

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE
MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE *Seemannia sylvatica* (Kunth) Hanst.
(Gesneriaceae) Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES *IN VITRO*

KATLEEN DENNIERE COLLAZOS ALVAREZ

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA

2020

AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE
MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE *Seemannia sylvatica* (Kunth) Hanst.
(Gesneriaceae) Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES *IN VITRO*

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO
DE MICROBIÓLOGA

KATTLEEN DENNIERE COLLAZOS ALVAREZ

TUTORES

PROF. Ph.D. MARCOS JOSÉ SALVADOR
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

PROF. Ph.D. ALBA RICARDO PÁEZ
UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA

2020

El presente trabajo fue desarrollado en el Departamento de Biología Vegetal del Instituto de Biología de la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP).

Campinas, São Paulo – Brasil, 2020

Nota de aceptación:

Firma Jurado 1

Firma Jurado 2

Brasil, junio de 2020

DEDICATORIA

A mi madre Alexandra Alvarez

A mi padre Libi Erney Collazos

A mis hermanos Kiefer, Kenneth y Joseph

A mi tío Osman Alvarez

A mis mayores confidentes Kely, Lady, Cristhian y Yeider

Y a mis ahijados Klaire y Cristhopher

“El secreto de la felicidad no es hacer siempre lo que se quiere, sino querer siempre lo que se hace”.

-Tolstoi

“Nuestras convicciones más arraigadas, más indubitables, son las más sospechosas. Ellas constituyen nuestro límite, nuestros confines, nuestra prisión”.

-José Ortega y Gasset

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme las fuerzas para no rendirme en todo este tiempo.

A mis padres y a mis hermanos por darme todo y estar siempre para mí, por ser mi más grande tesoro, por enseñarme siempre que debo ser primero una gran persona, ante todo, por brindarme su más sincero amor y por hacer mi vida feliz. Le agradezco a toda mi familia por estar siempre apoyándome y por enseñarme en mi día a día.

A mi tío Osman por apoyarme y ayudarme a cumplir este sueño realidad, gracias por aconsejarme y estar siempre. A mi tía Orfa y la señora Olga por ser mis otras madres y darme ese amor maternal de forma incondicional.

A mis mejores amigos les agradezco por tantos años de amistad, por nunca dejarme sola en los peores momentos y por brindarme ese cariño tan especial que me han dado durante todo este tiempo.

A Kely, mi mejor amiga y alma gemela gracias por entenderme con una simple mirada, por cuidarme y apoyarme en mis locuras, sin ti nunca hubiera logrado muchas cosas, te agradezco tanto por darme dos personitas maravillosas que se roban mi corazón a cada instante y por darme una familia en la que puedo apoyarme siempre.

A Yeider por ser mi más grande apoyo durante todo momento, gracias por enseñarme que la vida se puede gozar con el más mínimo detalle, por protegerme siempre y sobre todo por la paciencia que me has tenido.

Al profesor Marcos José Salvador por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, a todas las personas que han pasado por mi vida y que me han ayudado durante todo este proceso les estoy agradecida. A mis compañeros gracias por el tiempo y por esos momentos alegres que me han permitido vivir con ustedes.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	4
1.1 Objetivo general	4
1.2 Objetivos específicos	4
2. JUSTIFICACIÓN	5
3. MARCO TEÓRICO	7
3.1 Familia Gesneriaceae	7
3.2 Género <i>Seemannia</i>	10
3.2.1 <i>Seemannia sylvatica</i>	13
3.3 Microorganismos endofíticos.....	14
3.3.1 Bacterias endofíticas	16
3.3.2 Hongos endofíticos	20
3.3.3 Levaduras endofitas.....	21
3.4 Cultivos de tejido vegetal <i>in vitro</i>	23
3.5 Métodos de conservación	28
3.5.1. Congelación	28
3.5.2 Método Castellani.....	29
4. METODOLOGÍA	30
4.1 Selección de material vegetal	30
4.2 Aislamiento de microorganismos endofíticos.....	30
4.3 Caracterización morfológica de las cepas cultivables.....	31
4.4 Conservación de cepas	32
4.4.1 Método Castellani	32

4.4.2	Método Ultracongelamiento a -80°C.....	32
4.5	Obtención de cultivos <i>in vitro</i>	32
4.5.1	Organogénesis directa.....	32
4.5.2	Callogénesis	33
5.	CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	35
6.	RESULTADOS	36
6.1	Aislamientos de microorganismos endofíticos cultivables.....	36
6.2	Descripción morfológica de las cepas aisladas	37
6.3	Obtención de plántulas <i>in vitro</i> de <i>Seemannia sylvatica</i>	54
7.	DISCUSIÓN	58
7.1	Aislamiento y caracterización morfológica	58
7.2	Cultivo de tejidos vegetales <i>in vitro</i>	59
8.	CONCLUSIONES.....	62
9.	RECOMENDACIONES	63
10.	PERSPECTIVAS.....	64
	BIBLIOGRAFÍA.....	65
	ANEXOS	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental para la obtención de plántulas de <i>Seemannia sylvatica</i> en medio MS en combinación de hormonas fitoreguladoras empleando diferentes concentraciones.	33
Tabla 2. Diseño experimental para la obtención de callos de <i>Seemannia sylvatica</i> en medio MS en combinación de hormonas fitoreguladoras empleando diferentes concentraciones.	34
Tabla 4. Total de cepas aisladas a partir de <i>Seemannia sylvatica</i> empleando diferentes técnicas de aislamiento.	36
Tabla 5. Descripción macroscópica de los hongos aisladas de los cultivos <i>in vitro</i> en medio SDA.	38
Tabla 6. Descripción macroscópica de los hongos aislados a partir del método corte de hoja en medio de cultivo SDA.	45
Tabla 7. Descripción macroscópica de las levaduras y bacterias aisladas en 9 diferentes medios de cultivos (ISP2, ISP4, AN, SDA, PDA, R ₂ A, CZ, MEA, TSA) y purificadas en medio SDA a partir de corte de hoja.	49
Tabla 8. Descripción macroscópica del hongo aislado en medio de cultivo SC.	53
Tabla 3. Actividades a realizar en la ejecución del proyecto.	35

LISTA DE ILUSTRACIONES

- Ilustración 1. Distribución de las especies de Gesneriaceae en el nuevo mundo centrada en el norte de los Andes, América central y bosque atlántico de Brasil. Fuente: Perret *et al.*, 2012.7
- Ilustración 2. Diferencias entre cotiledones y endospermos. Modificado del autor: Panawala, 2017.9
- Ilustración 3. Clasificación de la familia Gesneriaceae. Fuente: Weber *et al.*, 2013.10
- Ilustración 4. Taxones de la tribu Gloxinieae. A) *Achimeneses misera*; B) *Gloxinia sylvatica*; C) *Kolheria grandiflora*; D) *Eucodonia andrieuxi*; E) *Dlastema comiderum*. Fuente: Roalson *et al.*, 2005.....11
- Ilustración 5. Estudios moleculares de la tribu Gloxinieae. A) nrDNA; B) ITS; C) trnl-F; D) morfología cladística. Modificado de autor: Roalson *et al.*, 2005.....12
- Ilustración 6. Planta cultivada en el campo experimental del Instituto de Biología de la Universidad Estatal de Campinas. A) Planta *Seemannia sylvatica* espécimen perteneciente a la familia Gesneriaceae. B) Flor característica de la especie. Fuente: Collazos, 2020.....13
- Ilustración 7. Representación esquemática sobre los beneficios de la interacción entre plantas y endófitos. Fuente: Khare *et al.*, 2018.15
- Ilustración 8. Ciclo de colonización de bacterias endófitas en una planta huésped. A) Movilización de endófitos en semillas; B) Reclutamiento de endófitos del suelo; C) Colonización parcial; D) Colonización en toda la planta; E) Variaciones de los endófitos según el estrés biótico y abiótico; F) Transferencia vertical de endófitos a semillas. Fuente: Kandel *et al.*, 2017.....16

