



El Colegio de la Frontera Sur

Acercamiento proteómico en la relación simbiótica entre la orquídea *Oncidium sphacelatum* y el hongo RG26

TESIS

presentada como requisito parcial para optar al grado de
Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

Por

Mariana Yadira López Chávez

2015

*Este trabajo se lo dedico a mis padres, abuelos, hermanos y sobrinos por su amor
brindado en todo momento.*

*Audrey Chávez de los Santos,
Jorge López Tanahubia,
Adelaida de los Santos Cigarroa,
Andrés Chávez Morales,
Madai López Chávez,
Wendy Karina Chávez de los Santos,
Selene Chávez de los Santos,
Andrés Chávez de los Santos,
Rebeca Méndez López,
Manasés Méndez López.*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado la beca para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de la Frontera Sur por haberme dado la oportunidad de estudiar dentro del programa de la Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural con orientación en Biotecnología Ambiental.

A la Dra. Griselda Karina Guillén Navarro por permitirme aprender y conocer el mundo de la ciencia a través de su papel nato de investigadora, desde su sencillez y calidad humana, desde su diplomacia y liderazgo, desde su perseverancia y exigencia, desde ella misma. Te agradezco enormemente tu ardua labor puesta sobre tus hombros de gigante para guiarme, enseñarme y formarme como cual humano a lograr sus primeros pasos en este camino de métodos, de hipótesis, de preguntas, de metagenomas, de proteomas. ¡Muchas gracias Karina!

Al consejo tutelar, conformado por el Dr. Vincenzo Bertolini, la Dra. Anne Damon y la Dra. Irene Sánchez Moreno, por haberme aceptado a trabajar en su universo de micorrizas, de orquídeas y de proteínas. Así también por haber sido un gran equipo dedicado, objetivo, paciente, dinámico y de simbiosis. Les agradezco mucho.

A la M. C. Guadalupe Nieto por el análisis de Microscopía electrónica de barrido.

Al M. C. Luis Barbosa por su apoyo en el análisis de visión computacional.

Al M. C. Alejandro Zamora por su contribución en la extracción de proteínas y asesoría en la reconstrucción filogenética de RG26.

Al Dr. Sergio Encarnación y a la M. en BT. Magdalena Hernández Ortiz por el análisis proteómico.

Al Dr. Jaime Gómez, el Dr. Ernesto Sánchez, el Dr. Jorge Torres y la Dra. Graciela Huerta por el préstamo de alguno de sus equipos y reactivos.

Al Dr. Alejandro Morón y al M. C. Sergio Gómez por su valioso apoyo en la materia de Diversidad y Funcionamiento de Ecosistemas.

Al personal docente del tronco común y de las optativas por su valiosa enseñanza durante mi paso en las aulas.

A los integrantes del Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Agroecológica (LaBTAA) por sus invaluable aventuras científicas, enseñanzas, y por la gran amistad les agradezco: David Herrera, Verónica García, Ricardo Castro, Ángeles Calixto, Gamaliel Mejía, Rockael Vázquez, Alejandra López, Rubén Gutiérrez, Flor Ordoñez.

A mis compañeros de generación: Jaime Pineda, Antonio Digueros, Sinue Fuentes, Emanuel Campuzano, David Chamé, Francisco Gómez, Jorge Luis Hernández, Gloria Mariel Suárez, Edwin Ramírez, Guadalupe Coapio, Miriam Peña, José Luis Quintero, Oscar Mikery, Brenda Meza, Ulises López, Rosa Icela Cigarroa, Brenda Chávez, Rodolfo Muñoz, Enrique Nava, José Guadalupe Chan, Habacuc Lorenzo, por conocerles y haber compartido muchos momentos valiosos con ustedes.

A Mónica Solís, Frank Vázquez, Adelina Caño, Carlos Salas, Santiago Victorio, Mariana Regil, Vilma Castellanos, Elena González y Antonio Flores por su inmensa amistad.

A Guillermo Santillana por su cariño y buenos deseos en la distancia.

ÍNDICE

	Páginas
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	6
1.1 Objetivo general.....	10
1.2 Objetivos específicos.....	10
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	11
2.1 Orquídeas.....	11
2.1.1 Generalidades de la familia Orchidaceae.....	11
2.1.1.1 Formas de vida y distribución.....	12
2.1.2 Generalidades de la vida epífita.....	13
2.1.2.1 Orquídeas epífitas.....	14
2.1.3 Orquídeas de México.....	15
2.2 Micorrizas.....	17
2.2.1 Definición.....	17
2.2.2 Clasificación.....	18
2.2.3 Micorrizas de orquídeas.....	19
2.2.4 Hongo RG26.....	21
2.3 Proteómica.....	23
2.3.1 Generalidades de la proteómica.....	23
2.3.2 Procesamiento de la muestra.....	24
2.3.3 Proteómica en orquídeas.....	26
CAPÍTULO III METODOLOGÍA	28
CAPÍTULO IV ARTÍCULO	29
CAPÍTULO V CONCLUSIONES	60
LITERATURA CITADA	62

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

Las orquídeas epífitas son plantas que se caracterizan por vivir sobre las ramas y/o los troncos de los árboles. Dado que varias especies producen flores muy bellas de una gran variedad de colores, tamaños y formas, algunas orquídeas han sido extraídas de forma ilegal de su hábitat con fines de comercialización (Téllez et al., 2007), provocando pérdidas en sus poblaciones (Solano-Gómez et al., 2007). Además del saqueo ilegal, existen otros factores que han contribuido al incremento de especies de orquídeas en peligro de extinción, siendo más importantes los cambios de uso de suelo y la tala de árboles (NOM-059-SEMARNAT-2010).

De manera natural, al no estar en contacto con la tierra, las orquídeas epífitas habitan en sitios con relativamente baja disponibilidad de agua. Por lo tanto poseen características fisiológicas semejantes a plantas desérticas, como la de mantener cerrados los estomas durante el día para evitar pérdidas de agua, como parte fundamental del metabolismo ácido de las crasuláceas (Valverde et al., 2005). Cabe mencionar que por lo general las plantas de orquídeas presentan una lenta tasa de crecimiento, además una baja tasa de polinización, compensado por el hecho de que en cada evento exitoso de polinización se producen miles de semillas diminutas y sin endospermo (Koopowitz, 2001).

Un proceso crucial en el desarrollo de las orquídeas es la asociación con determinadas especies de hongos, con los que tienen interacciones del tipo simbiótico (Smith y Read, 1996). Dicha asociación favorece la germinación de la semilla y la diferenciación, así también el crecimiento de la plántula, pues por parte del hongo micorrízico recibe nutrientes como nitrógeno y fósforo, además de inducir resistencia al ataque de patógenos presentes en el medio (Anaya, 2003). Entre los hongos micorrízicos que se asocian a orquídeas se encuentran principalmente los del grupo *Rhizoctonia*, los cuales

también participan como parásitos destructores cuando se asocian a otras familias de vegetales (Anaya, 2003).

En orquídeas terrestres se han realizado investigaciones relacionadas a los procesos asociados con este tipo de interacción, como la transferencia de nitrógeno y fósforo del hongo hacia la orquídea, la transferencia de carbono entre ambos organismos, y la expresión de genes inducidos por la interacción (Cameron et al., 2006; Dearnaley, 2007; Cameron et al., 2007; 2008). Durante la simbiosis entre *Anoectochilus roxburghii* (Lindl.) y *Epulorhiza* sp., mediante análisis de expresión diferencial, se hallaron genes putativos regulados por la interacción que codifica para un transportador transmembranal de aminoácidos, una uracilo fosforribosiltransferasa (EC 2.4.4.9) y una proteína hipotética (Li et al., 2012). Además, Li et al. (2012) encontraron un gen que codifica a tRNA-Lys y un pseudogen putativo codificante para una maturasa K, que solo se expresaron en la asociación simbiótica.

Para entender las interacciones entre planta-microorganismo (patógeno o no patógeno), actualmente se han empleado metodologías como filogenómica, metabolómica (Bonfante y Anca, 2009) y proteómica (Maldonado y Jorrín, 2008; El Hadrami et al., 2012; Jayaraman et al., 2012), que proveen información general de lo que está sucediendo dentro de los sistemas biológicos. Mediante la proteómica se han encontrado cerca de 400 proteínas asociadas a la simbiosis de tipo micorrízico en diversas especies vegetales (Bestel-Corre et al., 2004). Algunas proteínas identificadas participan en la señalización (TGF- β -receptor-interacción-proteína 1 y anexina), defensa (superóxido dismutasa, precursor de peroxidasas y chalcona reductasa), metabolismo (leucina aminopeptidasa y serina hidroximetiltransferasa) y en la regulación de genes (Aloui et al., 2009). A pesar de sus alcances, los estudios en los que se emplea la estrategia del análisis del proteoma

en orquídeas son escasos. Los reportes encontrados, en los que usan esta herramienta, han sido para identificar especies entre el género *Anoectochilus* (Gao et al., 2009) y para conocer los cambios en la diferenciación celular de especies de orquídeas de gran importancia comercial como *Vanilla planifolia* (Andrews) (Palama et al., 2010; Tan et al., 2013).

Para el caso de las orquídeas epífitas nativas en zonas tropicales, aún no han sido bien documentados los procesos de interacción. Cabe mencionar que la zona del trópico es la región con mayor diversidad de orquídeas epífitas (Koopowitz, 2001); solo en Chiapas, México, se tienen reportadas alrededor 568 especies (Wolf y Flamenco-Sandoval, 2005), de las cuales solo algunas han sido estudiadas para conocer e identificar sus posibles hongos micorrízicos (Ovando et al., 2005; Cruz, 2007), sin llegar a profundizar en el proceso de esa interacción. A pesar de ello, se han encontrado pocos estudios de expresión génica y proteómica enfocados a la asociación orquídea epífita-hongo. Por ejemplo, en la germinación simbiótica de *Dendrobium officinale* (Kimura y Migo) con la cepa *Sebacina* sp. se identificaron genes participantes del metabolismo de carbohidratos (UDP-glucosiltransferasa y β -glucosidasa), defensa de la planta y desarrollo de brotes (receptor quinasa rica en leucina), regulación de señales (sensores de calcio: CDPK1 y CDPK32), digestión del pelotón (quitinasa, β -1, 3-glucanasa), inducción de necrosis (elicitor fúngico), respuesta de defensa (proteína de respuesta a auxina) y en la síntesis de poliaminas (arginina decarboxilasa, S-adenosilmetionina decarboxilasa y espermidina sintasa) (Zhao et al., 2013). En la germinación simbiótica de *Oncidium sphacelatum* (Lindl.) con *Ceratobasidium* sp., mediante un análisis proteómico, se encontraron proteínas implicadas en la modulación de la homeóstasis de especies reactivas de

oxígeno, biosíntesis de carotenoides, fitoalexinas, metabolismo de energía y de señalización (Valadares et al., 2013).

Sin embargo, aún no se han definido genes o proteínas útiles como marcadores moleculares que ayuden a comprender los mecanismos de la interacción en orquídeas epífitas. Solamente se ha evaluado a los genes codificantes para nodulinas como marcadores de una relación mutualista en la orquídea terrestre *Serapias vomeracea* (Burm.f.) Briq. y el hongo *Tulasnella calospora* (Perotto et al., 2014). Cabe mencionar que existe una línea muy delgada en cuanto a la dirección de la interacción, esta puede resultar en desarrollo satisfactorio para ambos organismos (mutualista) o puede dirigirse a la destrucción de los tejidos vegetales por parte del hongo en su beneficio (patogenicidad). Por tanto, este trabajo tiene como objetivo identificar proteínas cuya expresión sea modulada por la relación simbiótica entre el hongo RG26 y los protocormos de la orquídea epífita *Oncidium sphacelatum*, mediante un análisis proteómico. Tal investigación se realizó para conocer los cambios en los proteomas de la orquídea y el hongo, así como también los producidos en la interacción entre ambos organismos, esto permitió identificar proteínas cuya expresión fue influenciada por dicha interacción. El presente estudio sienta las bases para posteriores investigaciones enfocadas al entendimiento de los mecanismos de simbiosis entre orquídeas nativas y sus respectivos hongos micorrízicos.

1.1 Objetivo general

Evaluar la interacción inespecífica entre *Oncidium sphacelatum* y el hongo micorrízico *Thanatephorus* sp. cepa RG26, a través de un análisis morfométrico y proteómico en condiciones *in vitro*.

1.2 Objetivos específicos

- Identificar la cepa RG26 a través de la secuencia del marcador molecular del espaciador interno transcrito (ITS, por sus siglas en inglés: *Internal Transcribed Spacer*) de la región del ácido desoxirribonucleico (ADN) ribosomal de hongos.
- Analizar los perfiles proteómicos de la orquídea *O. sphacelatum*, del hongo RG26 y de la asociación orquídea-hongo para identificar proteínas moduladas por la interacción.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1 Orquídeas

2.1.1 Generalidades de la familia Orchidaceae

La familia Orchidaceae pertenece al grupo de las plantas monocotiledóneas, cuenta con alrededor de 30,000 especies, lo cual representa aproximadamente el 10% del total de las plantas con flores existentes en el mundo (Koopowitz, 2001). Según la clasificación realizada por Dressler en 1993, la familia Orchidaceae se encuentra compuesta por cinco subfamilias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Orchidoideae, Spiranthoideae y Epidendroideae, y 24 tribus; siendo la Epidendroideae la que cuenta con el mayor número de géneros y especies (ver Tabla 1).

Tabla 1. Subfamilias de Orchidaceae (clasificación reportada por Dressler en el 1993).

Subfamilia	Género	Especie	Formas de vida	Referencia
Apostasioideae	2	8	Principalmente terrestre	Koopowitz, 2001
Cyripedioideae	4 a 5	200		Daviña et al. 2009
Orchidoideae	78	3630		Argue, 2012
Spiranthoideae	97	1200		Dueñas y Fernández-Alonso, 2007
Epidendroideae	550	6210	Principalmente epífita	Koopowitz, 2001

El término “orquídea” proviene del griego “*orchis*” y significa testículo, dicho nombre haciendo alusión a la forma de los bulbos de algunas orquídeas europeas (Cribb, 1999). Entre las características generales de este tipo de plantas se encuentran: 1) la presencia de tres sépalos y tres pétalos en su estructura floral, 2) la agrupación del polen formando una estructura llamada polinario, subdividida en 2, 4 o más masas de polen llamadas

polinias, las cuales, pueden contener cientos o miles de granos (Cribb, 1999), 3) la fusión parcial o completa de los órganos femeninos y masculinos (estambre y pistilo) en una estructura denominada columna y 4) el tamaño microscópico (alrededor de 0.15 - 6 mm) de las semillas carentes de endospermo (Dressler, 1981; Arditti y Ghani, 2001).

A pesar de la producción de miles de semillas por cada evento exitoso de polinización, no se garantiza la germinación y desarrollo de nuevas generaciones, porque se ha reportado la necesidad del establecimiento de una relación de tipo simbiótico entre las semillas y ciertas especies de hongos micorrízicos para lograr el desarrollo del embrión (Anaya, 2003).

2.1.1.1 Formas de vida y distribución

Las orquídeas han sido clasificadas en tres grupos de acuerdo al hábitat en donde se desarrollan: si crecen en la tierra son conocidas como terrestres, litófitas si se desarrollan sobre las rocas y epífitas son aquellas que viven sobre los troncos y ramas de los árboles (Sarmiento y Romero, 2000). En esta última forma de vida, el hospedero, anfitrión o forofito (árboles) es empleado como un soporte mecánico y dado que las orquídeas no adquieren nutrimentos dentro del forofito, son consideradas plantas no parásitas (Benzing, 1990).

Entre estas formas de vida, las epífitas son el grupo más abundante y diverso en zonas tropicales (Cribb, 1999), sin embargo, en las regiones templadas, son las orquídeas litófitas y terrestres las que dominan (Koopowitz, 2001). La sobrevivencia de las orquídeas en estos diversos nichos ecológicos es posible gracias a las adaptaciones fisiológicas y morfológicas, así como también de las estrechas interacciones bióticas

desarrolladas a lo largo de su historia evolutiva, permitiendo su distribución y diversidad en todo el mundo, principalmente en las zonas tropicales (Romero, 1996; Chase, 2005).

2.1.2 Generalidades de la vida epífita

Las epífitas son plantas vasculares (ejemplos: bromélias, orquídeas, helechos) y no vasculares (ejemplos: líquenes, musgos, briofitas) con crecimiento sobre árboles u otras plantas perennes, sirven de hábitat y fuente de alimento para distintos insectos, aves, mamíferos, anfibios y reptiles; además participan en el reciclaje de nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio y potasio (Erwin, 1983; Nadkarni y Matelson, 1989; Nadkarni y Matelson, 1992; Clark et al., 1998; Bartels y Chen, 2012).

