). La lista roja de especies amenazadas de la IUCN. Recuperado julio 28, 2022, desde <https://www.iucnredlist.org>

- Kendon, J. P., Rajaovelona, L., Sandford, H., Fang, R., Bell, J. y Sarasan, V. (2017). Collecting near mature and immature orchid seeds for *ex situ* conservation: 'in vitro collecting' as a case study. *Botanical Studies*, 58, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40529-017-0187-5>
- Mahuku, G. S. (2004). A simple extraction method suitable for PCR- based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *International Society for Plant Molecular Biology*, 22, 71-81. <https://doi.org/10.1007/BF02773351%0A%0A>
- McCormick, M. K., Whigham, D. F. y O'Neill, J. (2004). Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*, 163(2), 425-438. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01114.x>
- Meng, Y. Y., Zhang, W. L., Selosse, M. A. y Gao, J. Y. (2019). Are fungi from adult orchid roots the best symbionts at germination? A case study. *Mycorrhiza*, 29(5), 541-547. <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00907-0>
- Merritt, D. J., Hay, F. R., Swarts, N. D., Sommerville, K. D. y Dixon, K. W. (2014). *Ex Situ* conservation and cryopreservation of orchid germplasm. *International Journal of Plant Sciences*, 175(1), 46-58. <https://doi.org/10.1086/673370>
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADS) y Universidad Nacional de Colombia (UNAL). (2015). *Plan para el estudio y la conservación de las orquídeas en Colombia*. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y Universidad Nacional de Colombia.
- Mosquera-Espinosa, A. T., Bayman, P. y Otero, J. T. (2010). *Ceratobasidium* como hongo micorrícico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronómica*, 59(3), 316-326. <https://www.researchgate.net/publication/236345937>
- Mosquera-Espinosa, A. T., Bayman, P., Prado, G. A., Gómez-Carabalí, A. y Tupac Otero, J. (2013). The double life of *Ceratobasidium*: Orchid mycorrhizal fungi and their potential for biocontrol of *Rhizoctonia solani* sheath blight of rice. *Mycologia*, 105(1), 141-150. <https://doi.org/10.3852/12-079>
- Ospina-Calderón, N. H., Torres-Torres, G. y Flanagan, N. S. (2021). Advances in orchid species conservation management in Colombia: *Cattleya quadricolor* Lindl. as a case study. *Orchid Conservation News- The Newsletter of the Orchid Specialist Group of the IUCN Species Survival Commission*. Recuperado febrero 21, 2022, desde www.iucnredlist.org
- Otero, J. T., Ackerman, J. D. y Bayman, P. (2004). Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, 13(8), 2393-2404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02223.x>
- Otero, J. T., Flanagan, N. S., Herre, E. A., Ackerman, J. D. y Bayman, P. (2007). Widespread mycorrhizal specificity correlates to mycorrhizal function in the neotropical, epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 94(12), 1944-1950. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.12.1944>
- Porrás-Alfaro, A. y Bayman, P. (2007). Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia*, 99(4), 510-525. <https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832545>
- Rasmussen, H. N. y Whigham, D. F. (2002). Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy. *New Phytologist*, 154, 797- 807. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00422.x>
- Rasmussen, H. N. y Rasmussen, F. N. (2009). Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos*, 118, 334-345. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.17116.x>
- Rasmussen, H. N. y Rasmussen, F. N. (2014). Seedling mycorrhiza: a discussion of origin and evolution in Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 175(3), 313-327. <https://doi.org/10.1111/boj.12170>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K. D., Bai, F. Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M. J., Blackwell, M. y Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Seaton, P. y Ramsay, M. (2009). *Cultivo de orquídeas por semillas*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Seifert, K. A. (2009). Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*, 9, 83-89. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02635.x>
- Selosse, M. A., Richard, F., He, X. y Simard, S. W. (2006). Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology y Evolution*, 21(11), 621-628. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.07.003>
- Smith, S. y Read, D. (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (3 ed). Academic Press, San Diego.
- Sneh, B., Burpee, L. y Ogoshi, A. (1991). *Identification of Rhizoctonia species*. The American Phytopathological Society.

- Stewart, S. L. y Kane, M. E. (2007). Symbiotic seed germination and evidence for *in vitro* mycobiont specificity in *Spiranthes brevilabris* (Orchidaceae) and its implications for species-level conservation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 43(3), 178-186. <https://doi.org/10.1007/s11627-006-9023-4>
- Swarts, N. D. y Dixon, K. W. (2009). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, 104(3), 543-556. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp025>
- Suárez, J. P., Weiß, M., Abele, A., Garnica, S., Oberwinkler, F. y Kottke, I. (2006). Diverse tulasnelloid fungi form mycorrhizas with epiphytic orchids in an Andean cloud forest. *Mycological Research*, 110(11), 1257-1270. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.08.004>
- Taylor, D. L. y McCormick, M. K. (2008). Internal transcribed spacer primers and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytologist*, 177: 1020-1033. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02320.x>
- Tedersoo, L., Bahram, M. y Zobel, M. (2020). How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. *Science*, 367(6480). <https://doi.org/10.1126/science.aba1223>
- U.S. National Library of Medicine. (s.f.). *Blast: Basic local alignment search tool*. National Center for Biotechnology Information. Recuperado desde <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Valentini, A., Pompanon, F. y Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2), 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.011>
- Vásquez, R., Ibsch, P. L. y Gerkmann, B. (2003). Diversity of Bolivian Orchidaceae-A challenge for taxonomic, floristic and conservation research. *Organisms Diversity and Evolution*, 3(2), 93-102. <https://doi.org/10.1078/1439-6092-00061>
- Velasco, R. (2005). Marcadores moleculares y la extracción de ADN. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 3(1), 14-18. Recuperado desde <http://revistabiotecnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biotecnologia/article/viewFile/19/12>
- Willis, K. (2017). *State of the world's plants 2017*. Royal Botanic Gardens Kew.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322. Recuperado desde <https://msafungi.org/wpcontent/uploads/2019/03/February-2013-Inoculum.pdf>
- Yang, R. H., Su, J. H., Shang, J. J., Wu, Y. Y., Li, Y., Bao, D. P. y Yao, Y. J. (2018). Evaluation of the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS), specifically ITS1 and ITS2, for the analysis of fungal diversity by deep sequencing. *PLoS ONE*, 10, 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206428>
- Zettler, L. W., Corey, L. L., Jacks, A. L., Gruender, L. T. y Lopez, A. M. (2013). *Tulasnella irregularis* (Basidiomycota: Tulasnellaceae) from roots of *Encyclia tampensis* in south Florida, and confirmation of its mycorrhizal significance through symbiotic seed germination. *Lankesteriana*, 13(1-2), 119-128. <https://doi.org/10.15517/lank.v0i0.11552>
- Zi, X. M., Sheng, C. L., Goodale, U. M., Shao, S. C. y Gao, J. Y. (2014). *In situ* seed baiting to isolate germination-enhancing fungi for an epiphytic orchid, *Dendrobium aphyllum* (Orchidaceae). *Mycorrhiza*, 24(7), 487-499. <https://doi.org/10.1007/s00572-014-0565-8>