Ilustración 9. Representación esquemática de la distribución bacteriana y los patrones de colonización en la endosfera de la raíz laterales dentro del xilema y el floema de una planta. Fuente: Liu <i>et al.</i> , 2017.....	17
Ilustración 10. Ciclo de vida de los actinomicetos esporulantes. Fuente: Barka <i>et al.</i> , 2016.	18
Ilustración 11. Estudios filogenéticos de 46 conjuntos de datos de genes 16S rRNA para determinar el porcentaje relativo promedio de lecturas asignadas a cada género actinobacteriano en 4 ecosistemas. Fuente: Lewin <i>et al.</i> , 2016.....	19
Ilustración 12. Clasificación de hongos endofíticos en tejidos vegetales. Fuente: Rajamanikyam <i>et al.</i> , 2017.....	20
Ilustración 13. Tipos de metabolitos que producen los hongos. Fuente: Rajamanikyam <i>et al.</i> , 2017.	21
Ilustración 14. Vías biosintéticas para la obtención de la auxina IAA a partir de triptófano. Fuente: Morffy <i>et al.</i> , 2020.	22
Ilustración 15. Proceso de organogénesis para la regeneración de plantas. Modificado de autor: Tofiño, 2017.	24
Ilustración 16. Proceso de regeneración a partir de la vía embriogénesis asexual o somática. Modificado de autor: Tofiño, 2017.	25
Ilustración 17. Proceso de morfogénesis indirecta y directa. Modificado de autor: Serrano, 2015.	26

Ilustración 18. Primer cultivo *in vitro* de *Seemannia sylvatica* a partir de hoja en medio MS suplementado las fitohormonas a diferentes concentraciones para la obtención de plántulas (BAP y ANA) a 25°C durante 16 semanas. Fuente: Collazos, 2020.....55

Ilustración 19. Segundo cultivo *in vitro* de *Seemannia sylvatica* axénicos con crecimiento a las 12 semanas a 25°C en medio MS suplementado con BAP y ANA a diferentes concentraciones para la obtención de plántulas. Fuente: Collazos, 2020.....56

Ilustración 20. Tercer cultivo *in vitro* de *Seemannia sylvatica* para la obtención de plántulas, presentando crecimiento leve a las 10 semanas a una temperatura de 25°C en medio MS suplementado con BAP y ANA en diferentes concentraciones. Fuente: Collazos, 2020.57

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Prueba del registro de acceso emitida por el Sistema Nacional para la Gestión del Patrimonio Genético y los Conocimientos Tradicionales Asociados (SISGEN).	72
Anexo 2. Preparación de medios de cultivos.....	74
Anexo 3. Preparación de las soluciones para medio MS.	78

LISTA DE ABREVIATURAS

BAP	6-Bencilaminopurina
ANA	Ácido naftalenacético
AIA	Ácido Indolacético
PBS	Tampón Fosfato Salino
TSA	Agar Trypticase de Soja
AN	Agar Nutritivo
SC	Agar Synthetic Complete
YSA	Yeast Starch Agar
MS	Medio Murashige & Skoog
ISP2	International Streptomyces Project-2 Medium
ISP4	Inorganic Salf Starch Agar Medium N° 4
R ₂ A	Reasoner's 2 ^a Agar
SNA	Agar Spezieller Nährstoffarmer
PDA	Agar Papa Dextrosa
CZ	Agar Czapek
MEA	Agar Extracto de Malta
SDA	Agar Sabouraud

RESUMEN

Las plantas y los microorganismos se encuentran entre los recursos naturales con importancia en aplicaciones biotecnológicas. Los estudios realizados en algunas especies de la familia Gesneriaceae demuestran que tienen actividades biológicas prometedoras como antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios. Por tanto, este trabajo tuvo como objetivo general aislar, caracterizar y conservar microorganismos endofíticos que interactúan con *Seemannia sylvatica* (Kunth) Hanst (Gesneriaceae) y establecimiento de cultivos celulares *in vitro*. Para el aislamiento de microorganismos endofíticos se procedió a emplear dos métodos: 1) se realizaron cortes en la hoja (lámina) eliminando los bordes y la nervadura central y 2) se maceraron 2 gramos de hojas con solución PBS, en ambos métodos se emplearon 13 medios de cultivos incubando a la misma temperatura por 7 días, finalizado el tiempo se realizó caracterización morfológica. Las cepas identificadas se conservaron por ultracongelamiento y por el método Castellani, a su vez se realizaron cultivos *in vitro* para la obtención de callos y plántulas. Se logró el aislamiento de microorganismos siendo un total de 72 cepas, correspondiendo a 34 cepas fúngicas y 38 cepas de levaduras y bacterias, fue posible realizar la descripción macroscópica a cada cepa aislada observando que las colonias presentaron morfologías totalmente diferentes, a su vez fue posible realizar la conservación a partir de los dos métodos empleados evidenciando que ambos son efectivos para la conservación a largo plazo. De igual manera se logró la obtención de plántulas a partir de organogénesis directa empleando las hormonas ANA y BAP a diferentes concentraciones, se debe resaltar que los cultivos *in vitros* obtenidos fueron sometidos a diferentes procesos de limpieza y desinfección del material vegetal evidenciando que el protocolo estandarizado en este estudio fue el más efectivo, estos cultivos presentaron crecimiento a partir de la semana 14 en condiciones ambientales controladas. El proceso de callogénesis no fue efectivo debido a que las concentraciones empleadas de las hormonas 2,4-D y BAP no fueron las acertadas y se dio la presencia de contaminación en todos los tratamientos.

Palabras claves: Gesneriaceae, *Seemannia sylvatica*, callogénesis, organogénesis.