La entrada de nutrientes al dosel arbóreo puede ser tanto abiótica como biótica. En cuanto a la entrada abiótica, se ha reportado tres formas de deposición por vía atmosférica, las cuales son por deposición seca, húmeda y oculta (Lovett, 1994). En la primera, los elementos se integran mediante partículas, gases y aerosoles. En cuanto a la deposición húmeda los nutrientes se incorporan al dosel mediante lluvias o nevadas, mientras que la deposición oculta se da por medio de nubes y neblinas (Reynolds y Hunter, 2004). Dichas vías de deposición proveen nutrimentos como el sodio, cloro, potasio, nitrógeno y compuestos sulfurados provenientes de diversas fuentes tanto naturales como antropogénicas. Por otro lado, mediante la entrada biótica los nutrientes pueden provenir de excrementos de insectos, cadáveres o restos de hojas que son generados por la alimentación de herbívoros en los doseles arbóreos (Reynolds y Hunter, 2004).

La diversidad y abundancia de especies epífitas está influenciada por las características del hospedero, las características estructurales del hábitat, la limitación en la dispersión,

la disponibilidad de recursos, el disturbio, el cambio climático, la humedad, altitud, latitud y fertilidad de suelo (Gentry y Dodson, 1987; Bartels y Chen, 2012). Adicionalmente, por sus ciclos biológicos característicos y su sensibilidad al estrés ambiental, varias especies de epífitas han sido utilizadas como bioindicadoras para monitorear la salud y la productividad del ecosistema (Bartels y Chen, 2012).

2.1.2.1 Orquídeas epífitas

El 70% de las especies de la familia Orchidaceae crecen como epífitas (Gentry y Dodson, 1987). Este grupo ha desarrollado diversas características para adaptarse a las condiciones estresantes dadas en los doseles del hospedero. Una característica típica de las epífitas es la de contar con hojas suculentas, enceradas y de cutícula gruesa, las cuales sirven como órganos almacenadores de agua (Koopowitz, 2001). En cuanto a sus raíces, éstas tienen un tejido poroso llamado velamen que es utilizado para la absorción de agua y/o nutrientes (Hew y Yong, 2004). Además de facilitar el anclaje sobre el hospedero, las raíces fotosintetizan y realizan el intercambio gaseoso (Benzing, 1990; Alonso, 2011; Marie Selby Botanical Gardens, 2014). Las epífitas poseen características fisiológicas semejantes a plantas desérticas, como la de mantener cerrados los estomas durante el día para evitar pérdidas de agua, como parte fundamental del metabolismo ácido de las crasuláceas (Marie Selby Botanical Gardens, 2014; Valverde et al., 2005). Este metabolismo se caracteriza por fijar dióxido de carbono (CO_2) y almacenarlo en forma de ácido málico en las vacuolas durante la noche, para posteriormente durante el día liberar al ácido málico, descarboxilarlo e integrarlo como CO_2 al ciclo de Calvin, es decir a la fase oscura de la fotosíntesis (Benzing, 1990; Curtis et al., 2006). Sin embargo, existen estudios donde se menciona que algunas epífitas pueden tener fotosíntesis C_3 o

CAM, e inclusive fotosíntesis de tipo C₄ o C₄-CAM (Benzing, 1990; Hew y Yong, 2004; Silvera et al., 2010).

2.1.3 Orquídeas en México

México cuenta con alrededor de 1,200 especies de orquídeas (Hágsater et al., 2005), de los cuales, el 40% son endémicas (Hágsater y Dumont, 1996). La distribución de esta familia en el país no es homogénea a causa de las condiciones climáticas propias de cada región, por lo que los estados con gran número de especies son Tabasco, Chiapas y Oaxaca (Sarmiento y Romero, 2000). Los géneros con mayor número de especies en el territorio mexicano son *Epidendrum*, *Encyclia*, *Lepanthes*, *Habenaria*, *Malaxis*, *Oncidium*, *Maxillaria*, *Stelis*, *Cyclopogon* y *Bletia*.

Actualmente 188 especies (90 géneros) se encuentran registradas dentro de alguna categoría de riesgo en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (ver Tabla 2); siendo la extracción ilegal, cambio de uso de suelos, crecimiento urbano descontrolado y tala de árboles, algunas causas que ha provocado la pérdida de sus poblaciones o extinción de especies (Sarmiento y Romero, 2000; Solano-Gómez et al., 2007; Téllez et al., 2007).

Tabla 2. Número de especies de orquídeas registradas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.

Categoría de riesgo	Total	Endémica	No endémica
<i>Probablemente extinta en el medio (E)</i>	1	1	0
<i>Peligro en extinción (P)</i>	15	5	10
<i>Amenazadas (A)</i>	62	27	35
<i>Sujetas a protección especial (Pr)</i>	110	42	68
Total	188	75	113

Entre las categorías de riesgo presentadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010 se ha reportado a *Laelia gouldiana* Rchb. f. como una epífita posiblemente extinta en el medio. Dicha orquídea era endémica del estado de Hidalgo y fue conocida comúnmente como “Santorum”, “Flor de muerto” y “Monjitas”, (Halbinger y Soto, 1997). Así como *L. gouldiana* existen otras especies de orquídeas endémicas en riesgo por actividades antropogénicas. Los géneros con mayor número de especies en riesgo son: *Epidendrum* (15), *Oncidium* (12), *Rhynchostele* (11), *Encyclia* (7), *Barkeria* (7) y *Prosthechea* (6).

2.2 Micorrizas

2.2.1 Definición

El término “micorriza” acuñado por Alber Bernard Frank en 1885 proviene del griego “*myco*”, hongo y “*rhiza*”, raíz; dicho significado hace referencia a asociaciones simbióticas entre hongos del suelo y raíces de plantas superiores. Sin embargo, Trappe (1996, citado en Read et al., 2000, p. 816) menciona que las micorrizas son asociaciones simbióticas entre los órganos duales de adsorción de los hongos y de los tejidos sanos de muchas plantas terrestres. Esta nueva definición involucra a las asociaciones fúngicas en plantas inferiores carentes de raíces verdaderas, las cuales poseen rizoides (Read et al., 2000). En la actualidad el término micorriza involucra no solo a la presencia del hongo simbiótico en las raíces o los rizoides de las plantas, sino también en otros órganos de contacto especializados para el intercambio de nutrientes (Honrubia, 2009). Tales órganos de contacto pueden ser estructuras no diferenciadas, como los protocormos en orquídeas, donde se ha visto también la presencia del hongo en forma de pelotones.

Sin embargo, la definición de micorriza no está en función únicamente de las características anatómicas de ambos organismos implicados, sino también de las características funcionales, del desarrollo de la planta y del hongo durante la asociación (Brundrett, 2004; 2009). Es por ello que Brundett (2009) menciona los siguientes criterios para definir tal asociación: 1) La principal función de las micorrizas es la transferencia de nutrimentos en dirección hongo-planta y viceversa, 2) En ambos organismos existe un sincronizado desarrollo por el intercambio de nutrientes, 3) La asociación requiere un contacto íntimo entre la hifa y las células vegetales en espacio o interface cerrado donde ocurre el intercambio de nutrientes, 4) Las hifas que habitan en el órgano de contacto son estructural y funcionalmente distintas a las hifas formadas del mismo hongo en el

ambiente y 5) Las plantas controlan la asociación mediante el crecimiento de nuevas raíces, digestión de hifas en la interface o por la alteración en el sistema de raíces.

2.2.2 Clasificación

Las micorrizas se han clasificado tomando en cuenta ciertos criterios, tales como: producción de manto fúngico, forma de penetración, localización y estructura desarrollada por parte del hongo dentro del órgano de contacto, así también el taxón de la planta a la que se asocian (ver Tabla 3). En dicha clasificación, las ectomicorrizas son aquellas asociaciones donde el hongo habita entre las células vegetales, mientras que en las endomicorrizas, los hongos penetran la pared celular con ayuda de hifas especializadas llamadas haustorios (Bonfante y Anca, 2009; Camargo-Ricalde et al., 2012).

Dentro de las endomicorrizas existen tres grupos, los cuales son la micorriza arbuscular, ericoide y orquideoide. Entre estos, la micorriza más estudiada es la arbuscular y se ha reportado el proceso de colonización del hongo en la raíz, la organización del arbusculo dentro de las células corticales y la ruta molecular de la simbiosis. Este tipo de micorrizas se caracteriza por ser simbioses obligados, se reproducen asexualmente, contienen cientos de núcleos los cuales pueden dividirse sin la formación de septos, fenómeno conocido como coenocítico (Madigan et al., 2012), producen esporas asexuales con miles de núcleos (Parniske, 2008) y pertenecen al filo Glomeromycota (Bonfante y Genre, 2010).

Tabla 3. Tipos de micorriza.

Micorriza	Descripción	Hongo	Planta
Ectomicorriza	<ul style="list-style-type: none"> -Manto fúngico denso que cubre exteriormente a la raíz. -Las hifas penetran en la estructura vegetal y forman una red (conocida como Harting) entre las células corticales para incrementar el área de contacto con la planta. 	<ul style="list-style-type: none"> Zigomicetos Ascomicetos Basidiomicetos Deuteromicetos 	Gimnospermas y angiospermas
Arbuscular	<ul style="list-style-type: none"> -Sin manto fúngico. -Penetración del hongo entre las células corticales mediante hifas de reconocimiento (hipopodia) e intracelularmente por hifas especializadas para pasar la pared vegetal, conocidas como haustorios. -Formación de vesículas o arbusculos dentro de las células vegetales. 	<ul style="list-style-type: none"> Zigomicetos 	Briofitas, Pteridofitas, Gimnospermas y Angiospermas
Ericoide	<ul style="list-style-type: none"> -Sin manto fúngico. -Penetración intracelular e intercelular del hongo. -Formación de enrollamiento de hifas, llamados ovillos o pelotones. 	<ul style="list-style-type: none"> Ascomicetos Basidiomicetos 	Orden Ericales
Orquideoide	<ul style="list-style-type: none"> -Sin manto fúngico. -Penetración intracelular e intercelular del hongo. -Formación de pelotones fúngicos. 	<ul style="list-style-type: none"> Basidiomicetos Deuteromicetos 	Familia Orchidaceae
Referencias: Bonfante y Anca, 2009; Camargo-Ricalde et al. 2012			

2.2.3 Micorrizas de orquídeas

Los hongos micorrízicos de orquídeas son principalmente del grupo *Rhizoctonia* (Smith y Read, 1996) y pertenecen a los órdenes de Cantharellales y Sebaciales (ver Tabla 4). Otros hongos reportados son del orden Atractielalles y de los géneros *Marasmius* (Agaricales), *Armillaria* (Agaricales) y *Fomes* (Polyporales) (Anaya, 2003; Kottke et al., 2010).

Tabla 4. Ubicación taxonómica de algunos géneros del grupo *Rhizoctonia*.

Reino:	Fungi			
Subreino:	Dikarya			
Filo:	Basidiomycota			
Subfilo:	Agaricomycotina			
Clase:	Agaricomycetes			
Orden:	Cantharellales			Sebacinales
Familia:	Ceratobasidaceae	Tulasnellaceae	Sebacinaceae	
Género:	<i>Ceratobasidium</i>	<i>Thanatephorus</i>	<i>Tulasnella</i>	<i>Sebacina</i>

Estos hongos han sido clasificados de acuerdo a su estado de reproducción, características morfológicas, número de núcleos por célula, patogenicidad y por anastomosis hifal (González, 2008). En el estado teleomórfico o sexual, estos hongos producen estructuras reproductivas, tales como basidiocarpos y basidiosporas; los cuales son necesarias para su identificación. En el estado anamórfico o asexual, estos hongos presentan un micelio estéril incoloro u oscuro, células largas y ramificaciones en ángulo recto con respecto a la hifa principal; así también pueden producir células monilioides, es decir, ramilletes de células cortas y anchas, de forma oval o triangular (Agrios, 2002; Mosquera-Espinosa et al., 2010). Entre los géneros identificados por tener un estado de reproducción teleomórfico se han encontrado a *Ceratobasidium*, *Thanatephorus*, *Sebacina* y *Tulasnella*; siendo sus estados anamórficos los géneros *Ceratorhiza*, *Rhizoctonia*, *Opadorhiza* y *Epulorhiza*, respectivamente (Rasmussen, 2002).

Los hongos micorrízicos de orquídeas resultan ser patógenos cuando se asocian con otras especies vegetales. Por ejemplo, *Ceratobasidium cornigerum* ha sido reportada como un hongo benéfico en la orquídea *Goodyera repens* (L.) R. Br. pero dañina en cultivos de fresa, tomate, melón, espinaca, trigo, arroz, frijol, entre otros (González, 2008). Así mismo, *Rhizoctonia solani* (teleomorfo *Thanatephorus cucumeris*), hongo reportado

como micorriza de *Pterostylis acuminata* (R. Br.), provoca enfermedades en arroz, lechuga, soya, sorgo, papa, tabaco, tomate, coliflor y frijol (González-García et al., 2006). En cambio con las orquídeas, la presencia de la micorriza propicia la germinación de las semillas y el desarrollo del protocormo por el aporte nutrimentos, tales como fósforo, nitrógeno y carbono (Alexander y Hadley, 1985; Kuga et al., 2014). Sin embargo, cuando los protocormos y semillas se cultivan con hongos aislados de raíces pertenecientes a otras especies de orquídeas, la infección fúngica puede ser compatible o no, dependiendo de la especificidad entre los organismos (Hadley, 1970). Las micorrizas generalmente son relaciones de tipo mutualista, pero pueden llegar a ser parasíticas cuando los costos y beneficios son desbalanceados por factores abióticos y bióticos en el medio (Johnson et al., 1997). El parasitismo puede ser inducido por el estatus nutricional del medio, el estado de desarrollo de la planta, las condiciones ambientales y el genotipo de los organismos (Johnson et al., 1997).

2.2.4 Hongo RG26

La cepa RG26 es un hongo aislado de raíces de *Rossioglossum grande* (Lindl.) Garay y G. C. Kenn y considerado como una posible especie del grupo *Rhizoctonia* (Bertolini et al. 2011). En ensayos de post-germinación de *R. grande* y germinación de *Rhynchostele bictoniensis* (Bateman) Soto-Arenas y Salazar, RG26 fue uno de los hongos que ofreció buenos resultados en el desarrollo de las semillas (Bertolini et al., 2011).

En cuanto a sus características, se ha reportado que en medio agar dextrosa papa (PDA) (pH 6.8), la colonia fúngica es de color blanco/2B, textura muy lanosa, crece a 0.166 mm/h, no degrada taninos, presenta micelios aéreos, anillos, septos e hifas binucleadas (Fig. 1). El ancho promedio de la hifa principal es de 5.012 μm , mientras que el ancho

promedio de la hifa a la bifurcación es de 4.457 μm y la distancia promedio entre la bifurcación y el septo oscila entre 3.956 μm (Bertolini et al., 2011).

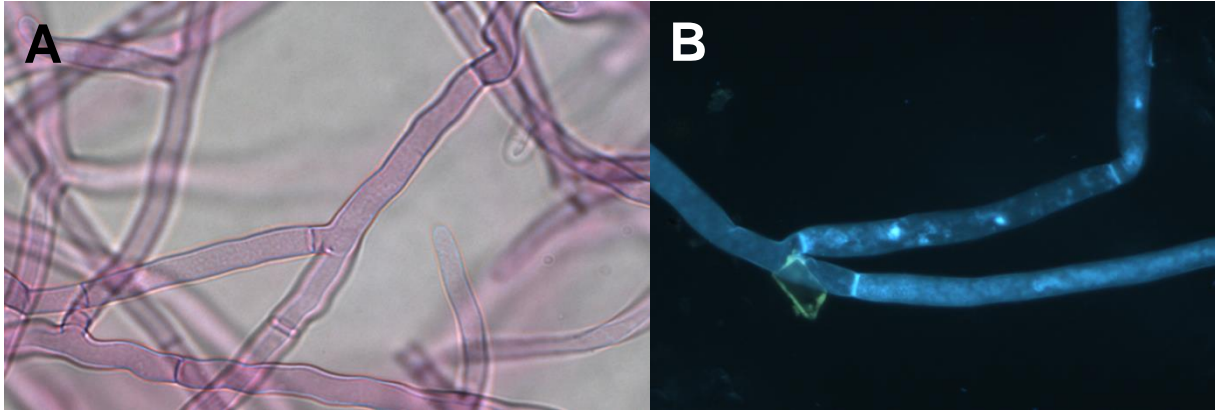


Fig. 1. Hongo RG26. A) Hifas teñidas con fucsina ácida al 0.2% y B) Células binucleadas obtenidas mediante fluorescencia del ADN nuclear con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Foto: Bertolini, 2014 (Comunicación personal).

3.1 Proteómica

3.1.1 Generalidades de la proteómica

Las proteínas son biomoléculas que participan activamente en diversas funciones en la célula (Nelson y Cox, 1992). Existen proteínas de defensa (anticuerpos), de reserva (caseína), de transporte (hemoglobina), de regulación (insulina), estructurales (colágeno), transportadores (porinas), para contracción (actina) y enzimas (pectinasas) (Nelson y Cox, 1992).

Dado a sus múltiples papeles en la célula, estas moléculas biológicas son las más abundantes en el contenido celular, por ejemplo, en una célula típica de mamífero el 60% corresponde a la fracción proteica y tan solo un 5% son ácidos nucleicos, el resto lo constituyen lípidos (16%), carbohidratos (6%), iones inorgánicos (3%) y metabolitos (10%) (Prescher y Bertozzi, 2005). Por otro lado, la cantidad de proteínas que tiene un organismo es mucho mayor al número de genes presentes en su genoma. Por ejemplo, en *Escherichia coli* se ha reportado que produce alrededor de 2.4 millones de proteínas en total y tiene únicamente 4,288 genes que codifican para 1,900 diferentes tipos de proteínas (Madigan et al., 2012); En el caso de *Saccharomyces cerevisiae* y el ser humano, estos cuentan con alrededor de 6,000 y 32,000 proteínas diferentes, respectivamente (Lodish, 2006). La función de muchos genes aún es desconocida y en eucariotas se ha encontrado una pequeña correlación entre los niveles de ácido ribonucleico mensajero (mARN) y proteínas (Barrett et al., 2005). Esto último se debe a que en los análisis del genoma y transcriptoma no se contemplan el splicing alternativo que sufre el transcrito primario (pre-mARN) durante el proceso de transcripción, proteólisis de proteínas y las modificaciones post-traduccionales (Jorrín et al., 2008). Se

ha reportado que los cambios en los niveles de mRNA representan solo el 60 - 70% de los cambios en los niveles de proteínas (Jorrín et al., 2008).

Una de las herramientas que estudia el conjunto de proteínas producidas por el organismo en una condición o etapa dada es la proteómica (Namasivayam, 2013). Esta se clasifica en proteómica descriptiva o funcional, proteómica comparativa o de expresión diferencial, interactómica y de estudio de las modificaciones post-traduccionales (Jorrín et al., 2008). La descriptiva identifica el nombre, propiedades y función de cada una de las proteínas extraídas. La comparativa analiza las diferencias en el perfil proteómico entre dos o más condiciones (células, tejidos, órganos, factores ambientales, etapas de desarrollo, genotipos, mutantes) e identifica las proteínas que presentan cambios cualitativos y cuantitativos en su nivel de expresión. La interactómica estudia las interacciones entre proteína-proteína, proteína-ADN o proteína con otros ligandos (Namasivayam, 2013). La proteómica también analiza las modificaciones post-traduccionales, tales como: fosforilación, metilación, acetilación, entre otras.

3.1.2 Procesamiento de la muestra

Existen diversas metodologías para el análisis proteómico, la estrategia empleada dependerá de la pregunta de investigación a responder, la naturaleza de la muestra, los materiales y la plataforma tecnológica disponible (Pando y Batista, 2008). Así mismo se debe contemplar el dinamismo del proteoma, dado a que este es una mezcla de proteínas en constante inducción/represión por control en la célula o en respuesta a factores externos en el ambiente (Westermeier y Naven, 2002).

En primera instancia, el proteoma es extraído del resto del contenido celular por métodos de extracción de proteínas, los cuales incluyen pasos de ruptura celular, recuperación,

purificación y resuspensión de proteínas. Estos protocolos contienen en sus soluciones de lisis ciertos componentes, tales como: 1) urea para mantener a todas las proteínas dentro una conformación simple, obtener proteínas hidrofóbicas y evitar interacciones entre proteínas, 2) detergentes (CHAPS) para incrementar la solubilidad de proteínas hidrofóbicas, 3) agentes reductores (DTT) para prevenir diferentes pasos de oxidación de proteínas y 4) anfolitos para mejorar la solubilidad de proteínas (Westermeier y Naven, 2002).

Luego, las proteínas son separadas por técnicas cromatográficas y/o electroforéticas en base a las características fisicoquímicas de las biomoléculas (Namasivayam, 2013). Entre los métodos empleados se encuentran la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y electroforesis de dos dimensiones (2D) (Pando y Batista, 2008). Mediante esta última técnica las proteínas son separadas por su punto isoeléctrico, dentro de un gradiente de pH (potencial de hidrógeno). Esta primera dimensión es conocida como isoelectroenfoque (IEF). En una segunda dimensión, las proteínas se separan por su peso molecular en geles SDS-PAGE. La electroforesis 2D ha permitido la separación de hasta 2,000 proteínas en un solo gel, la visualización de grupos de proteínas a través de diferentes tinciones y la observación de patrones de expresión de cierta condición evaluada (Pando y Batista, 2008). A pesar de que la electroforesis 2D ha ofrecido buena resolución, el análisis de imágenes ha resultado ser un cuello de botella en esta etapa (Westermeier y Naven, 2002; Barrett et al., 2005).

Posteriormente las proteínas (spots) identificadas se cortan de los geles 2D, se digieren con endoproteasas y los péptidos son analizados por espectrometría de masas (MS, por

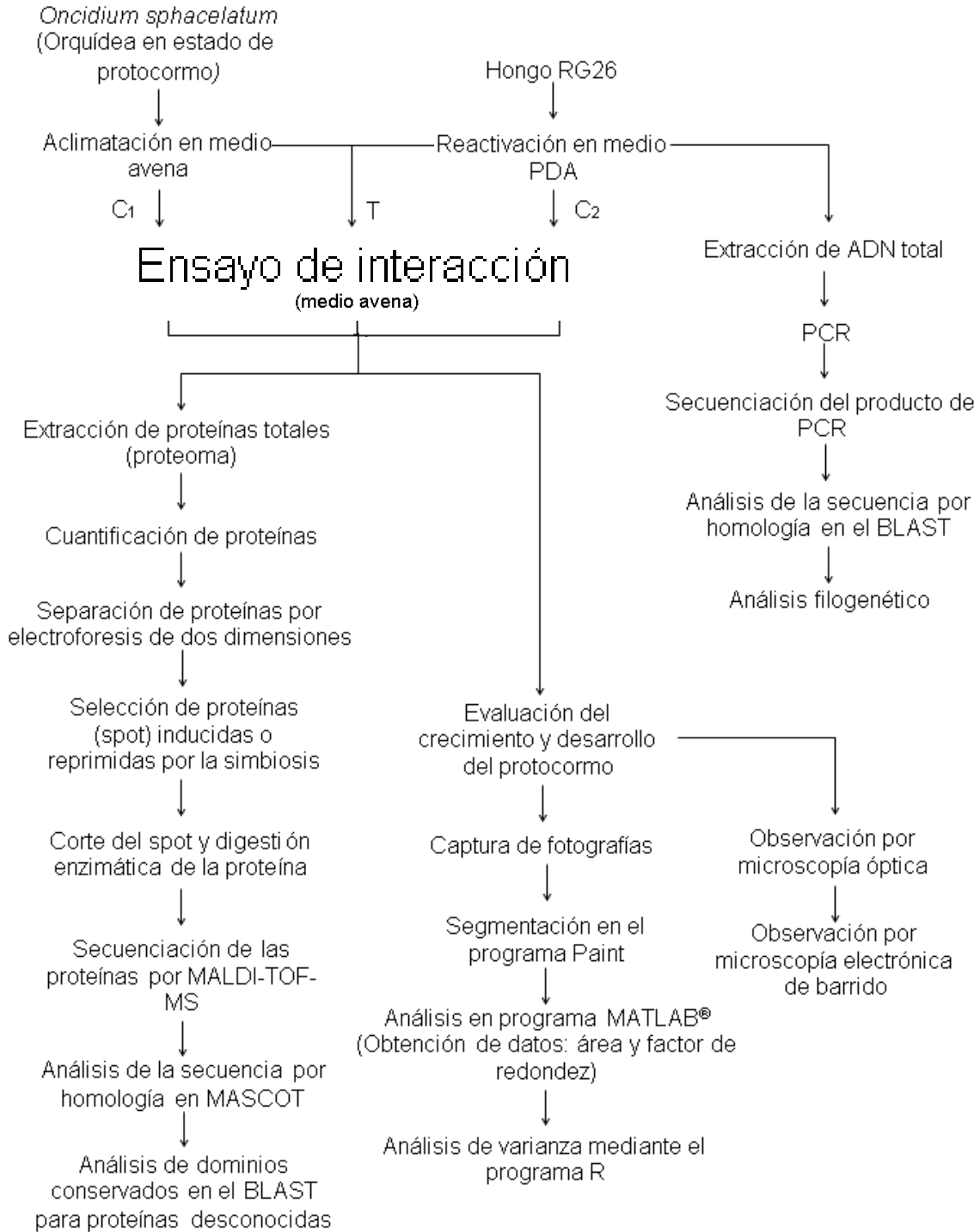
sus siglas en inglés: *Mass Spectrometry*) (Namasivayam, 2013). Para una buena señal en espectrometría, la cantidad de proteínas en un spot debe oscilar entre 10 a 20 ng (Westermeier y Naven, 2002). Esta técnica estudia la masa de átomos y moléculas, y consiste en ionizar a la molécula de interés, pasar los iones por aceleración en un campo eléctrico, detectar los iones en base a su relación masa/carga (m/z) y registrar la abundancia relativa de las señales en función de la relación m/z mediante su representación en un espectro de masas (Harris, 2007). La información obtenida es comparada con la contenida en bases de datos a través de motores de búsqueda.

3.1.3 Proteómica en orquídeas

La proteómica ha sido empleada para estudiar el proceso de germinación de semillas, monitorear el patrón de expresión inducido por cambios ambientales, respuesta a eventos fisiológicos o por interacción con patógenos, entre otros (Cánovas et al., 2004). En el caso de los estudios del proteoma vegetal inducido por interacción con patógenos y en específico en especies tropicales, aún ha sido poco explorado (Balbuena et al., 2011). En orquídeas, esta herramienta ha sido utilizada en la identificación de especies del género *Anoectochilus* (Gao et al., 2009), en el estudio de la diferenciación y desarrollo de callos de *Vanilla planifolia* (Palama et al., 2010; Tan et al., 2013), en la identificación de genes responsables en la atracción de polinizadores en especies del género *Ophrys* (Sedeek et al., 2013), en el análisis comparativo de los proteomas de sépalo y pétalos en flores en *Cymbidium ensifolium* (L.) Sw. (Li et al., 2014), para el estudio de respuesta de *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume ante infección por virus (Lai et al., 2013) y en la identificación de proteínas implicadas en la germinación simbiótica de *Oncidium sphacelatum* (Valadares et al., 2013).

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

Para cumplir con los objetivos planteados se diseñó el siguiente esquema general de trabajo.



T = Tratamiento (*O. sphacelatum* + RG26)

C1 = Control 1 (*O. sphacelatum*)

C2 = Control 2 (Hongo RG26)

CAPÍTULO IV ARTÍCULO

Manuscrito sometido a la revista Mycorrhiza

Mycorrhiza

Proteomic and morphometric study of the in vitro interaction between *Oncidium sphacelatum* Lindl. (Orchidaceae) and *Thanatephorus* sp. RG26 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:			
Full Title:	Proteomic and morphometric study of the in vitro interaction between <i>Oncidium sphacelatum</i> Lindl. (Orchidaceae) and <i>Thanatephorus</i> sp. RG26		
Article Type:	Original Article		
Section/Category:	Ericoid or Orchid mycorrhiza		
Keywords:	Protocorm; orchid mycorrhiza; symbiosis; Rhizoctonia; Ceratobasidium		
Corresponding Author:	Karina Guillén-Navarro, Ph. D. El Colegio de la Frontera Sur, CONACYT Tapachula, Chiapas MEXICO		
Corresponding Author Secondary Information:			
Corresponding Author's Institution:	El Colegio de la Frontera Sur, CONACYT		
Corresponding Author's Secondary Institution:			
First Author Secondary Information:			
Order of Authors:	Mariana Yadira López-Chávez, MS Karina Guillén-Navarro, Ph. D. Vincenzo Bertolini, PhD Sergio Encarnación, PhD Magdalena Hernández-Ortiz, MS Irene Sánchez-Moreno, PhD Anne Damon, PhD		
Order of Authors Secondary Information:			
Funding Information:	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 60%;">Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (MX) (Scholarship number 355415)</td> <td style="width: 40%;">Mariana Yadira López-Chávez</td> </tr> </table>	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (MX) (Scholarship number 355415)	Mariana Yadira López-Chávez
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (MX) (Scholarship number 355415)	Mariana Yadira López-Chávez		
Abstract:	<p>The Orchidaceae family establishes symbiotic relationships with fungi in the Rhizoctonia group, resulting in interactions beneficial to both organisms (mutualism) or in cell destruction in one of them (pathogenicity). To further our understanding of the molecular mechanisms involved in these symbioses, we evaluated the nonspecific interaction between <i>Oncidium sphacelatum</i> Lindl. and the mycorrhizal fungus <i>Thanatephorus</i> sp. strain RG26 in vitro using morphometric and proteomic analyses. The fungus promoted the growth and differentiation of orchid protocorms, with the apparent involvement of cell cycle proteins (β-tubulin), purine recycling (xanthine dehydrogenase) and stress responses (stress-activated MAP kinase interacting protein 1). In addition, proteins with conserved domains involved in protein-protein interactions (TPR-2), vesicle secretion (dymecilin), ribosome biogenesis (nucleolar GTP-binding protein, DEAD-box ATP RNA helicase) and enzyme activation (molybdenum cofactor sulfuryase) were found in the symbiotic interaction. This is the first work reporting proteins differentially expressed in the epiphytic orchid-fungus interaction and will aid in the search for molecular markers that will facilitate the study of this symbiosis in both wild orchids and in those in danger of extinction.</p>		

Title page

[Click here to download Manuscript: Title page.docx](#)

[Click here to view linked References](#)

1 **Proteomic and morphometric study of the *in vitro* interaction between *Oncidium sphacelatum* Lindl.**
2 **(Orchidaceae) and *Thanatephorus* sp. RG26**

3

4 Mariana Yadira López-Chávez¹, Karina Guillén-Navarro^{1*}, Vincenzo Bertolini¹, Sergio Encarnación³,
5 Magdalena Hernández-Ortiz³, Irene Sánchez-Moreno², Anne Damon¹

6

7 ¹ El Colegio de la Frontera Sur, Carretera Antigua Aeropuerto Km 2.5, C.P. 30700. Tapachula, Chiapas,
8 Mexico.

9 *Corresponding author: kguillen@ecosur.mx, +52 (962) 6289800 ext 5411; Fax +52 (962) 6289806

10 ² El Colegio de la Frontera Sur, Carretera Panamericana y Periférico Sur s/n, Barrio de María
11 Auxiliadora, C.P. 29290. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, Mexico

12 ³ Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad s/n,
13 Col. Chamilpa, C.P. 62210. Cuernavaca, Morelos, Mexico

14

15 **Abstract**

16 The Orchidaceae family establishes symbiotic relationships with fungi in the *Rhizoctonia* group, resulting
17 in interactions beneficial to both organisms (mutualism) or in cell destruction in one of them
18 (pathogenicity). To further our understanding of the molecular mechanisms involved in these symbioses,
19 we evaluated the nonspecific interaction between *Oncidium sphacelatum* Lindl. and the mycorrhizal
20 fungus *Thanatephorus* sp. strain RG26 *in vitro* using morphometric and proteomic analyses. The fungus
21 promoted the growth and differentiation of orchid protocorms, with the apparent involvement of cell
22 cycle proteins (β -tubulin), purine recycling (xanthine dehydrogenase) and stress responses (stress-
23 activated MAP kinase interacting protein 1). In addition, proteins with conserved domains involved in
24 protein-protein interactions (TPR-2), vesicle secretion (dymeclin), ribosome biogenesis (nucleolar GTP-
25 binding protein, DEAD-box ATP RNA helicase) and enzyme activation (molybdenum cofactor sulfuryase)
26 were found in the symbiotic interaction. This is the first work reporting proteins differentially expressed
27 in the epiphytic orchid-fungus interaction and will aid in the search for molecular markers that will
28 facilitate the study of this symbiosis in both wild orchids and in those in danger of extinction.

29

30 **Keywords:** Protocorm, orchid mycorrhiza, symbiosis, *Rhizoctonia*, *Ceratobasidium*.