ABSTRACT

Plants and microorganisms are among the important natural resources in biotechnological applications. Studies conducted in some species of the Gesneriaceae family show that they have promising biological activities as antioxidants, anticancer, anti-inflammatory. Therefore, this work had as general objective to isolate, characterize and conserve endophytic microorganisms that interact with *Seemannia sylvatica* (Kunth) Hanst and establishment of in vitro cell cultures. For the isolation of endophytic microorganisms, there were use two methods: 1) cuts were made in the leaf (sheet), eliminating the edges and midrib, and 2) 2 grams of leaves were macerated with PBS solution, in both methods were used 13 crop media incubating at the same temperature for 7 days, after the time, morphological characterization was performed. The identified strains were preserved by deep-freezing and by the Castellani method, at the same time in vitro cultures were performed to obtain callus and seedlings. Isolation of microorganisms was achieved, being a total of 72 strains, corresponding to 34 fungal strains and 38 strains of yeast and bacteria, it was possible to perform the macroscopic description of each isolated strain observing that the colonies presented totally different morphologies, simultaneously it was possible to do conservation with the two methods used, showing that both methods are effective for the conservation in a long-term. Likewise, it was possible to obtain seedlings from direct organogenesis using the hormones NAA and BAP at different concentrations, it should be noted that the in vitro cultures obtained were subjected to different cleaning and disinfection processes of the plant material, evidencing that the standardized protocol in this study was the most effective, these crops showed growth from week 14 under controlled environmental conditions. The callogenesis process was not effective because the concentrations of the hormones 2,4-D and BAP were not correct and the presence of contamination occurred in all the treatments.

Keywords: Gesneriaceae, *Seemannia sylvatica*, callogénesis, organogénesis.

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existe diversidad de plantas que se encuentran colonizadas por microorganismos lo que provoca una interacción entre la planta y el microorganismo de tipo simbiótica, este tipo de interacción es cercana y persistente entre huésped y hospedero; los microorganismos se pueden clasificar como patógenos latentes, epífitos y endófitos (Tadych *et al.*, 2017).

Los microorganismos endófitos son organismos que se encuentran localizados dentro del tejido de la planta de forma intracelular y/o intercelular sin ocasionar efectos negativos en su hospedero (Gouda *et al.*, 2016); son simbióticos obligados o facultativos, generalmente este grupo lo componen bacterias y hongos (Tadych *et al.*, 2017; Ek-Ramos *et al.*, 2019). Estos microorganismos influyen constantemente en la fisiología de las plantas favoreciendo el crecimiento. Suelen emplear mecanismos en su entorno para lograr una adecuada adaptación para que su subsistencia sea de forma estable, tienen la capacidad de producir compuestos bioactivos que brindan beneficios a las plantas para su crecimiento y a su vez permite que se adapten con mayor facilidad al medio ambiente (Gouda *et al.*, 2016; Dhayanithy *et al.*, 2019).

Las plantas tienen compuestos bioactivos que han sido utilizados en el campo medicinal, sin embargo, en los últimos años se ha observado que los microorganismos endófitos ofrecen compuestos a las plantas haciendo que su potencial se eleve y sean empleados para fines terapéuticos por el interés biotecnológico que brindan al producir fitohormonas como, por ejemplo, la bacteria *Burkholderia vietnamiensis* es endofítica diazotrófica tiene la capacidad de producir la hormona ácido indolacético (AIA), el hongo *Cladosporium sphaerospermum* ha demostrado la capacidad de producir en grandes cantidades GA7, GA3 y GA4 para inducir en el crecimiento vegetal; generalmente los microorganismos con características endofíticas producen hormonas como ácidos giberélicos, auxinas y citoquininas (Padhi *et al.*, 2013; Hamayun *et al.*, 2009; Xin *et al.*, 2009). El ciclo de vida que presentan se realiza dentro del hospedero sin ocasionar efectos secundarios (Nair *et al.*, 2014) permitiendo un mejoramiento en el crecimiento y desarrollo de la planta lo que los hace mutualistas y antagonistas. Pueden mejorar muchos aspectos de las plantas como, por ejemplo, brindarle tolerancias hacia diversos tipos de estrés de tipo biótico y abiótico, también le brinda resistencia a la planta hacia plagas (Nair *et al.*, 2014; Ek-Ramos *et al.*, 2019).

Los endófitos pueden llegar a colonizar en diferentes zonas de las plantas, por ejemplo, las raíces, las hojas, el fruto, las semillas, el tallo, entre otros (Tadych *et al.*, 2017). Esta población es muy variable en las especies debido a varios factores que se presentan en el hospedero como lo es la especie, su etapa de desarrollo, la condición ambiental en la que se encuentran y la densidad que se da en el inóculo (Gouda *et al.*, 2016; Nair *et al.*, 2014).

La gran mayoría de microorganismos endófitos aislados de plantas medicinales presentan actividad antimicrobiana, este tipo de actividad permite que controlar los patógenos que se encuentran presentes para lograr contrarrestar los daños que pueden provocar, este control sucede mediante la producción de compuestos bioactivos ya que actúan como una barrera de defensa. Hasta el momento se ha observado en la literatura que algunos de estos compuestos que producen las plantas son de origen flavonoides, esteroides, alcaloides, terpenoides, entre otros (Nair *et al.*, 2014; Baby *et al.*, 2011). De igual forma se ha evidenciado que este grupo de microorganismos logran presentar actividad herbicida junto con la actividad antimicrobiana como defensa (Li *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2012).

Se ha evidenciado en estudios anteriores que las bacterias Grampositivas han sido importantes para el control de las plantas tanto en su crecimiento, en las interacciones y en el control de patógeno del suelo, en el control de biorremediación, entre otras funciones (Ek-Ramos *et al.*, 2019; Francis *et al.*, 2010; Beneduzi *et al.*, 2012; Glick, 2012). Las Proteobacterias, Firmicutes y Acinetobacterias son las más frecuentes, siendo las especies de *Bacillus* y *Streptomyces* las que producen en mayor cantidad metabolitos bioactivos para el mejoramiento de las plantas actuando como compuestos anticancerígenos y antimicrobianos (Gouda *et al.*, 2016; Ek-Ramos *et al.*, 2019).

Entre las diversas bacterias endofíticas presentes en las plantas se pueden encontrar los géneros de *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Xanthomonas*, entre otros (Gouda *et al.*, 2016). Entre los hongos endofíticos se han dividido en dos grupos importantes debido a la filogenia que presentan, siendo los clavicipitaceous son aquellos que están relacionados filogenéticamente y los no clavicipitaceous son grupos polifiléticos, es decir, son aquellos que no comparten un ancestro en común (Khare *et al.*, 2018; Phadi *et al.*, 2013). Los hongos endofíticos son capaces de generar compuestos similares o iguales que produce la planta por medio de las interacciones que se presentan entre huésped-hospedero, estos metabolitos bioactivos se reconocen como sustancias

nuevas, la cual presentan diversas acciones biológicas como agentes biológicamente activos siendo de interés biotecnológico para los humanos, los animales y las plantas (Firáková *et al.*, 2007; Mesquita *et al.*, 2016). Como, por ejemplo, para la producción de algunos antibióticos y de algunos anticancerosos; del género de *Penicillium notatum* se ha llegado a extraer el compuesto penicilenoles para la producción de la penicilina, de *Taxomyces andreanae* se ha aislado el compuesto taxol para la producción del medicamento más efectivo y exitoso contra el cáncer (Gouda *et al.*, 2016; Padhi *et al.*, 2013). El objetivo de este estudio es aislar, caracterizar y conservar microorganismos endofíticos que interactúan con *Seemannia sylvatica* (Kunth) Hanst (Gesneriaceae) y establecimiento de cultivos celulares *in vitro* para dar a conocer el potencial biotecnológico que presentan estos microorganismos al interactuar con la planta.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Aislar, caracterizar y conservar microorganismos endofíticos cultivables asociados a las láminas foliares de *Seemannia sylvatica* (Kunth) Hanst. (Gesneriaceae) y establecer de cultivos celulares *in vitro*.