Proteomic and morphometric study of the *in vitro* interaction between *Oncidium sphacelatum* Lindl. (Orchidaceae) and *Thanatephorus* sp. RG26

Mariana Yadira López-Chávez¹, Karina Guillén-Navarro^{1*}, Vincenzo Bertolini¹, Sergio Encarnación³, Magdalena Hernández-Ortiz³, Irene Sánchez-Moreno², Anne Damon¹

¹ El Colegio de la Frontera Sur, Carretera Antiguo Aeropuerto Km 2.5, C.P. 30700. Tapachula, Chiapas, Mexico.

*Corresponding author: kguillen@ecosur.mx, +52 (962) 6289800 ext 5411; Fax +52 (962) 6289806

² El Colegio de la Frontera Sur, Carretera Panamericana y Periférico Sur s/n, Barrio de María Auxiliadora, C.P. 29290. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, Mexico

³ Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad s/n, Col. Chamilpa, C.P. 62210. Cuernavaca, Morelos, Mexico

Abstract

The Orchidaceae family establishes symbiotic relationships with fungi in the *Rhizoctonia* group, resulting in interactions beneficial to both organisms (mutualism) or in cell destruction in one of them (pathogenicity). To further our understanding of the molecular mechanisms involved in these symbioses, we evaluated the nonspecific interaction between *Oncidium sphacelatum* Lindl. and the mycorrhizal fungus *Thanatephorus* sp. strain RG26 *in vitro* using morphometric and proteomic analyses. The fungus promoted the growth and differentiation of orchid protocorms, with the apparent involvement of cell cycle proteins (β -tubulin), purine recycling (xanthine dehydrogenase) and stress responses (stress-activated MAP kinase interacting protein 1). In addition, proteins with conserved domains involved in protein-protein interactions (TPR-2), vesicle secretion (dymeclin), ribosome biogenesis (nucleolar GTP-binding protein, DEAD-box ATP RNA helicase) and enzyme activation (molybdenum cofactor sulfurase) were found in the symbiotic interaction. This is the first work reporting proteins differentially expressed in the epiphytic orchid-fungus interaction and will aid in the search for molecular markers that will facilitate the study of this symbiosis in both wild orchids and in those in danger of extinction.

Keywords: Protocorm, orchid mycorrhiza, symbiosis, *Rhizoctonia*, *Ceratobasidium*.

Introduction

The Orchidaceae is one of the most diverse plant families, with about 30,000 species, most of which establish mutualistic symbiotic relationships with fungi from the *Rhizoctonia* group (Smith and Read 1996). These mycorrhizal fungi have been classified according to their reproductive state, morphological characteristics, number of nuclei per cell, pathogenicity and hyphal anastomosis (González 2008). Among the genera identified based on their sexual or teleomorphic reproduction are *Ceratobasidium*, *Thanatephorus*, *Sebacina* and *Tulasnella*, that are known by their anamorphic or asexual stages as *Ceratorhiza*, *Rhizoctonia*, *Opadorhiza* and *Epulorhiza*, respectively (Rasmussen 2002). However, when grown in culture media, the taxonomic differentiation of orchid mycorrhiza is difficult since they fail to produce reproductive structures. For this reason, molecular analyses have been useful in establishing their taxonomic positions, although the results obtained do not always agree with those from classical approaches (Mosquera-Espinosa et al. 2010; Oberwinkler et al. 2013).

The benefits that orchid mycorrhizae confer upon their hosts include the induction of seed germination, protocorm differentiation, plantlet growth and disease resistance (Pereira et al. 2005). These parameters have been evaluated *in vitro* by determining the percent germination and survival, and the diameter, form, color and differentiation of protocorms throughout their phenological stages: testa rupture (stage I), presence of rhizoids (stage II), appearance of primordia (stage III), appearance of true leaves (stage IV), root elongation (stage V) and plantlet stage (stage VI) (Zettler and McInnis 1993). The analysis of the initial stages of development is complicated by the small size of the protocorms (ca. 2 mm), although it is possible using algorithm-based image processing (Dell'Aquila 2009). This kind of image analysis has been used to monitor seed germination of plants of agricultural interest (Dell'Aquila 2005) and also in the morphometric characterization of orchid (*Chloraea crispa*) seeds (Verdugo et al. 2007).

Although the pathogenicity of a few species of orchid mycorrhiza towards other plant families has been reported (González 2008), the physiology of the orchid-fungus interaction has been little studied in comparison to associations involving arbuscular mycorrhiza and ectomycorrhiza. Those studies that do exist have focused mostly on terrestrial species and little on epiphytes, even though these have developed diverse morphological, anatomical and physiological modifications in order to adapt to stress conditions present in the host canopy (Gentry and Dodson 1987). Terrestrial

orchids are reported to produce phytoalexins, adenylate cyclases and organic compounds to control hyphal colonization of vegetative tissue, in addition to digestive enzymes that participate in the degradation of the intracellular hyphal coils (pelotons) (Rasmussen 2002). Nutrient transfer between the organisms as well as genes related to hydraulic compensation and membrane protection, such as trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase, have also been studied (Watkinson and Welbaum 2003; Cameron et al. 2008; Kuga et al. 2014). In addition, possible molecular markers that are modulate by mutualistic (nodulin genes) or antagonistic (pathogenesis-related genes) orchid-fungus interactions have been studied (Perotto et al. 2014).

Although studies of interactions involving epiphytic orchids are only beginning, expression studies have identified genes involved in carbohydrate metabolism, plant defense, induction of necrosis, polyamine synthesis, signalling, digestion of the peloton and plant development (Zhao et al. 2013). A proteomic study of *Oncidium sphacelatum* Lindl. protocorms identified metabolic changes during the transition from the microheterotrophic to autotrophic stages. Proteins identified included those implicated in modulating homeostasis in the presence of reactive oxygen species, carotenoid and phytoalexin biosynthesis, energy metabolism and signalling (Valadares et al. 2013). Presently, however, there are no defined protein molecular markers to indicate the mechanisms involved in the interaction with epiphytic orchids. Because there is a fine line in the direction (mutualistic or pathogenic) that may be taken by the interaction, more precise knowledge of its physiology is required. Thus, the general objective of the present work was to evaluate the *in vitro* interaction between the orchid *O. sphacelatum* and the *Rhizoctonia*-type mycorrhizal fungus, isolated from *Rossioglossum grande* (Lindl.) Garay and G.C. Kenn, using morphometric and proteomic analyses.

Oncidium sphacelatum is an epiphyte native to Mexico that flowers from September to March, depending on climatic conditions and altitude (Damon and Salas-Roblero 2007). As a conservation measure, this orchid has been sustainably cultivated in rural communities and various aspects of its biology and ecology have been studied in the Soconusco region of Mexico (Damon and Cruz-López 2006; Damon and Salas-Roblero 2007; Nieto and Damon 2008; Damon 2013). Strain *Thanatephorus* sp. RG26 was obtained previously from the roots of the native Mexican orchid *R. grande*, which is also naturally distributed in the Soconusco region. This strain has been used to aid in the *in vitro* development of *Rhynchostele bictoniensis* (Bateman) Soto-Arena and Salazar and post-germination in *R. grande* (Bertolini et al. 2011), with good results. All of these orchids belong to the *Oncidiinae* subtribe.

Materials and Methods

Obtaining protocorms

Stage I *O. sphacelatum* protocorms (Zettler and McInnis 1993) were obtained from seeds germinated asymbiotically on culture medium C plates (Knudson 1946), coconut water and activated carbon as described by Damon et al. (2004), at 25 ± 2 °C with a 16 h photoperiod.

Molecular analysis of the RG26 fungus

Fungus RG26 was grown on potato dextrose agar (PDA) at 25 ± 2 °C in the dark. DNA was isolated by the method described by Liu et al. (2000), consisting of the lysis of about 0.1 g of mycelia in lysis buffer (400 mM Tris-HCl [pH 8], 60 mM EDTA [pH 8], 150 mM NaCl, 1 % SDS), addition of 1/10 volume of 3 M potassium acetate (pH 4.8) and precipitation with two volumes of cold isopropanol, with a 70 % ethanol wash, drying at 60 °C and resuspension in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). The DNA was used to amplify the ITS marker using oligonucleotides ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White et al. 1990) with the PCR conditions described by Ahmed et al. (1999). The PCR product was purified using a Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) according to the manufacture's instructions and sequenced in both directions by the Sanger method at Macrogen (Seoul, South Korea). The sequence obtained from strain RG26 was deposited in the NCBI database under accession KP893527. The sequence was used in BLASTn analysis against the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (<http://www.cbs.knaw.nl>) and EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>) databases. For phylogenetic analysis, reference sequences from species of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus*, obtained from the BOLDSYSTEM v3 (<http://www.boldsystems.org/>) database, were used. Evolutionary reconstruction was deduced using the maximum-likelihood method based on the Kimura-2-parameter model (Kimura 1980) with the MEGA6 program (Tamura et al. 2013). Preliminary trees for heuristic searches were obtained automatically using the Neighbor-Join application and the BIONJ algorithm with a distance matrix by pairs, estimated using a composition method of maximum-likelihood and later selecting the topology with the greatest log value of verisimilitude. A discrete gamma distribution was used to model differences in evolutionary types between sites [5 categories (+ G, parameter = 0.3914)]. The tree was drawn with scaled distribution, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis included 12 nucleotide sequences and the codon positions were first + second + third + noncoding. All positions containing gaps or lost data were eliminated, and the final data set had a total of 362 positions.

Interaction assay

Protocorms from *O. sphacelatum* were acclimated on oat medium at 25 ± 2 °C with a 16 h photoperiod for 7 days (Hicks 2007). For this, about 70 individuals were placed around the margin of a 9-cm diameter plate to form a circle 1 cm from the plate edge. Once acclimatized, the plant material was subjected to the following treatments: two controls consisting of separate cultures of *O. sphacelatum* (C₁) and the fungus RG26 (C₂) in 14 and 45 Petri dishes (9-cm diameter), respectively, containing oat medium. The treatment (T) consisted of inoculating by placing a 5-mm diameter PDA medium plug with the fungus in the center of each of 10 plates containing acclimated protocorms. The plates for use in protein extraction (66 plates) and image analysis (3 plates) were incubated for 63 and 98 days, respectively, at 25 ± 2 °C with a 16 h photoperiod.

Image analysis

Starting 22 days after inoculation with the fungus, the growth of 8 treatment and 13 control (C₁) protocorms was followed at 7 days intervals for 76 days using a stereomicroscope (Nikon SMZ-2B) capturing the images with a Sony DSC-W310 camera. The images were segmented in Microsoft Paint and the area (pixels) and roundness factor (FR; $FR = \frac{4\pi A}{P^2}$, A = area, P = perimeter) were obtained using the MATLAB R2012a program (MathWorks, Inc.) and statistically analyzed using ANOVA with program R version 2.15.2 (R Core Team 2013), providing an indirect measure of protocorm growth and differentiation (FR values <1 indicated differentiated protocorms). Images of longitudinal cuts of protocorm mycorrhized, stained with 2 % acid fuchsin in polyvinyl alcohol, were obtained with a Zeiss Axio Imager A1 microscope. For scanning electron microscopy (TOPCON SM-510), longitudinal sections of the same protocorms were fixed in 3 % gluteraldehyde with 0.1 M sodium cacodylate (pH 7) for 2 h and dehydrated for 30 min in a 30, 50, 70, 90 and 100 % ethanol series. The samples were dried to the critical point of CO₂, mounted on aluminium cylinders, covered with an approximately 20-nm layer of gold-palladium and examined under high vacuum at 8 Kv.

Protein extraction

For total protein extraction by the method of Chatterjee et al. (2012), samples of each treatment were taken after 63 days of incubation. One-gram samples were mascerated in 2 mL of SDS buffer (30 % dextrose, 2 % SDS, 100 mM Tris-HCl, 2 mM PMSF, 2 % β-mercaptoethanol and Roche Complete™ protease inhibitor cocktail). An equal volume of equilibrated phenol (pH 8) and glass beads was added, samples were homogenized for 30 s, incubated for 5 min at 25 °C and centrifuged for 5 min at 12,000 g. Four volumes of 100 mM sodium acetate in methanol were added to the

phenolic phase and mixed by inversion and proteins were allowed to precipitate for 12 h at -20 °C. Samples were centrifuged at 5,000 g for 10 min at 4 °C. Precipitates were washed 3 times in 100 mM sodium acetate in methanol, once in cold 80 % acetone and finally in cold 70 % ethanol. The proteins were quantitated by the Bradford method (Bio-Rad) and stored at -20 °C until analysis.

Proteome analysis

Proteins were separated by the method of Encarnación et al. (2005) in 2D polyacrylamide (PAGE) gels, with the first dimension containing pH 3 to 10 ampholytes. Gels were stained with Coomassie blue R-250, digitalized at a resolution of 127 x 127 µm and analyzed with PDQuest 8.0.1 software (BioRad). Each experiment was performed in triplicate. Following gel comparisons, spots of interest were excised, reduced, alkylated and digested with trypsin. Peptides were analyzed by MALDI-TOF-mass spectrometry. Lists of peak masses from tryptic peptides were generated and compared to the Orchidaceae and Viridiplantae databases in NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), and for Ceratobasidiaceae and Fungi databases in UniProt (<http://www.uniprot.org/>), using the MASCOT search program (Matrix Science, Ltd., UK). Sequences of proteins with uncharacterized or unknown functions were analyzed by searching for conserved domains using BlastP against the UniProt (<http://www.uniprot.org/blast/>), InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>), ProtoNet (<http://www.protonet.cs.huji.ac.il/index.php>), HMMER (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/phmmer>) and NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) databases.

Results

Molecular identification of RG26

The Blast alignment of the sequence obtained from RG26 returned sequences most similar to fungi from the Ceratobasidiaceae family, with the *Ceratobasidium* genus having the highest percent identity (92 %) in GenBank, followed by *Thanatephorus*, *Ceratorhiza* and *Uthatabasidium*, each with 89 % identity. To determine the phylogenetic relationship of strain RG26 to genera in the *Rhizoctonia* group, dendograms were constructed and showed that RG26 is genetically more closely related to species in the genus *Thanatephorus* than in *Ceratobasidium* (Fig. 1).

Morphometric analysis of growth and differentiation

Despite the variability of the data obtained, we observed a clear developmental enhancement in *O. sphacelatum* cultivated in the presence of the fungus RG26 (Fig. 2 and 3). At the beginning of the experiment, the protocorms of

the control (C₁) and treatment (T) appeared to the unaided eye as spherical green masses (Fig. 3), with estimated areas of at least 2×10^5 pixels and roundness factors close to 1.0 in both cases. The treated protocorms showed better growth starting at 35 days (area = 2.9×10^5) through 98 days of interaction (area = 11.9×10^5). Values for roundness factor FR, an indirect measure of protocorm differentiation, were closer to zero starting at 22 days of interaction for the treated protocorms, in comparison to the protocorms grown without strain RG26 (Fig. 2b). This agrees with the observed production of rhizoids and the development of leaves at 63 days (Fig. 3) and the elongation of roots after 98 days of interaction, culminating in stage VI plantlets (Zettler and McInnis 1993) with greater biomass in the treated plants, suggesting a beneficial effect of the fungus. In contrast, the growth and differentiation of protocorms grown without strain RG26 was much less evident (Fig. 2 and 3).

Microscopic analysis of fungal colonization

To verify that protocorms were colonized by strain RG26, the presence of the fungus in *O. sphecelatum* tissues was analyzed after 98 days of interaction by optical and scanning electron microscopy. As shown in Fig. 4, cells of the plant tissue contained visible RG26 pelotons (~ 80 μ m) and haustoria hyphae.

Proteome analysis

The proteome profiles of *O. sphecelatum*, the fungus RG26, and the interaction between both organisms (Fig. 5) revealed 85 differentially expressed proteins in the symbiosis, while 64 and 10 proteins, respectively, were present in greater amounts in the orchid and fungus alone. Fourteen proteins were identified by mass spectrometry (Table 1), 9 of which were found in symbiosis and are related to the cell cycle (β -tubulin), stress (stress-activated MAP kinase interacting protein 1), purine metabolism (xanthine dehydrogenase), protein-protein interaction (TPR-2 domain), ribosome biogenesis (nucleolar GTP-binding and DEAD-box ATP RNA helicase domains), lipid biosynthesis (UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine *N*-acyltransferase), enzyme activation (molybdenum cofactor sulfurase) and vesicle secretion (dymeclin domain). One of the proteins with greatest intensity in the fungus grown alone (control C₂) is related with DNA processing (transcription factor STP2), while 4 of the most abundant proteins in control C₁ were related to energy production (ATP synthase β subunit), survival (Ycf2 protein) and metabolism (cysteine synthase).

Discussion

Taxonomic classification of RG26

Our preliminary Blast analysis indicated that strain RG26 was most similar to species in *Ceratobasidium*, but an in depth phylogenetic analysis with reference sequences from the *Rhizoctonia* group, including the genera *Sebacina* and *Tulasnella* (data not shown) suggested a closer relationship with *Thanatephorus* (Fig. 1). The identification of this group of fungi associated with orchids has not been clearly demonstrated due to the existence of many closely-related but poorly defined species, deposited in databases with little information regarding cultivation and morphological, morphometric and physiological characteristics, all of which are needed to confirm information obtained using classical and molecular taxonomic analyses (Gonzalez et al. 2001; Taylor and McCormick 2008; Yagame et al. 2008; Mosquera-Espinosa et al. 2013). The classification of the *Rhizoctonia* group is still in doubt owing to the genetic, physiological, morphological and pathological complexities of the species of which it is comprised (Gonzalez et al. 2001). For example, it is thought that *Rhizoctonia solani* (teleomorph: *Thanatephorus cucumeris*) is a mixture of species because 14 anastomosis groups have been reported for a single species having a single morphology (Gonzalez et al. 2001). More information, obtained using classical and molecular integrative studies, is needed to clarify the taxonomy of this complex of organisms. Oberwinkler et al. (2013) suggested a reevaluation of the *Ceratobasidium-Uthabasidium-Rhizoctonia* complex based on data obtained using comparative microscopy, transmission electron microscopy and molecular analysis. They observed that *Thanatephorus* and *Ceratobasidium* are genetically related genera, in agreement with the results of other molecular and/or morphological studies (Andersen 1996; Johanson et al. 1998; Tu and Kimbrough 1978; Gonzalez et al. 2001). Problems in identifying members of this group stem from the difficulties in their cultivation and their failure to produce reproductive structures when grown in culture media. For these reasons, molecular markers are the best manner for identifying them. Taylor and McCormick (2008) recommended using oligonucleotides ITS1-OF with ITS4-OF for symbionts in the phylum Basidiomycota and ITS-F with ITS4 for the Ascomycota. For use with the *Tulasnella* genus, oligonucleotides Tul1 with Tul4 (Porrás-Alfaro and Bayman 2007) and ITS-Tul with ITS1 or ITS5 (Taylor and McCormick 2008) have been reported. For ectomycorrhizas, oligonucleotides SSU1318-Tom with LSU-Tom4 have been proposed for species of *Tomentella* and *Thelephora*. For the *Ceratobasidium-Thamatephorus* group, primers CeTh1 with CeTh4 have been used (Porrás-Alfaro and Bayman 2007). In addition, use of other molecular markers like the genes encoding β -tubulin, the segment of expansion region (ES) D11 of 28S rRNA, Ras protein, chitin synthase, the ITS region, the mitochondrial ribosome large subunit (mtLSU), actin and calmodulin has been proposed (González-García et al. 2006; González et al. 2006;

Porras-Alfaro and Bayman 2007; González 2013). The use of molecular markers suggested in these works will be required to classify strain RG26 at the species level.

Development of O. sphacelatum

In this work, the fungus *Thanatephorus* sp. RG26 promoted the growth and differentiation of *O. sphacelatum* protocorms, indicative of a nonspecific symbiotic interaction. This agrees with previous results showing that strain RG26 was beneficial to other species in the *Oncidiinae*, promoting *R. bictoniensis* protocorm development and *R. grande* germination (Bertolini et al. 2011). In the work presented here, the promotion of protocorm development by the fungus was evident (Fig. 3) despite the large variability in measurements for area and roundness factor obtained using visual computation methods. This variability could stem from how the images were obtained, which did not permit capturing the entire structure of the differentiated protocorms in the treated samples (cultured with RG26). Also, genetic variation between orchid seeds/protocorms could have been a factor (Weber and Webster 2001). For example, Bertolini et al. (2014) found protocorms with multiple meristems in *R. grande*, such as those that we observed. With respect to plant structure, we observed that some of the protocorms of the control and treatment samples developed foliar primordia and leaves pointing upwards (and thus not integrated into total area determinations), while others developed in more lateral positions.

For now, we report that strain RG26 is a "presumably mycorrhizal fungal endophyte" (Bayman and Otero 2006), based on our observation of haustoria hyphae and pelotons of strain RG26 within parenchyma cells of the protocorms, structures that are characteristic of the mycorrhizal infection of orchids (Smith and Read 2008). Brundrett (2006) points out that fungi having a mycorrhizal functions develop specialized hyphae that help in the colonization of specialized plant organs and establish a bidirectional, synchronized transfer of nutrients that may strongly or weakly benefit plant development. Using *O. sphacelatum*, it would be worth studying metabolite transfer using stable isotopes or metabolomics to clarify the role of microorganisms in crucial processes like the epiphytic orchid-fungus symbiosis.

Proteomic analysis

The fungus RG26 promoted the growth of *O. sphacelatum* over the 63 days course of the experiment, possibly by transferring carbohydrates, vitamins and amino acids to the protocorm (Arditti 1967; Alexander and Hadley 1985; Kuga et al. 2014). This would result in their enhanced growth and the early differentiation of meristems, consistent with the higher expression of β -tubulin in the orchid. Interestingly, increased tubulin expression has been implicated in diverse functions that could be essential for the interaction. The protein is present in microtubules and is related to

nuclear division, cell movement during the cell cycle, cytokinesis, cell wall formation, cell elongation, growth and orientation, and polarity establishment (Timonen and Peterson 2002). Tubulin may also play roles in organelle organization, vesicular trafficking and intra- and extracellular communication in association with other proteins (Chuong et al. 2004). In tomato interacting with the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* the levels of α , β and γ -tubulins increased (Timonen and Peterson 2002; Timonen and Smith 2005). In *Eucalyptus globulus* associated with *Pisolithus tinctorius*, increased α -tubulin was associated with root formation (Díaz et al. 1996). In our work, the protocorms had not yet formed roots at 63 days, when the proteome analysis was performed.

Possibly, the protocorms activate diverse pathways in response to the presence of the fungus, producing housekeeping proteins needed to support growth, which would explain the expression of the DEAD-box ATP RNA helicase, the nucleolar GTP-binding protein and xanthine dehydrogenase in the plant, and of the pyridoxal phosphate-binding molybdenum cofactor sulfurase in RG26. Xanthine dehydrogenase is involved in purine recycling and has a role in the growth of *Arabidopsis* following stress (Brychkova et al. 2008; Watanabe et al. 2010). In *Arabidopsis* mutants deficient in abscisic acid synthesis, molybdenum cofactor sulfurases like ABA3 are required to activate aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase (Bittner et al. 2001). The DEAD-box RNA helicase is essential for mRNA export during development and as a response to stress (Gong et al. 2005). These proteins are also involved in RNA degradation, physical interaction with the transcription apparatus, splicing of pre-mRNA, ribosome biogenesis, RNA transport, translational initiation and organelle-specific gene expression (Rocak and Linder 2004). Also, nucleolar GTP-binding protein is involved in ribosome biosynthesis in eukaryotic cells.

In the fungus-orchid interaction, the pelotons have been reported to be separated from the plant cell cytoplasm by a host-derived membrane and interfacial matrix (Peterson et al. 1996), which are lysed by the orchid as a mechanism of regulation and/or for obtaining nutrients (Hadley and Williamson 1971; Kuga et al. 2014). This could be occurring in the protocorms after 63 days of interaction, causing a stress response in RG26 and increasing its levels of Sin1 and the TPR-2 domain protein. Sin1 is involved in signal transduction by stress-activated MAP-kinases (Wang and Roberts 2005). Under thermal and osmotic stress, stress-activated MAP-kinase in the fungus *Epichloë festucae* potentially detects and signals the presence of oxidative stress, along with participating in the asexual development of the fungus (Eaton et al. 2008). TPR domains (tetratricopeptide repeats) form part of mitochondrial membrane translocator receptors, chaperone adaptors and protein regulators of enzymes like NADPH oxidase (Scheufler et al. 2000; Chan et al. 2006; Takemoto et al. 2006; Tanaka et al. 2008). This suggests that TPR-2 could be involved in a stress resistance

mechanism as well as other metabolic functions in the fungus required during the interaction. In the treated samples, the increased expression of UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine *N*-acyltransferase indicates a higher level of lipid biosynthesis.

The development of protocorms grown in the absence of RG26 (C₁) was diminished and may indicate that the orchid produced only proteins necessary for survival and energy production, such as Ycf2, ATP synthase β -subunit and cysteine synthase. The function of Ycf2 is not yet known but it may be involved in non-chloroplast associated ATP synthesis, cell division, chaperone activity, detoxification and stress responses (Wicke et al. 2011; Ruiz-Nieto 2013). In some plants, Ycf1 and Ycf2 are essential for survival and water absorption (Drescher et al. 2000; Ruiz-Nieto 2013). The ATP synthase complex, located in the mitochondrial membrane, participates in ATP synthesis. In rice (*Oryza sativa* L.), the β -subunit of ATP synthase is overexpressed during saline stress (Reyes et al. 2008). In maize (*Zea mays* L.), foxtail millet (*Setaria italica* L. cv. Prasad), rice and date palm (*Phoenix dactylifera* L.) the protein is regulated by salt and drought stress (Veeranagamallaiah et al. 2008; Ji et al. 2012; Cheng et al. 2014; El Rabey et al. 2015). The identification of 4 proteins related to ATP synthesis is worth noting, since it suggests that the protocorms require a substantial amount of energy for adapting to and growing in a nutrient-poor substrate. Cysteine synthase is a two-protein complex participating in the synthesis of sulfur-containing amino acids and participates in sulfur regulation in plants (Wirtz and Hell 2006). The higher expression of the transcription factor Stp2 was observed in control C₂, and it has shown to be activated by the presence of extracellular aminoacids (Martínez and Ljungdahl 2005; Tumusiime et al. 2011), consistent with the presence of yeast and oat extracts in the medium. Fungi excrete hydrolytic enzymes to degrade complex organic substances such as proteins, polysaccharides and lipids for later use as their monomers or oligomers more simple (Campbell and Reece 2007).

The identification of proteins from RG26 was complicated by the paucity of information in the databases for fungal proteins, especially those from the *Rhizoctonia* group. Our results point to possible functions for several proteins that have not been extensively characterized in either organism. We also show that strain RG26 is a species of *Thanatephorus* genetically related to *Ceratobasidium*, and further analysis will be required to define its species. It is clear that RG26 is not specific in its interaction with *O. sphacelatum*, since it was not isolated from this orchid species but nevertheless promotes its protocorm growth and differentiation, as observed in other orchids of the *Oncidiinae* subtribe. Along with the morphological evidence, it is notable that the orchid-fungus interactions results in the

differential expression of proteins that permits us to infer possible changes in the physiology related to growth and metabolism, including signs of stress responses, in both organisms during the interaction.

Acknowledgements

We thank Guadalupe Nieto-López for the scanning electron microscopy analysis, Luis Barbosa for analysis with the MATLAB R2012a program, Alejandro Zamora for help in protein extraction and the phylogenetic reconstruction of strain RG26, and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología scholarship No. 355415. We thank Michael F. Dunn for his valuable contribution to the improvement of the manuscript.

Conflic to interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Ahmed AOA, Mukhtar MM, Kools-Sijmons M, Fahal AH, Hoog S, Ende BG, Zijlstra EE, Verbrugh H, Abugroun AM, Elhassan AM, Belkum A (1999) Development of a species-specific PCR-restriction fragment length polymorphism analysis procedure for identification of *Madurella mycetomatis*. J Clin Microbiol 37:3175–3178

Alexander C, Hadley G (1985) Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. New Phytol 101:657-665. doi:10.1111/j.1469-8137.1985.tb02871.x

Andersen TF (1996) A comparative taxonomic study of *Rhizoctonia sensu lato* employing morphological, ultrastructural and molecular methods. Mycol Res 100:1117-1128. doi:10.1016/S0953-7562(96)80224-3

Arditti J (1967) Factors affecting the germination of orchid seeds. Bot Rev 33:1-97. doi:10.1007/BF02858656

Bayman P, Otero JT (2006) Microbial endophytes of orchid roots. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN (eds) Microbial root endophytes. 1st edn. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 153-177

Bertolini V, Damon A, Rojas ANV (2011) Symbiotic germination of three species of epiphytic orchids susceptible to genetic erosion, from Soconusco (Chiapas, Mexico). *European Journal of Environmental Sciences* 1:60-68

Bertolini V, Damon A, Rojas ANV (2014) Quelato de hierro y agua de coco en la germinación *in vitro* de *Rossioglossum grande* (Orchidaceae). *Acta Agronómica* 63:1-14

Bittner F, Oreb M, Mendel RR (2001) ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 276:40381-40384. doi:10.1074/jbc.C100472200

Brundrett MC (2006) Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN (eds) *Microbial root endophytes*. 1st edn. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 281-298

Brychkova G, Alikulov Z, Fluhr R, Sagi M (2008) A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1 Arabidopsis* mutant. *Plant J* 54:496-509. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03440.x

Campbell NA, Reece JB (2007) *Biología*. Editorial Médica Panamericana, Madrid

Cameron DD, Johnson I, Read DJ, Leake JR (2008) Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytol* 180:176-184. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02533.x

Chan NC, Likić VA, Waller RF, Mulhern TD, Lithgow T (2006) The C-terminal TPR domain of Tom70 defines a family of mitochondrial protein import receptors found only in animals and fungi. *J Mol Biol* 358:1010-1022. doi:10.1016/j.jmb.2006.02.062

Chatterjee M, Gupta S, Bhar A, Das S (2012) Optimization of an efficient protein extraction protocol compatible with two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry from recalcitrant phenolic rich roots of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Int J Proteomics*. doi:10.1155/2012/536963

Cheng Y, Chen G, Hao D, Lu H, Shi M, Mao Y, Huang X, Zhang Z, Xue L (2014) Salt-induced root protein profile changes in seedlings of maize inbred lines with differing salt tolerances. *Chilean J Agric Res* 74:468-476. doi:10.4067/S0718-58392014000400014

Chuong SDX, Good AG, Taylor GJ, Freeman MC, Moorhead GBG, Muench DG (2004) Large-scale identification of tubulin-binding proteins provides insight on subcellular trafficking, metabolic channeling, and signaling in plant cells. *Mol Cell Proteomics* 3:970-983. doi:10.1074/mcp.M400053-MCP200

Damon A (2013) Conservation status and strategies for the preservation of orchids in the Soconusco region of southeast Mexico. *Lankesteriana* 13:27-31

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

Damon AA, Cruz-López L (2006) Fragrance in relation to pollination of *Oncidium sphacelatum* and *Trichocentrum oerstedii* (Orchidaceae) in the Soconusco region of Chiapas, Mexico. *Selbyana* 27:186-194

Damon A, Salas-Roblero P (2007) A survey of pollination in remnant orchid populations in Soconusco, Chiapas, Mexico. *Tropical Ecology* 48:1-14

Dell'Aquila A (2005) The use of image analysis to monitor the germination of seeds of broccoli (*Brassica oleracea*) and radish (*Raphanus sativus*). *Ann Appl Biol* 146:545–550. doi:10.1111/j.1744-7348.2005.040153.x

Dell'Aquila A (2009) Digital imaging information technology applied to seed germination testing. A review. *Agron Sustain Dev* 29:213–221. doi:10.1051/agro:2008039

Díaz EC, Martín F, Tagu D (1996) Eucalypt α -tubulin: cDNA cloning and increased level of transcripts in ectomycorrhizal root system. *Plant Mol Biol* 31:905-910. doi:10.1007/BF00019477

Drescher A, Ruf S, Calsa TJr, Carrer H, Bock R (2000) The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *Plant J* 22:97-104

Eaton CJ, Jourdain I, Foster SJ, Hyams JS, Scott B (2008) Functional analysis of a fungal endophyte stress-activated MAP kinase. *Curr Genet* 53:163-174. doi:10.1007/s00294-007-0174-6

El Rabey HA, Al-Malki AL, Abulnaja KO, Rohde W (2015) Proteome analysis for understanding abiotic stress (salinity and drought) tolerance in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *International Journal of Genomics*. Article ID 407165

Encarnación S, Hernández M, Martínez-Batallar G, Contreras S, Vargas MC, Mora J (2005) Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes. *Biol Proced Online* 7:117-135. doi:10.1251/bpo110

Gentry AH, Dodson CH (1987) Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. *Ann Mo Bot Gard* 74:205-233. doi:10.2307/2399395

Gong Z, Dong CH, Lee H, Zhu J, Xiong L, Gong D, Stevenson B, Zhu JK (2005) A DEAD box RNA helicase is essential for mRNA export and important for development and stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:256-267. doi:10.1105/tpc.104.027557.