1.2 Objetivos específicos

- Cultivar microorganismos endofíticos asociados a las láminas foliares de *Seemannia sylvatica*.
- Describir morfológicamente y conservar los microorganismos endofíticos cultivables aislados de *Seemannia sylvatica* empleando las técnicas ultracongelamiento y método Castellani.
- Preservar la planta *in natura* bajo cultivo en invernadero y establecer condiciones *in vitro* para el desarrollo de cultivos celulares de *Seemannia sylvatica*.

2. JUSTIFICACIÓN

Durante siglos el ser humano de forma empírica hacía uso de plantas que presentaban propiedades medicinales para enfrentar y disminuir las enfermedades. A medida que pasaba el tiempo se ha observado a partir de investigaciones que las plantas medicinales tienen la capacidad de producir compuestos bioactivos en sus sistemas, la cual actúan como barreras de defensas haciendo que sea la característica principal para ser catalogada dentro del grupo de plantas medicinales, generalmente estos recursos naturales y sus derivados componen más del 50% las drogas que se emplean hoy en día (Gurib-Fakim, 2006).

Estudios anteriores han demostrado que la familia Gesneriaceae no solo presenta un gran potencial ornamental por la diversidad de flores, sino que también las componen múltiples compuestos como flavonoides, esteroides, fenólicos simples, terpenos, glucósidos fenólicos, lignanos, quinonas, xantonas, entre otros (Verdan *et al.*, 2012; Verdan *et al.*, 2013; Verdan *et al.*, 2014). Al tener diversos compuestos, varias especies de la familia Gesneriaceae han sido empleados en el transcurso del tiempo con fines medicinales como tónicos, diuréticos, contra fiebres, infecciones e inflamaciones debido a que presentan una alta actividad biológica de tipo antitumorales, antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias (Verdan *et al.*, 2012). Se ha destacado que esta familia tiene más de 3000 especies, sin embargo, solo unas pocas han sido estudiadas. Especies del género *Sinningia* spp (*S. striata*, *S. aggregata*, *S. gigantifolia*) junto al género de *Seemannia* (*S. sylvatica*) son algunas de las especies pertenecientes a la familia Gesneriaceae que no se les ha realizado estudios para determinar el tipo de asociaciones y/o interacciones que presentan con los microorganismos que las colonizan, de igual manera no se han realizado investigaciones para determinar los posibles productos bioactivos que sintetizan en sus sistemas, hasta la fecha no hay estudios a nivel químico, biológico y biotecnológico.

Los únicos reportes que se han logrado encontrar de la especie *Seemannia sylvatica* se basan principalmente en el valor ornamental que presentan las flores (Xifreda, 1996) como también se ha evidenciado estudios sobre la actual clasificación que presenta el género *Seemannia* (Weber *et al.*, 2013), haciendo que esta investigación presente un gran interés en el área biotecnológico.

Dada la importancia de investigar nuevas sustancias que presenten potencial terapéutico es requerido estudiar las plantas medicinales, ya que sus componentes permiten que se dé el

desarrollo de estas nuevas sustancias. Es por ello, que se requiere evaluar si esta planta en estudio presenta un posible potencial terapéutico, la cual es de suma importancia conocer primero las interacciones que se presentan entre huésped-hospedero, a su vez es necesario conocer si produce compuestos bioactivos, cuáles y como son los que produce para determinar si pueden ser usados como agentes biológicamente activos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Familia Gesneriaceae

Según Perret *et al.*, 2012 la familia Gesneriaceae presenta actualmente entre 150 y 160 géneros siendo 3200 especies que la componen, generalmente se encuentran en zonas tropicales y subtropicales entre el sur de México y norte de Argentina (Verdan *et al.*, 2017). Esta familia se caracteriza por ser plantas herbáceas, con forma de arbusto y rara vez en forma de árbol pequeño, las especies pertenecientes a esta familia suelen tener una gran variedad en su morfología floral la cual ha llegado a estar asociada a las adaptaciones frente a los diferentes polinizadores, actualmente se pueden encontrar en Sudamérica (ilustración 1), siendo 75 géneros y más de 1200 especies (Serrano *et al.*, 2017).

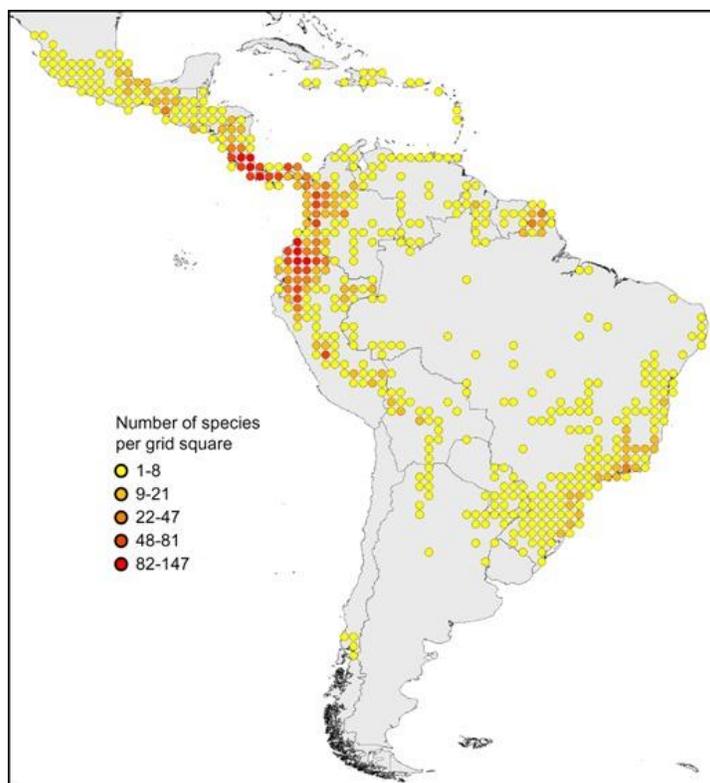


Ilustración 1. Distribución de las especies de Gesneriaceae en el nuevo mundo centrada en el norte de los Andes, América central y bosque atlántico de Brasil. Fuente: Perret *et al.*, 2012.

Fritsch (1893) y Burt (1963) presentaron una forma para clasificar la familia Gesneriaceae, siendo Fritsch quien propuso dividirla en dos grupos Gesnerioideae y Cyrtandroideae. Estos dos nuevos grupos se basan en la forma como se da su crecimiento, que es principalmente en un crecimiento basal de los cotiledones después de la germinación al igual que también en el desarrollo del endospermo de la semilla (Araujo *et al.*, 2005). Mientras que Burt 1963 se basó en sistemas de separación geográfica.

En el año 2013 se propone una nueva clasificación para Gesneriaceae teniendo como criterio estudios moleculares de la diversificación filogenética de angiospermas siendo datos importantes para la nueva clasificación (Weber *et al.*, 2013). Se reconocen tres subfamilias importantes, la cual se tuvo en cuenta para la clasificación el desarrollo de cotiledones y endospermos (ilustración 2), entre las subfamilias se encuentran (ilustración 3): Didymocarpoideae (*Cyrtandreae*, *Didymocarpeae*, *Klugieae* y *Trichosporeae*) caracterizados por producir una reducción de uno de los cotiledones y por la ausencia de endospermo. Sanangoideae (*Sanango racemosum*) es una subfamilia monogénica y Gesnerioideae (*Beslerieae*, *Coronanthereae*, *Gesnerieae*, *Napeantheae* y *Titanotricheae*) caracterizados por presentar cotiledones y endospermo en desarrollos normales (Weber *et al.*, 2013; Hinoshita *et al.*, 2018).

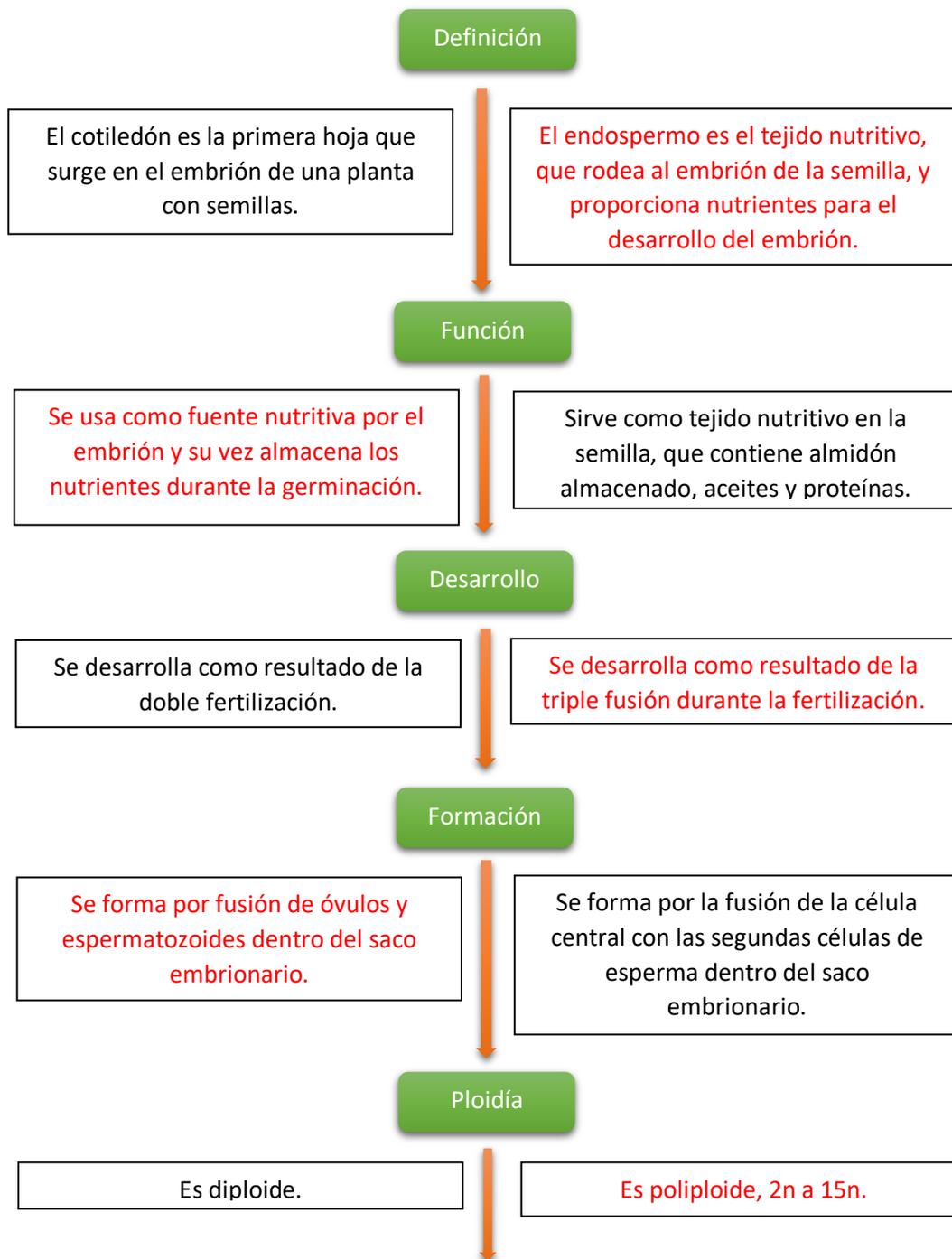


Ilustración 2. Diferencias entre cotiledones y endospermos. Modificado del autor: Panawala, 2017.

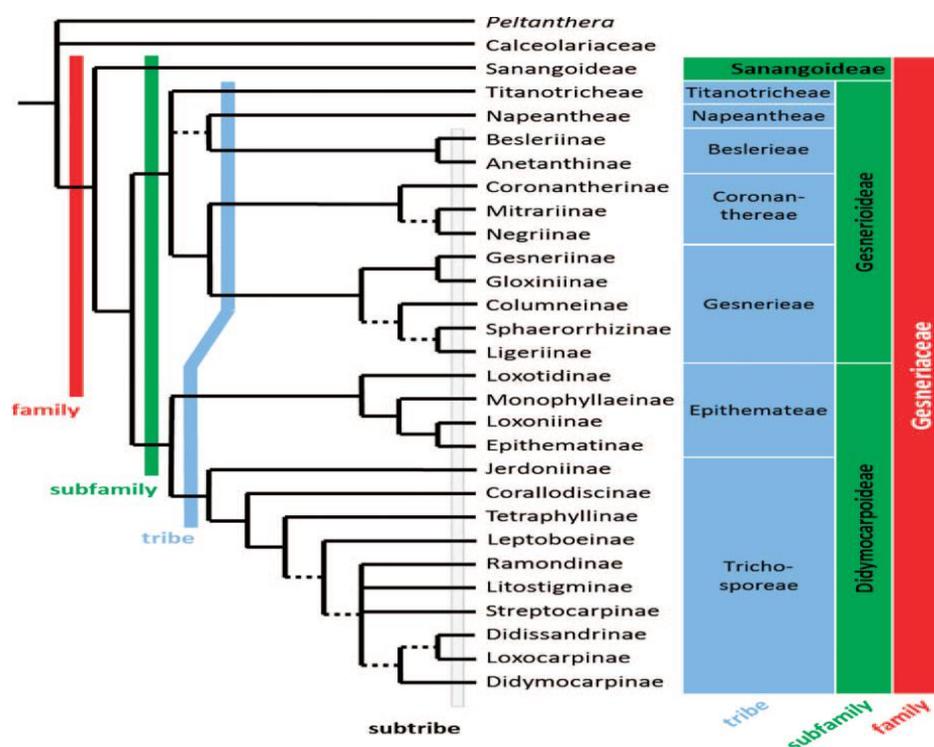


Ilustración 3. Clasificación de la familia Gesneriaceae. Fuente: Weber *et al.*, 2013.