González D (2013) Identification, molecular characterization, and evolution of group I introns at the expansion segment D11 of 28S rDNA in *Rhizoctonia* species. *Fungal Biol* 117:623-637. doi:10.1016/j.funbio

Gonzalez D, Carling DE, Kuninaga S, Vilgalys R, Cubeta MA (2001) Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. *Mycologia* 93:1138-1150. doi:10.2307/3761674

González D, Cubeta MA, Vilgalys R (2006) Phylogenetic utility of indels within ribosomal DNA and β -tubulin sequences from fungi in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mol Phylogenet Evol* 40:459-470. doi:10.1016/j.ympev.2006.03.022

González-García V, Portal MAO, Rubio VS (2006) Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Span J of Agric Res* 4:55-79. doi:10.5424/sjar/2006041-178

González MG (2008) Aspectos de sistemática y biología del complejo *Rhizoctonia*. *Fitosanidad* 12:147-159

Hadley G, Williamson B (1971) Analysis of the post-infection growth stimulus in orchid mycorrhiza. *New Phytol* 70:445-455. doi:10.1111/j.1469-8137.1971.tb02546.x

Hicks AJ (2007) Orchid seed germination media. A compendium of formulations. The orchid seedbank project, USA

Ji K, Wang Y, Sun W, Lou Q, Mei H, Shen S, Chen H (2012) Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. *J Plant Physiol* 169:336-344. doi:10.1016/j.jplph.2011.10.010

Johanson A, Turner HC, McKay GJ, Brown AE (1998) A PCR-based method to distinguish fungi of the rice sheath-blight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* and *R. oryzae-sativae*. *FEMS Microbiol Lett* 162:289-294. doi:10.1016/S0378-1097(98)00136-0

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120. doi:10.1007/BF01731581

Knudson L (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Soc Bull* 14:214- 217

Kuga Y, Sakamoto N, Yurimoto H (2014) Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *New Phytol* 202:594–605. doi:10.1111/nph.12700

Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J (2000) Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *J Clin Microbiol* 38:471

Martínez P, Ljungdahl PO (2005) Divergence of Stp1 and Stp2 transcription factors in *Candida albicans* places virulence factors required for proper nutrient acquisition under amino acid control. *Mol Cell Biol* 25:9435-9446. doi:10.1128/MCB.25.21.9435-9446.2005

Mosquera-Espinosa AT, Bayman P, Otero JT (2010) *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronómica* 59:316-326

Mosquera-Espinosa AT, Bayman P, Prado GA, Gómez-Carabalí, Otero JO (2013) The double life of *Ceratobasidium*: Orchid mycorrhizal fungi and their potential for biocontrol of *Rhizoctonia solani* sheath blight of rice. *Mycologia* 105:141-150. doi:10.3852/12-079

Nieto GL, Damon A (2008) Morphology of the pollinia and pollinaria of orchids from southeast Mexico. *Selbyana* 29:20-68

Oberwinkler F, Riess K, Bauer R, Kirschner R, Garnica S (2013) Taxonomic re-evaluation of the *Ceratobasidium-Rhizoctonia* complex and *Rhizoctonia butinii*, a new species attacking spruce. *Mycol Prog* 12:763-776. doi:10.1007/s11557-013-0936-0

Pereira OL, Kasuya MCM, Rollemberg CL, Borges AC (2005) Indução *in vitro* da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (Orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides. Rev Bras Cienc Solo 29:199-206.

Perotto S, Rodda M, Benetti A, Sillo F, Ercole E, Rodda M, Girlanda M, Murat C, Balestrini R (2014) Gene expression in mycorrhizal orchid protocorms suggests a friendly plant–fungus relationship. Planta 239:1337-1349. doi:10.1007/s00425-014-2062-x

Peterson RL, Uetake Y, Bonfante P, Faccio A (1996) The interface between fungal hyphae and orchid protocorm cells. Can J Botany 74:1861-1870. doi:10.1139/b96-223

Porras-Alfaro A, Bayman P (2007) Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: Diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. Mycologia 99:510-525. doi:10.3852/mycologia.99.4.510

R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>

Rasmussen HN (2002) Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. Plant Soil 244:149–163. doi:10.1023/A:1020246715436

Reyes Y, Mazorra LM, Núñez CM (2008) Aspectos fisiológicos y bioquímicos de la tolerancia del arroz al estrés salino y su relación con los brasinoesteroides. Cultivos Tropicales 29:67-75

Ruiz-Nieto JE, Montero VT, Acosta JAG, Piedra EI, Aguirre CLM, Ramírez JGP, Raya JCP (2013) Caracterización fisiológica y genética del uso eficiente del agua en dos variedades de frijol contrastantes. *Ciencia y Tecnol Agrop México* 1:43-51

Rocak S, Linder P (2004) DEAD-Box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Bio* 5:232-241. doi:10.1038/nrm1335

Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU, Moarefi I (2000) Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101:199-210. doi:10.1016/S0092-8674(00)80830-2

Smith SE, Read DJ (1996) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, California

Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, New York

Takemoto D, Tanaka A, Scott B (2006) A p67^{Phox}-like regulator is recruited to control hyphal branching in a fungal-grass mutualistic symbiosis. *Plant Cell* 18:2807-2821

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725-2729. doi:10.1093/molbev/mst197

Tanaka A, Takemoto D, Hyon GS, Park P, Scott B (2008) NoxA activation by the small GTPase RacA is required to maintain a mutualistic symbiotic association between *Epichloë festucae* and perennial ryegrass. *Mol Microbiol* 68:1165-1178. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06217.x

Taylor DL, McCormick MK (2008) Internal transcribed spacer primer and sequences for improved characterization of basidiomycetous orchid mycorrhizas. *New Phytol* 177:1020-1033. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02320.x

Timonen S, Peterson RL (2002) Cytoskeleton in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 244:199-210. doi:10.1023/A:1020209213524

Timonen S, Smith SE (2005) Effect of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on expression of cytoskeletal proteins in tomato roots. *Can J Botany* 83:176-182. doi:10.1139/b04-160

Tu CC, Kimbrough JW (1978) Systematics and phylogeny of fungi in the *Rhizoctonia* complex. *Bot Gaz* 139:454-466

Tumusiime S, Zhang C, Overstreet MS, Liu Z (2011) Differential regulation of transcription factor Stp1 and Stp2 in the Ssy1-Ptr3-Ssy5 amino acid sensing pathway. *J Biol Chem* 286:4620-4631. doi:10.1074/jbc.M110.195313

Valadares RBS, Perotto S, Santos EC, Lambais MR (2013) Proteome changes in *Oncidium sphacelatum* (Orchidaceae) at different trophic stages of symbiotic germination. *Mycorrhiza* 24:349-360. doi:10.1007/s00572-013-0547-2

Veeranagamallaiah G, Jyothsnakumari G, Thippeswamy M, Obul PCR, Surabhi GK, Sriranganayakulu G, Mahesh Y, Rajasekhar B, Madhurekha C, Sudhakar C (2008) Proteomic analysis of salt stress responses in foxtail millet (*Setaria italica* L. cv. Prasad) seedlings. *Plant Sci* 175:631-641. doi:10.1016/j.plantsci.2008.06.017

Verdugo G, Marchant J, Cisternas M, Calderón X, Peñaloza P (2007) Caracterización morfológica de la germinación de *Chloraea crispa* Lindl. (Orchidaceae) usando análisis de imágenes. *Gayana Bot* 64:232-238

Wang SZ, Roberts RM (2005) The evolution of the Sin1 gene product, a little known protein implicated in stress responses and type I interferon signaling in vertebrates. *BMC Evol Biol* 5:13. doi:10.1186/1471-2148-5-13

Watanabe S, Nakagawa A, Izumi S, Shimada H, Sakamoto A (2010) RNA interference-mediated suppression of xanthine dehydrogenase reveals the role of purine metabolism in drought tolerance in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 584:1181-1186. doi:10.1016/j.febslet.2010.02.023

Watkinson JJ, Welbaum GE (2003) Characterization of gene expression in roots of *Cypripedium parviflorum* var. *pubescens* incubated with a mycorrhizal fungus. *Acta Hort* 463-470

Weber RWS, Webster J (2001) Teaching techniques for mycology: 14. Mycorrhizal infection of orchid seedlings in the laboratory. *Mycologist* 15:55-59. doi:10.1016/S0269-915X(01)80077-X

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp 315-322

Wicke S, Schneeweiss GM, dePamphilis CW, Müller KF, Quandt D (2011) The evolution of the plastid chromosome in land plants: Gene content, gene order, gene function. *Plant Mol Biol* 76:273-297. doi:10.1007/s11103-011-9762-4

Wirtz M, Hell R (2006) Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: Structural, biochemical and regulatory properties. *J Plant Physiol* 163:273-286. doi:10.1016/j.jplph.2005.11.013

Yagame T, Yamato M, Suzuki A, Iwase K (2008) Ceratobasidiaceae mycorrhizal fungi isolated from nonphotosynthetic orchid *Chamaegastrodia sikokiana*. *Mycorrhiza* 18:97-101. doi:10.1007/s00572-007-0155-0

Zettler LW, McInnis TM (1993) Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes cernua* and *Goodyera pubescens* (Orchidaceae: Spiranthoideae). *Lindleyana* 8:155-162

Zhao MM, Zhang G, Zhang DW, Hsiao YY, Guo SX (2013) ESTs Analysis reveals putative genes involved in symbiotic seed germination in *Dendrobium officinale*. *PLOS ONE* 8:e72705. doi:10.1371/journal.pone.0072705

Figure legends

Fig. 1 Phylogenetic relationship of RG26 with species in the genera *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* based on its ITS sequence. The tree was constructed by the maximum-likelihood method based on the Kimura-2-parameter model (Kimura 1980) using the MEGA6 program (Tamura et al. 2013). The tree is drawn to scale with branch lengths proportional to the number of substitutions per site. The analysis included 12 nucleotide sequences with a total of 362 positions in the final data set

Fig. 2 Growth of *O. sphacelatum* protocorms grown with (n = 8) or without (n = 13) fungus RG26 for 98 days, measured by area (panel a) and roundness factor (FR) (panel b)

Fig. 3 Images of *O. sphacelatum* protocorms grown on oat medium. Protocorms after 1 or 63 days without inoculation (a) or with inoculation (b) with strain RG26

Fig. 4 Images obtained by optical (a) and scanning electron (b-d) microscopy of *O. sphacelatum* protocorms (stage VI, Zettler and McInnis 1993) cultured with strain RG26 for 99 days. Green arrows indicate fungal pelotons and red arrows indicate haustoria

Fig. 5 Representative 2D gels showing proteins from *O. sphacelatum* (a), fungus RG26 (b) and the fungus-orchid interaction (c), after 63 days in oat medium. Proteins with higher expression in C₁ (orchid; spots 86-150), C₂ (fungus; spots 151-176) and T (interaction; spots 1-85) are indicated

Table 1 Proteins identified in *O. sphacelatum* protocorms (C₁), fungi RG26 (C₂), and the orchid-fungus interaction (T)

Spot	Description	Organism	Accession (protein)	MASCOT score	% coverage	Peptide number	calculated Mr	pI
<i>Orchid-fungus interaction</i> **								
K1a*	TPR-2 domain protein (fragment)	<i>Rhizoctonia solani</i>	A0A074REK1	64	26	7/27	61101	5.55
K1b	Hypothetical protein CARUB_v10012210mg (related to nucleolar GTP-binding domain)	<i>Capsella rubella</i>	gi 565497390	87	21	11/28	73083	9.37
K2	Predicted protein (related to dymeclin domain)	<i>Micromonas pusilla</i>	gi 303274232	86	22	11/36	49923	6.55
K4	Hypothetical protein AALP_AA1G184200 (related to DEAD-box ATP RNA helicase domain)	<i>Arabis alpina</i>	gi 674251101	72	22	7/19	55896	8.93
K14	Beta-tubulin	<i>Vanilla planifolia</i>	F2YP47	75	20	11/34	50827	4.77
K20*	Uncharacterized protein (related to UDP-3-O-[3-hydroxyristoyl] glucosamine <i>N</i> -acyltransferase domain)	<i>Rhizoctonia solani</i>	A0A066VAP6	67	21	7/26	46913	5.39
K23*	Uncharacterized protein (related to molybdenum cofactor sulfurase domain)	<i>Thanatephorus cucumeris</i>	A0A0B7FGR7	71	24	6/29	41645	6.34
K25*	Stress-activated MAP kinase-interacting protein 1 (Sin1)	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Thanatephorus cucumeris</i>	A0A0B7FI13	61	14	8/19	107212	6.71
K28	Xanthine dehydrogenase (fragment)	<i>Arnottia mauritiana</i>	E5D2E9	66	25	8/33	35056	7.74
<i>Orchid</i>								
K92	ATP synthase subunit β (fragment)	<i>Prescottia oligantha</i>	C6G4L7	73	32	12/36	53004	5.10
K93	ATP synthase subunit β , chloroplastic	<i>Masdevallia coccinea</i>	A0A0C4ZPL7	95	33	13/37	53830	5.16
K94	Protein Ycf2	<i>Corallorhiza macrantha</i>	A0A0A0UQC4	67	7	10/18	269727	8.93
K124	Cysteine synthase	<i>Citrullus lanatus</i>	CYSK_CITLA	61	30	7/30	34492	6.25
<i>Tanatephorus sp. RG26</i>								
K175	Transcription factor STP2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	STP2_YEAST	73	16	6/31	61381	5.93