La subfamilia Didymocarpoideae presenta una reducción de uno de los cotiledones y ausencia de endospermo, mientras que Gesnerioideae presenta cotiledones y endospermo desarrollados. En un estudio realizado en 1995 clasificaron la familia Gesneriaceae basados principalmente en sus características morfológicas siendo tres subfamilias reconocidas Gesnerioideae, Coronantheroideae y Cyrtandroideae (Burt *et al.*, 1995). La subfamilia Gesnerioideae se encuentra clasificada en subtribus: 1) Gesneriinae distribuida en el Caribe y algunas especies en el norte de América del Sur, 2) Gloxiniinae distribuida en América Central, 3) Columneinae distribuida en Norte y Centro de Sudamérica, 4) Sphaerorrhizinae, 5) Ligeriinae distribuida en Sudeste de América del Sur correspondiente a Brasil (Weber *et al.*, 2013).

3.2 Género *Seemannia*

El género *Seemannia* hace parte de la familia Gesneriaceae, anteriormente se conocían con el nombre de *Gloxinia* debido a la similitud que presentan sus características morfológicas (ilustración 4) (Burt *et al.*, 1995). Sin embargo, tiempo después por medio de un estudio molecular donde observó la relación filogenética y los límites de la tribu Gloxiniinae empleando el ADN del ribosoma nuclear (nrDNA), secuencias espaciadoras transcritas (ITS), secuencias espaciadoras

intergénicas (trnl-F) y un conjunto de datos morfológicos cladísticos (ilustración 5) (Roalson *et al.*, 2005), se determinó que cuatro especies debían ser separadas de *Gloxinia* y agruparlas en el género de *Seemannia* (*S. sylvatica*, *S. gymnostoma*, *S. purpurascens*, *S. nematanthodes*) clasificándolos como un grupo con un solo tipo de nomenclatura (Bologna *et al.*, 2019).

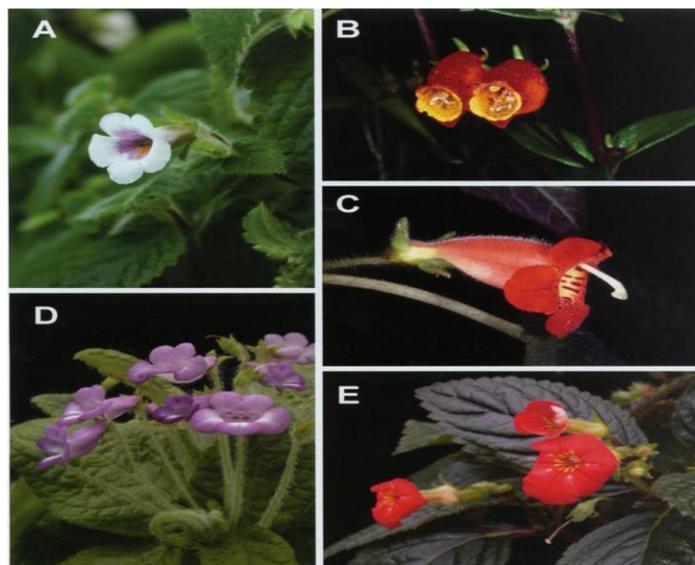


Ilustración 4. Taxones de la tribu Gloxinieae. A) *Achimeneses misera*; B) *Gloxinia sylvatica*; C) *Kolheria grandiflora*; D) *Eucodonia andrieuxi*; E) *Dlastema comiderum*. Fuente: Roalson *et al.*, 2005.

Este género se caracteriza por crecer de 25 – 30 cm de altura y entre 500 y 3000 metros de altitud sobre el nivel del mar, los ambientes sombreados y húmedos brinda condiciones favorables para su crecimiento, presenta flores axilares de colores brillantes, tiene dos especies que son endémicas (*Seemannia nematanthodes* y *Seemannia gymnostoma*). Estas se encuentran distribuidas en el noreste de Argentina, presentando flores con coloración rojo anaranjado y fucsia, respectivamente (Xifreda, 1996). Este género son de tipo geófito debido a que tienen la capacidad de transcurrir su propagación vegetal en estolones y rizomas ovoides en la temporada de floración, (antes o después de la temporada). Lo que conlleva a acumular almidón como reservas del rizoma para ser usado en el próximo ciclo de propagación vegetal (Bologna *et al.*, 2019).

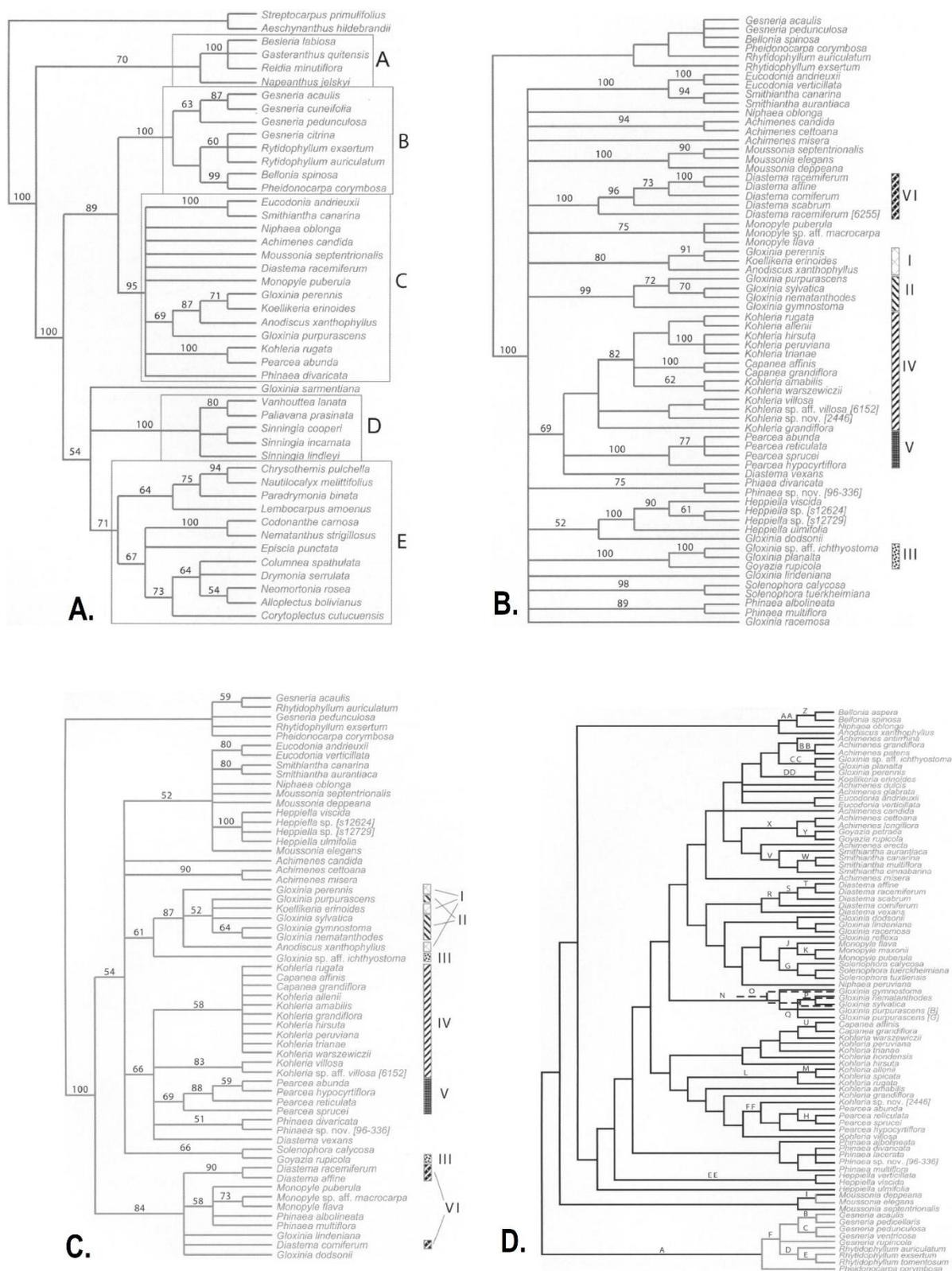


Ilustración 5. Estudios moleculares de la tribu Gloxinieae. A) nrDNA; B) ITS; C) trnL-F; D) morfología cladística. Modificado de autor: Roalson *et al.*, 2005.

3.2.1 *Seemannia sylvatica*

Son plantas comúnmente nativas de Brasil, Perú y Bolivia, presentan tallos rectos que forman rizomas, presentan flores con un alto valor ornamental de color naranja con hojas estriadas y alargadas (ilustración 6). Anteriormente *Seemannia sylvatica* fue clasificada como *Gloxinia sylvatica*, sin embargo, tiempo después fue clasificada nuevamente dentro del género de *Seemannia* (Pêgo *et al.*, 2013; Camargo *et al.*, 2011).

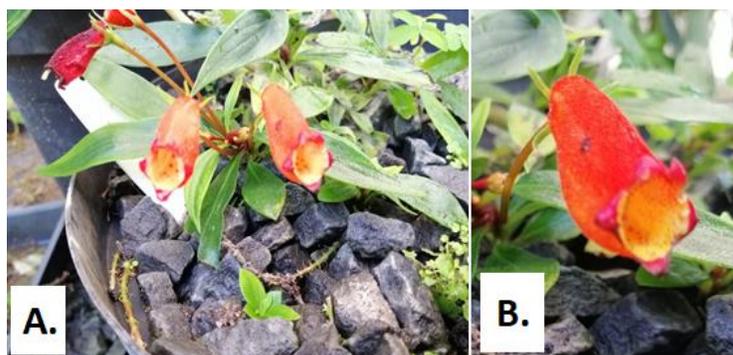


Ilustración 6. Planta cultivada en el campo experimental del Instituto de Biología de la Universidad Estatal de Campinas. A) Planta *Seemannia sylvatica* espécimen perteneciente a la familia Gesneriaceae. B) Flor característica de la especie. Fuente: Collazos, 2020.

Seemannia sylvatica presenta ornitofilia conocido también como el síndrome de polinización ornitófilico, donde las flores son polinizadas por parte de aves, especialmente de la familia *Trochilidae* (colibríes) (Wiehler, 1983). Las flores de *Seemannia sylvatica* presentan hercogamia lo que se designa a la separación espacial del estigma y la antena de la flor, generando la reducción de la autopolinización y la autogamia (Webb *et al.*, 1986). Por tanto, la hercogamia se puede definir como un mecanismo para promover el cruzamiento entre diferentes plantas, sin embargo, en combinación con protandria la cual consiste en la expresión del sexo masculino antes del sexo femenino de la planta, brinda posibilidades de que ocurra una autogamia, es decir, una autopolinización espontánea generando la incidencia de autofecundación y desperdicio de gametos por la cantidad de polen presente se reduzca como una estrategia. Debido a que esta especie es autocompatible y es capaz de desarrollar frutos con el polen de la misma flor por la capacidad de presentar autogamia (Cairampoma *et al.*, 2012).

3.3 Microorganismos endofíticos

Los microorganismos endofíticos presentan una amplia capacidad para interactuar con diferentes plantas, esto se debe a que presentan una interacción muy compleja y precisa (Rajamanikyam *et al.*, 2017; Firáková *et al.*, 2007). Generalmente suelen ser de tipo simbiótica, sin embargo, se ha observado interacciones de tipo antagónico y mutualista. Las interacciones que se observan entre planta-endófito se da por las restricciones filogenéticas relacionado con la virulencia y su origen genético (ancestro), la interacción entre la diversidad microbiana y los factores de tipo biótico y abióticos, de igual manera la geografía y la producción de compuestos bioactivos es un factor importante (ilustración 7) (Rajamanikyam *et al.*, 2017; Khare *et al.*, 2018). Las asociaciones que se presentan entre la comunidad microbiana y la planta favorecen al hospedero de diversas formas como es promoviendo el crecimiento vegetal debido a que el huésped influye constantemente en la fisiología de la planta, de igual manera ayuda en la tolerancia y resistencia frente a estrés biótico y abióticos, ayuda en la producción de metabolitos secundarios iguales o similares a la planta (Firáková *et al.*, 2007; Mesquita *et al.*, 2016).