**Spots identified by Orchidaceae, Viridiplantae and Ceratobasidiaceae database. * RG26 proteins

Figure1

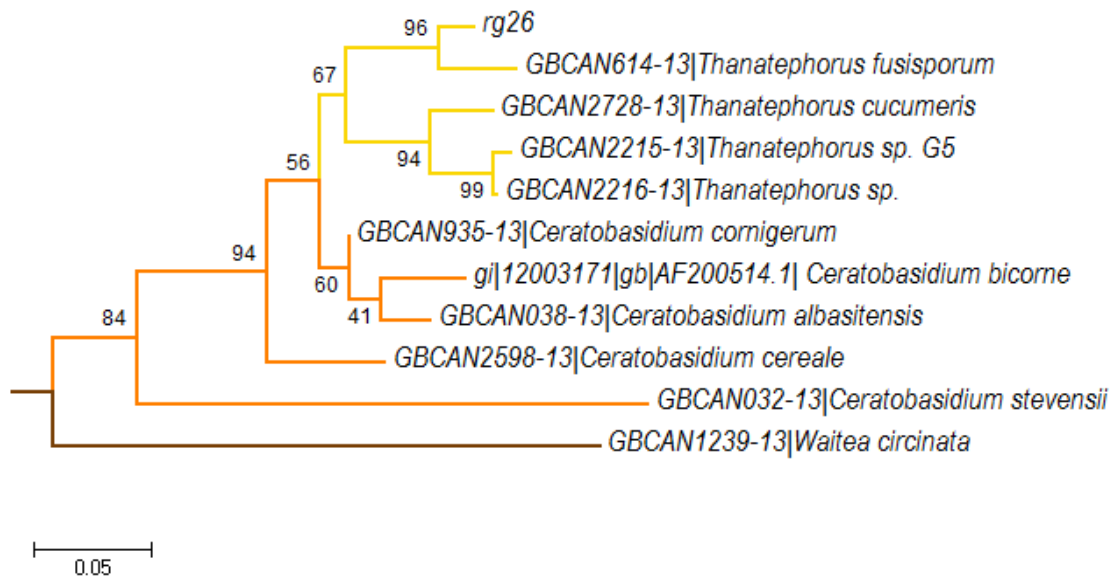


Figure2

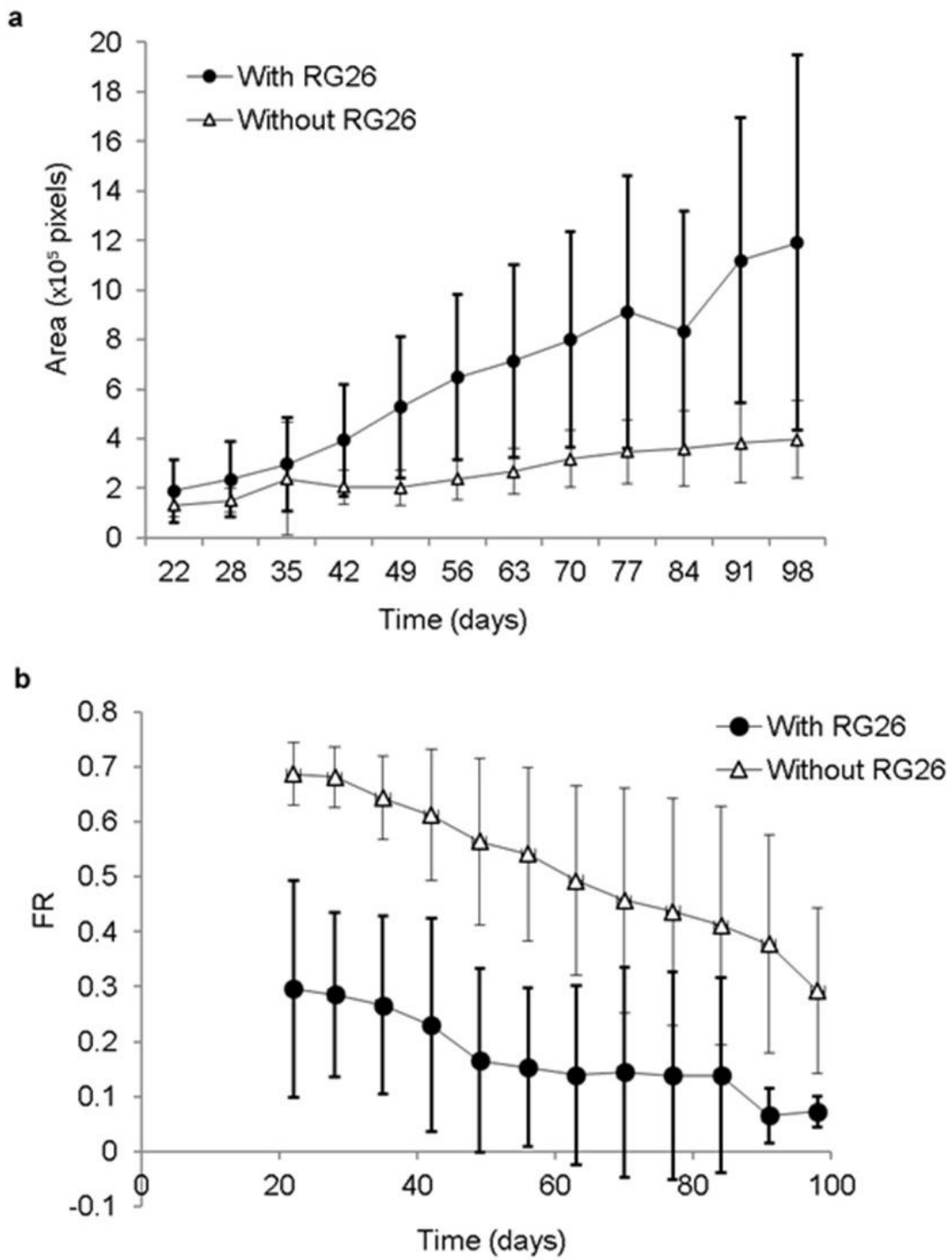


Figure3

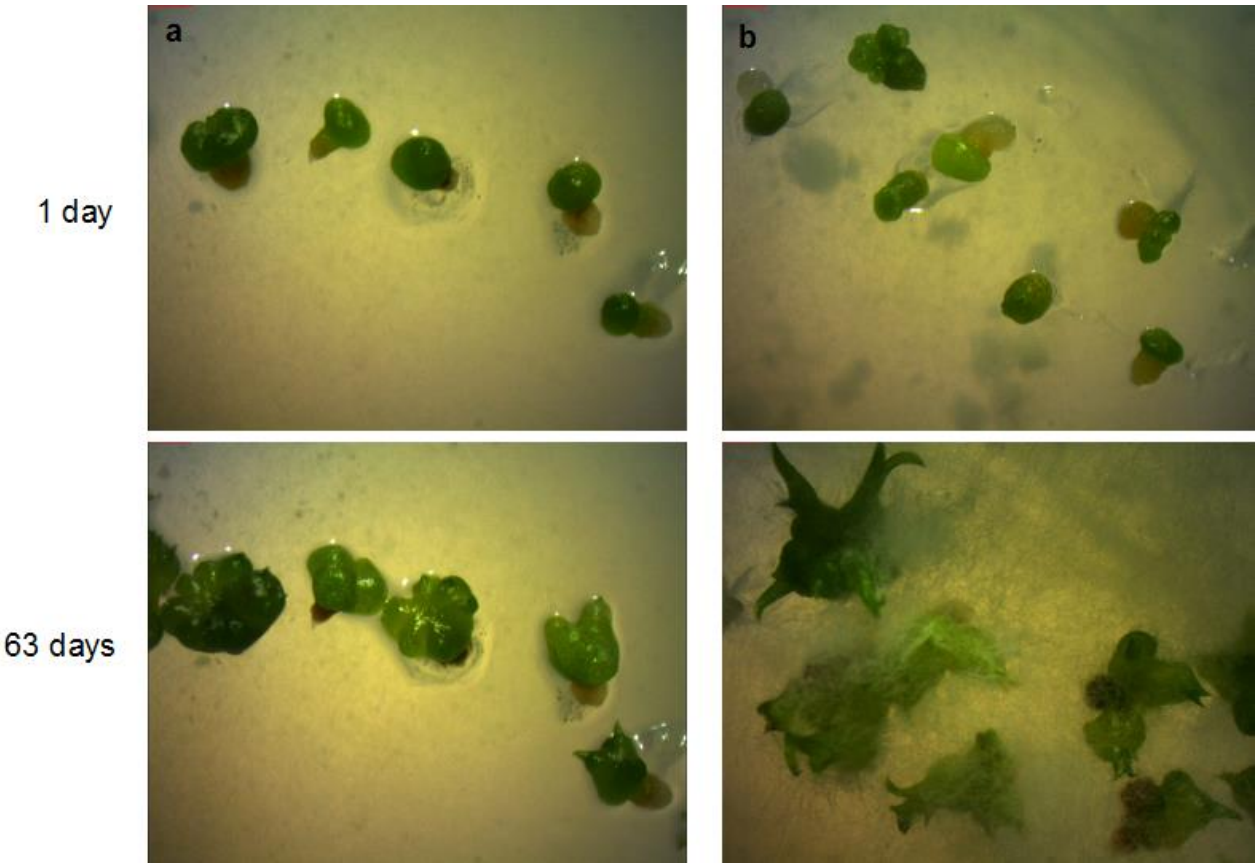


Figure4

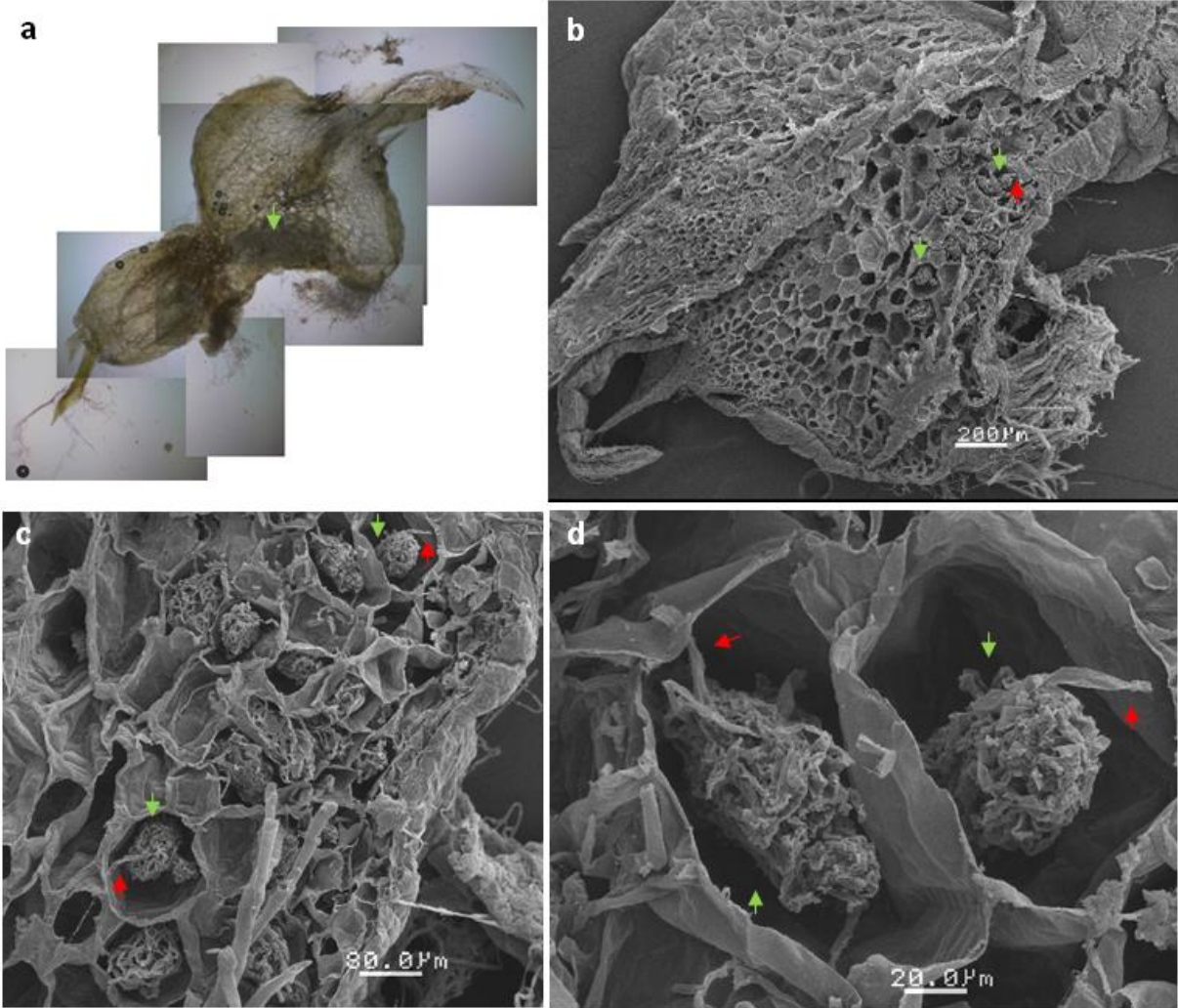
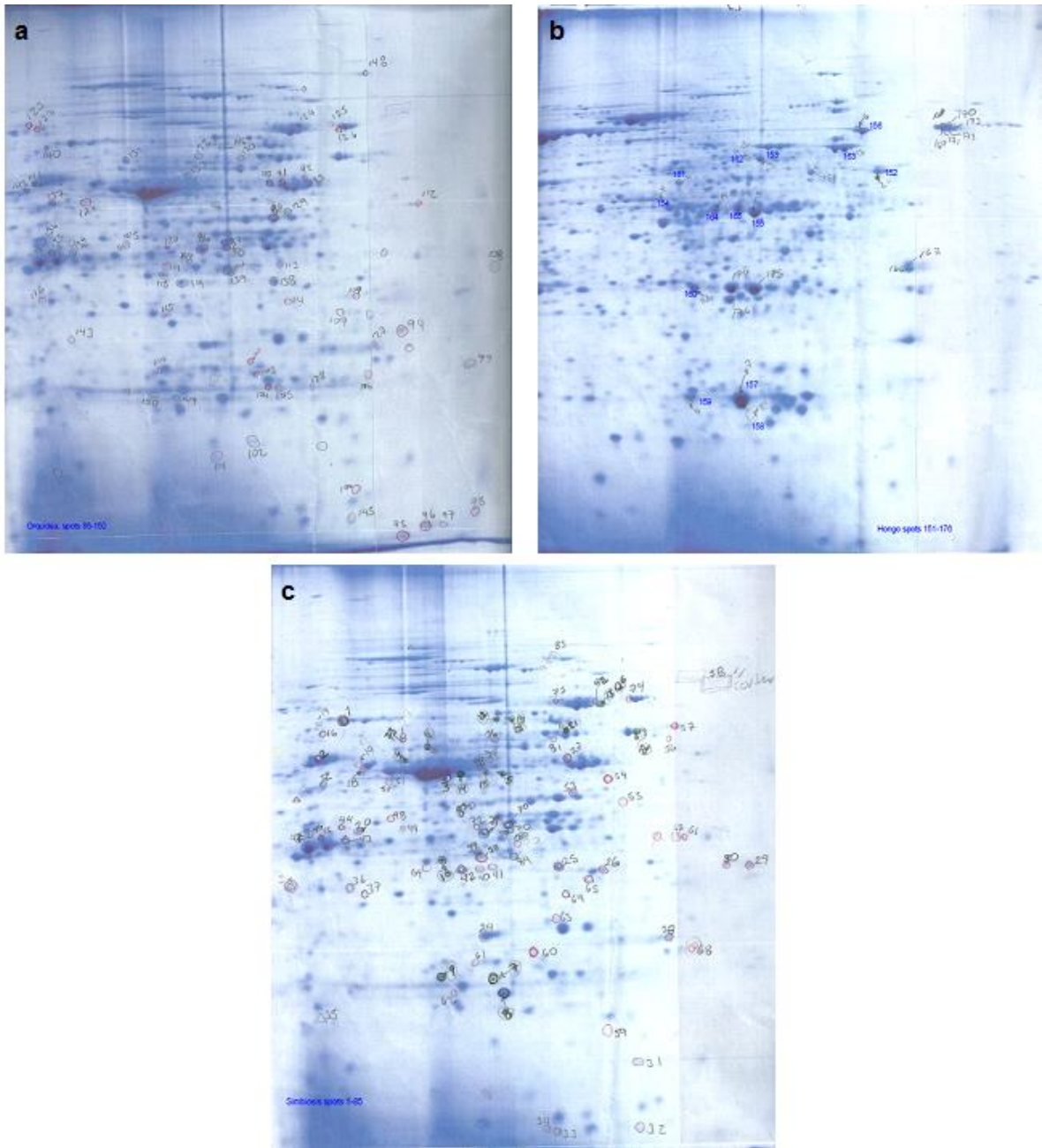


Figure5



CAPÍTULO V CONCLUSIONES

1. Con los oligonucleótidos ITS4 e ITS5 se logró identificar a nivel de género a la cepa fúngica RG26.
2. RG26 es una especie del género *Thanatephorus*, se encuentra estrechamente relacionada con *Ceratobasidium* y forma parte del grupo *Rhizoctonia*.
3. La cepa RG26 aislada de raíces de *Rossioglossum grande* estableció una relación benéfica con protocormos de *O. sphacelatum* durante 98 días.
4. El hongo RG26 no es específico de la orquídea *R. grande* porque ha favorecido la germinación de semillas de *Rhynchostele bictoniensis* y en este trabajo propició el desarrollo de *O. sphacelatum*.
5. RG26 es un hongo endófito que formó estructuras características (pelotones y haustorios) de las micorrizas de orquídea.
6. Después de los 35 días de interacción hongo-orquídea se observó un efecto en el crecimiento de los protocormos de *O. sphacelatum* cultivados con RG26.
7. *Thanatephorus* sp. cepa RG26 favoreció la diferenciación de los protocormos de *O. sphacelatum* del estado I al VI durante 98 días.
8. En los perfiles proteómicos se observaron cambios de expresión diferencial inducidos por distintos estados tróficos: autotrófico (*O. sphacelatum*), heterotrófico (RG26) y mixotrófico (interacción hongo-orquídea).
9. En los geles de dos dimensiones de la simbiosis se observó un mayor número de spots con aumento en su expresión.

10. Las proteínas secuenciadas de la orquídea estuvieron implicadas en la sobrevivencia y obtención de energía en el control C₁; mientras que en la interacción estuvieron implicadas en rescate celular y crecimiento.
11. Las proteínas secuenciadas del hongo estuvieron relacionadas con el crecimiento (C₂ y T) y estrés (T).

LITERATURA CITADA

- Agrios, G.N., 2002. *Fitopatología*. México: Editorial Limusa, S.A.
- Alexander, C. y Hadley, G., 1985. Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. *New Phytologist*, 101, pp.657-665.
- Alonso, J.R.P., 2011. *Manual de histología vegetal*. [e-book] España: Ediciones Mundi-Prensa. Disponible en: Google Libros <<https://goo.gl/T2xNVk>> [Accesado 21 marzo 2014].
- Aloui, A., Recorbet, G., Gollotte, A., Robert, F., Valot, B., Gianinazzi-Pearson, V., Aschi-Smiti, S. y Dumas-Gaudot, E., 2009. On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: A root proteomic study. *Proteomics*, 9, pp.420-433.
- Anaya, A.L.L., 2003. *Ecología química*. [e-book] Distrito Federal: Plaza y Valdés. Disponible en: Google Libros <<https://goo.gl/d44SoL>> [Accesado 22 octubre 2014].
- Arditti, J. y Ghani, A.K.A., 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145, pp. 367-421.
- Argue, C.L., 2012. *The pollination biology of North American orchids: Volume 1. North of Florida and Mexico*. [e-book] USA: Springer. Disponible en: Google Libros <<https://goo.gl/d9alxw>> [Accesado 20 junio 2015].
- Balbuena, T.S., Dias, L.L.C., Martins, M.L.B., Chiquieri, T.B., Santa-Catarina, C., Floh, E.I.S. y Silveira, 2011. Challenges in proteome analyses of tropical plants. *Brazilian Society of Plant Physiology*, 23(2), pp.91-104.
- Barrett, J., Brophy, P.M. y Hamilton, J.V., 2005. Analysing proteomic data. *International Journal for Parasitology*, 35, pp.543-553.

- Bartels, S.F. y Chen, H.Y.H., 2012. Mechanisms regulating epiphytic plant diversity. *Critical Reviews in Plant sciences*, 31, pp.391-400.
- Benzing, D.H., 1990. *Vascular epiphytes*. Australia: Cambridge University Press.
- Bertolini, V., Damon A. y Rojas, A.N.V., 2011. Symbiotic germination of three species of epiphytic orchids susceptible to genetic erosion, from Soconusco (Chiapas, Mexico). *European Journal of Environmental Sciences*, 1(2), pp.60-68.
- Bestel-Corre, G., Dumas-Gaudot, E. y Gianinazzi, S., 2004. Proteomics as a tool to monitor plant-microbe endosymbioses in the rhizosphere. *Mycorrhiza*, 14, pp.1-10.
- Bonfante, P. y Anca, I.A., 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: A network of interactions. *Annual Review of Microbiology*, 63, pp.363-383.
- Bonfante, P. y Genre, A., 2010. Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communications*, 1(48), DOI:10.1038/ncomms1046.
- Brundrett, M., 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79(3), pp.473-95.
- Brundrett, M.C., 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil*, 320, pp.37-77.
- Camargo-Ricalde, S.L., Montaña, N.M., De la Rosa-Mera, C.J. y Montaña, S.A.A., 2012. Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria*, [en línea] 13(7). Disponible en: Revista UNAM <<http://goo.gl/G8wFxV>> [Accesado 02 abril 2014].

- Cameron, D.D., Johnson, I., Leake, J.R. y Read, D.J., 2007. Mycorrhizal acquisition of inorganic phosphorus by the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *Annals of Botany*, 99, pp.831-834.
- Cameron, D.D., Johnson, I., Read, D.J. y Leake, J.R., 2008. Giving and receiving: measuring the carbon cost of mycorrhizas in the green orchid, *Goodyera repens*. *New Phytologist*, 180, pp.176-184.
- 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, pp.405-416.
- Cánovas, F.M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H-P. y Rossignol, M., 2004. Plant proteome analysis. *Proteomics*, 4, pp.285-298.
- Chase, M.W., 2005. Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. *Curtis's Botanical Magazine*, 22(1), pp.2-7.
- Clark, K.L., Nadkarni, N.M. y Gholz, H.L., 1998. Growth, net production, litter decomposition, and net nitrogen accumulation by epiphytic Bryophytes in a tropical montane forest. *Biotropica*, 30(1), pp.12-23.
- Cribb, P.J., 1999. Morphology. In: A.M. Pridgeon, P.J. Cribb, M.W. Chase, F.N. Rasmussen, eds. 1999. *Genera Orchidacearum, volume 1: General introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae*. United States: Oxford University Press. pp.13-23.
- Cruz, J.B., 2007. *Colonización micorrízica y diversidad de hongos micorrízicos en algunas especies de orquídeas epífitas tropicales en el Sureste de Chiapas, México*. M. C. Colegio de Postgraduados.

- Curtis, H., Barnes, Schnek, A. y Flores, G., 2006. *Invitación a la biología*. [e-book] Buenos Aires: Médica Panamericana. Disponible en: Google Libros <<https://goo.gl/o2D0Ms>> [Accesado 08 mayo 2015].
- Daviña, J.R., Grabile, M., Cerutti, J.C., Hojsgaard, D.H. Almada, R.D., Insaurralde, I.S. y Honfi, A.I., 2009. Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina. *Genetics and Molecular Biology*, 32, pp.811-821.
- Dearnaley, J.D.W., 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17, pp.475-486.
- Dressler, R.L., 1981. *The orchids: Natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Dressler, R.L., 1993. *Phylogeny and classification of orchid family*. Portland: Dioscorides Press.
- Dueñas, H.C.G. y Fernández-Alonso, J.L., 2007. Sinopsis de la subfamilia Spiranthoideae (Orchidaceae) en Colombia, parte I. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 31(118), pp. 5-27.
- El Hadrami, A., El-Bebany, A.F., Yao, Z., Adam, L.R., El Hadrami, I. y Daayf, F., 2012. Plants versus fungi and oomycetes: pathogenesis, defense and counter-defense in the proteomics era. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), pp.7237-7259.
- Erwin, T.L., 1983. Beetles and other insects of tropical forest canopies at Manaus, Brazil, sampled by insecticidal fogging. In: S.L. Sutton, T.C. Whitmore, A.C. Chadwich, eds. 1983. *Tropical rain forest: ecology and management*. Oxford: British Ecological Society.

- Gao, C., Zhang, F., Zhang, J., Guo, S. y Shao, H., 2009. Identification of *Anoectochilus* based on rDNA ITS sequences alignment and SELDI-TOF-MS. *International Journal of Biological Sciences*, 5(7), pp.727-735.
- Gentry, A.H. y Dodson, C.H., 1987. Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. *Annals of Missouri Botanical Garden*, 74(2), pp.205-233.
- González, M.G., 2008. Aspectos de sistemática y biología del complejo *Rhizoctonia*. *Fitosanidad*, 12(3), pp.147-159.
- González, V.G., Portal M.A.O. y Rubio, V.S., 2006. Review. Biology and Systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4(1), pp.55-79.
- Hadley, G., 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. *New Phytologist*, 69, pp.1015-1023.
- Hágsater, E. y Dumont, V., 1996. *Orchids*. UK: The World Conservation Union (IUCN)/SSC Orchid Specialist Group.
- Hágsater, E., Soto, M.Á.A., Salazar, G.A.C., Jiménez, R.M., López, M.A.R. y Dressler, R.L., 2005. *Las orquídeas de México*. D.F.: Instituto Chinoín.
- Halbinger, F. y Soto, M., 1997. *Laelias of México*. México: Herbario AMO.
- Harris, D.C., 2007. *Análisis químico cuantitativo*. [e-book] España: Editorial Reverté. Disponible en: Google Libros <<https://goo.gl/7iw17j>> [Accesado 29 mayo 2015].
- Hew, C.S. y Yong, WJ.W.H., 2004. *The physiology of tropical orchids in relation to the industry*. London: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- Honrubia, M., 2009. Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 66(1), pp.133-144.

- Jayaraman, D., Forshey, K.L., Grimsrud, P.A. y Ané, J.M., 2012. Leveraging proteomics to understand plant–microbe interactions. *Frontiers in Plant Science*, 3(44), DOI:10.3389/fpls.2012.00044.
- Johnson, N.C., Graham, J.H. y Smith, F.A., 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytologist*, 135, pp.575-585.
- Jorrín, J.V.N., Calvete, J.J. y Maldonado, 2008. Proteómica: conceptos y metodologías. In: V. Pallás, C. Escobar, P.P. Rodríguez y J.F. Marcos, eds. 2008. *Herramientas biotecnológicas en fitopatología*. [e-book] Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. Disponible en: Google Libros <<https://goo.gl/2n4o3M>> [Accesado 05 junio 2014].
- Koopowitz, H., 2001. *Orchids and their conservation*. Portland: Editorial Timber Press.
- Kottke, I., Suárez, J.P., Herrera, P., Cruz, D., Bauer, R., Haug, I., y Garnica, S., 2010. Atractiellomycetes belonging to the “rust” lineage (Pucciniomycotina) form mycorrhizae with terrestrial and epiphytic neotropical orchids, *Proceedings of the Royal Society of London B*, 277, pp.1289-1298.
- Kuga, Y., Sakamoto, N. y Yurimoto, H., 2014. Stable isotope cellular imaging reveals that both live and degenerating fungal pelotons transfer carbon and nitrogen to orchid protocorms. *New Phytologist*, 202, pp.594–605.
- Lai, T., Deng, Y., Zhang, P., Chen, Z., Hu, F., Zhang, Q., Hu, Y. y Shi, N., 2013. Proteomics-based analysis of *Phalaenopsis amabilis* in response toward *Cymbidium* mosaic virus and/or *Odontoglossum* ringspot virus infection. *American Journal of Plant Sciences*, 4, pp.1853-1862.
- Li, B., Tang, M., Tang, K., Zhao, L. y Guo, S., 2012. Screening for differentially expressed genes in *Anoectochilus roxburghii* (Orchidaceae) during symbiosis with the

- mycorrhizal fungus *Epulorhiza* sp. *Sciences China Life Sciences*, 55(2), pp.164-171.
- Li, X., Xu, W., Roy, M.C. y Jin, F., 2014. Comparative proteomic analysis of labellum and inner lateral petals in *Cymbidium ensifolium* flowers. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, pp.19877-19897.
- Lodish, H., Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, y Darnell, 2006. *Biología celular y molecular*. [e-book] Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. Disponible en: Google Libros <<https://goo.gl/e22W2D>> [Accesado 08 Junio 2014].
- Lovett, G.M., 1994. Atmospheric deposition of nutrients and pollutants in North America: an ecological perspective. *Ecological Applications*, 4(4), pp.629-650.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A. y Clark, D.P., 2012. *Brock Biology of microorganisms*. San Francisco: Pearson Education Inc.
- Maldonado, A.M.A. y Jorrín, J.V.N., 2008. Proteómica vegetal: aplicación al estudio de la interacción planta-patógeno y planta-parásita. In: V. Pallás, C. Escobar, P.P. Rodríguez y J.F. Marcos, eds. 2008. *Herramientas biotecnológicas en fitopatología*. [e-book] Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. Disponible en: Google Libros <<https://goo.gl/2n4o3M>> [Accesado 05 junio 2014].
- Marie Selby Botanical Gardens, 2014. *Orchid Adaptations to an Epiphytic Lifestyle*. [en línea] Disponible en: <<http://selby.org/>> [Accesado 26 febrero 2014]
- Mosquera-Espinosa, A.T., Bayman, P. y Otero, J.P, 2010. *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronómica*, 59, pp.316-326.
- Nadkarni, N.M. y Matelson, T.J., 1989. Bird use of epiphyte resources in neotropical trees. *Condor*, 69, pp.891-907.

- Nadkarni, N.M. y Matelson, T.J., 1992. Biomass and nutrient dynamics of epiphytic litterfall in a Neotropical montane forest, Costa Rica. *Biotropica*, 24(1), pp.24-30.
- Namasivayam, E., 2013. Proteomics: Techniques, applications, and challenges. In: D. Barh, V. Zambare, V. Azevedo, eds. 2013. Omics: Applications in biomedical, agricultural, and environmental sciences. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M., 1992. *Principios de bioquímica*. Barcelona: Editorial Omega.
- NOM-059-SEMARNAT-2010: *Norma Oficial Mexicana, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo*. Norma publicada el 06 de marzo de 2002 en el Diario Oficial de la Federación. [en línea] <<http://www.profepa.gob.mx>> [Accesado 06 febrero 2014].
- Ovando, I., Damon, A., Bello, R., Ambrosio, D., Albores, V., Adriano, L. y Salvador, M., 2005. Isolation of endophytic fungi and their mycorrhizal potential for the tropical epiphytic orchids *Cattleya skinneri*, *C. aurantiaca* and *Brassavola nodosa*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 4(3), pp.309-315.
- Palama, T.L., Menard, P., Fock, I., Choi, Y.H., Bourdon, E., Govinden-Soulange, J., Bahut, M., Payet, B., Verpoorte, R. y Kodja, H., 2010. Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage. *BMC Plant Biology*, 10, p.82.
- Pando, V.R. y Batista, C.V.F., 2008. Capítulo Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. In: F. Rebolledo, A. López Mungía, eds. 2008. *Una ventana al quehacer científico*. México: UNAM, Instituto de Biotecnología.

- Parniske, M., 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, [e-journal] 6, pp.763-775. Abstract only. Disponible en: Nature <<http://goo.gl/OQPnD0>> [Accesado 20 mayo 2015]
- Perotto, S., Rodda, M., Benetti, A., Sillo, F., Ercole, E., Rodda, M., Girlanda, M., Murat, C. y Balestrini, R., 2014. Gene expression in mycorrhizal orchid protocorms suggests a friendly plant–fungus relationship. *Planta*, 239, pp.1337-1349.
- Prescher, J.A. y Bertozzi, C., 2005. Chemistry in living systems. *Nature Chemical Biology*, 1(1), pp.13-21.
- Rasmussen, H.N., 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant Soil*, 244, pp.149-163.
- Read, D.J., Duckett, J.G., Francis, R., Ligrone, R. y Russell, A., 2000. Symbiotic fungal associations in “lower” land plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 355, pp.815-831.
- Reynolds, B.C. y Hunter, M.D., 2004. Nutrient cycling. In: M.D. Lowan y H.B. Rinker, eds. 2004. *Forest canopies*. [e-book] USA: Elsevier Academic Press. pp.387-396. Disponible en: Google Libros <<https://goo.gl/xa0Kkb>> [Accesado 20 enero 2014].
- Romero, G.A., 1996. The orchid family (*Orchidaceae*). In: E. Hágsater y V. Dumont, eds. 1996. *Orchids – Status survey and conservation action plan*. United Kingdom: IUCN.
- Sarmiento, M.F. y Romero, C.G., 2000. *Orquídeas Mexicanas*. México: Miguel Ángel Porrúa Grupo editorial.
- Sedeek, K.E.M., Qi, W., Schauer, M.A., Gupta, A.K., Poveda, L., Xu, S., Liu, Z-J., Grossniklaus, Schiestl, F.P. y Schlüter, P.M., 2013. Transcriptome and proteome

data reveal candidate genes for pollinator attraction in sexually deceptive orchids. *PLOS ONE*, 8(5), e64621.

Silvera, K., Santiago, L.S., Cushman, J.C. y Winter, K., 2010. The incidence of crassulacean acid metabolism in Orchidaceae derived from carbon isotope ratios: a checklist of the flora of Panama and Costa Rica. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 163, pp.194-222.

Smith, S.E. y Read, D.J., 1996. *Mycorrhizal symbiosis*. [e-book] California: Academic Press. Disponible en: Google Libros <<https://goo.gl/uN7gMc>> [Accesado 01 Julio 2013].

Solano-Gómez, R., Bello-López, R. y Vásquez-Martínez, A., 2007. Listado de las orquídeas de la región de Juquila, Oaxaca, México. *Naturaleza y Desarrollo*, 5(2), pp.5-14.

Tan, B.C., Chin, C.F., Liddell, S. y Alderson, P., 2013. Proteomic analysis of callus development in *Vanilla planifolia* Andrews. *Plant Molecular Biology Reporter*, 31(6), pp.1220-1229.

Téllez, M.A.A.V., Hernández, A.C. y Hernández, A.C., 2007. Orquídeas terrestres de la sierra Las Navajas, Hidalgo, México. In: A.L. López-Escamilla y G. Pulido-Flores, eds. 2007. *Simposio de biodiversidad y conservación de algunos recursos florísticos en el estado de Hidalgo*. [en línea] Hidalgo: Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. Disponible en: Google Libros <<https://goo.gl/nd9yXU>> [Accesado 23 junio 2013].

Valadares, R.B.S., Perotto, S., Santos, E.C. y Lambais, M.R., 2013. Proteome changes in *Oncidium sphacelatum* (Orchidaceae) at different trophic stages of symbiotic germination. *Mycorrhiza*, 24(5), pp.349-60.

- Valverde, T.V., Meave, J.A.C., Carabias, J.L. y Cano-Santana, Z., 2005. *Ecología y medio ambiente*. [e-book] México: Pearson educación. Disponible en: Google Libros <<https://goo.gl/A4Uq5O>> [Accesado 01 Julio 2013].
- Westermeier, R. y Naven, T., 2002. *Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag-GmbH.
- Wolf, J.H.D. y Flamenco-Sandoval, A., 2005. Distribución y riqueza de epífitas de Chiapas. In: M. González-Espinosa, N. Ramírez-Marcial y L. Ruíz Montoya, eds. 2005. *Diversidad biológica en Chiapas*. [e-book] México: Editorial Plaza y Valdés. Disponible en: Google Libros <<https://goo.gl/5s6DZ7>> [Accesado 29 octubre 2014].
- Zhao, M.M., Zhang, G., Zhang, D.W., Hsiao, Y.Y. y Guo, S.X., 2013. ESTs Analysis reveals putative genes involved in symbiotic seed germination in *Dendrobium officinale*. *PLOS ONE*, 8(8), e72705, DOI:10.1371/journal.pone.0072705.