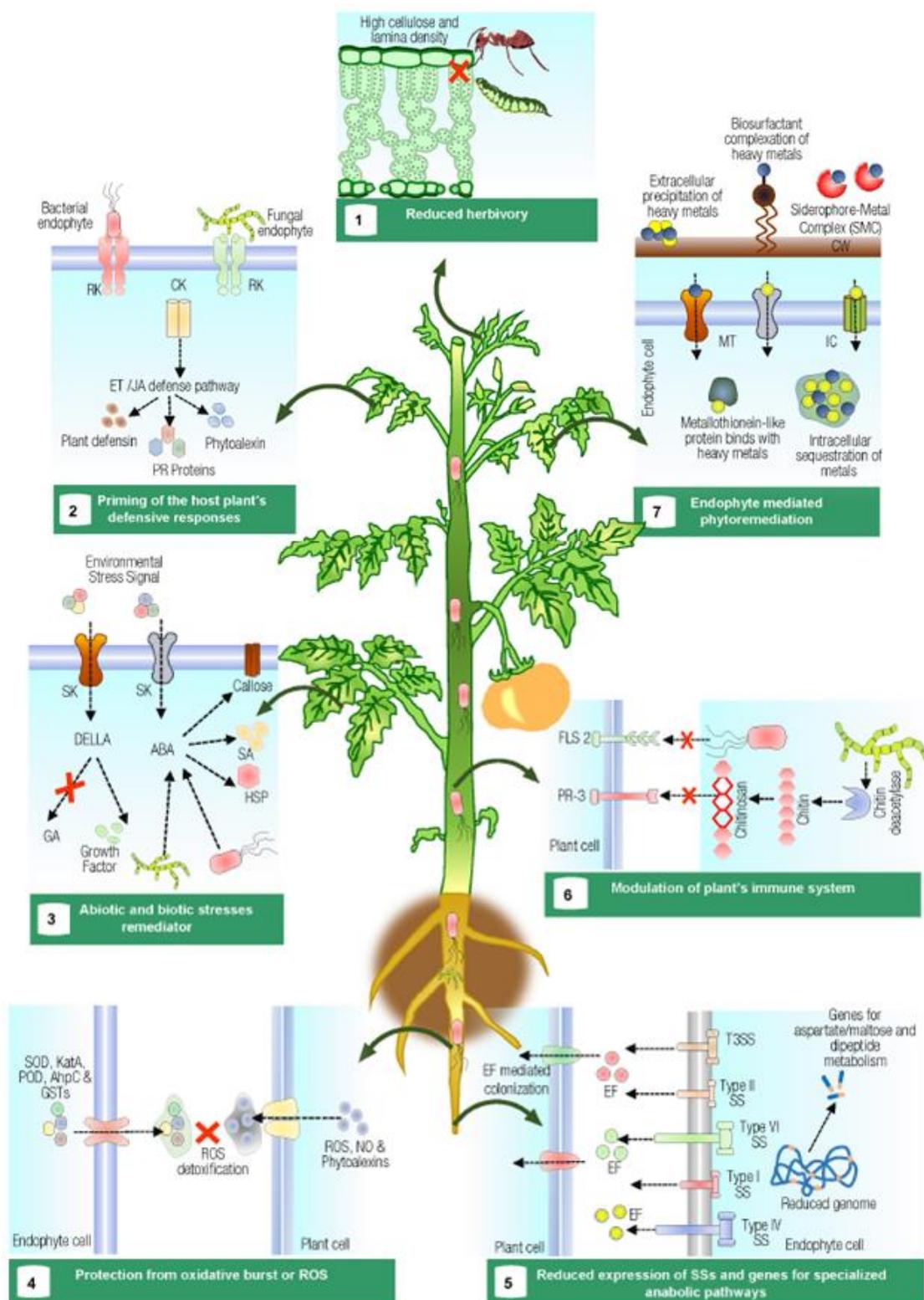


Ilustración 7. Representación esquemática sobre los beneficios de la interacción entre plantas y endófitos. Fuente: Khare *et al.*, 2018.

3.3.1 Bacterias endofíticas

Las bacterias endofíticas se caracterizan por tener la capacidad de colonizar los tejidos internos del hospedero mediante mecanismos de entradas como, por ejemplo, a través de la raíz, en porciones aéreas como el tallo, cotiledones y las flores, de igual manera pueden ingresar al hospedero a través de radículas germinales, estomas, daños foliares y raíces secundarias para localizarse en sitios totalmente diferentes dentro del hospedero (ilustraciones 8 y 9) (Etmnani *et al.*, 2018; Kandel *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017).

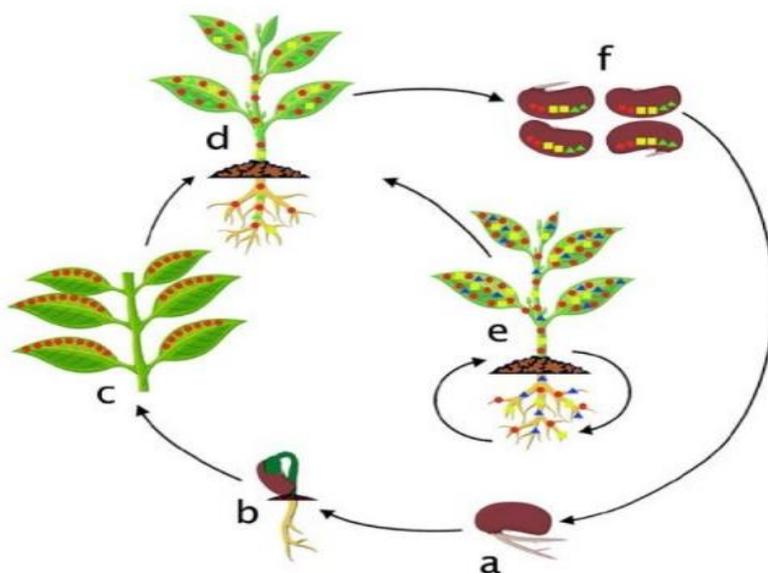


Ilustración 8. Ciclo de colonización de bacterias endofíticas en una planta huésped. A) Movilización de endófitos en semillas; B) Reclutamiento de endófitos del suelo; C) Colonización parcial; D) Colonización en toda la planta; E) Variaciones de los endófitos según el estrés biótico y abiótico; F) Transferencia vertical de endófitos a semillas. Fuente: Kandel *et al.*, 2017.

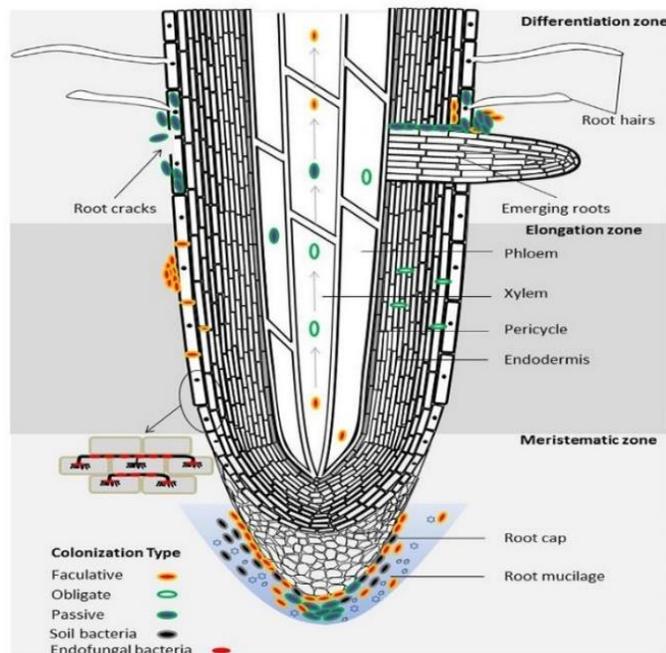


Ilustración 9. Representación esquemática de la distribución bacteriana y los patrones de colonización en la endosfera de la raíz laterales dentro del xilema y el floema de una planta. Fuente: Liu *et al.*, 2017.

Sin embargo, al colonizar el hospedero presentan una interacción simbiótica, es decir, que las bacterias endofíticas no producen daño alguno en el hospedero. Por tanto, estos microorganismos ofrecen varios beneficios al hospedero promoviendo el crecimiento, mejora la capacidad para solubilizar el fosfato, el nitrógeno y facilita la fitorremediación de metales pesados e hidrocarburos, ejemplos claros que componen este grupo son las Actinobacterias, Firmicutes y Proteobacterias (Etminani *et al.*, 2018; Gouda *et al.*, 2016; Ek-Ramos *et al.*, 2019). Tienen la capacidad de controlar el estrés biótico y abiótico, mejora la tolerancia al estrés en ausencia de fertilizantes inorgánicos y pesticidas (Frank *et al.*, 2017). Estos microorganismos pueden llegar a residir en los espacios intercelulares de las células haciendo que su diversidad aumente en un gran número y a su vez beneficiando al hospedero. Actualmente se han reportado estudios donde se evidencia un alto número de aislamiento de bacterias endofíticas de tipo Gram positivas, pero también de Gram negativas en bajo porcentaje, siendo los géneros Alfa, Beta y Gammaproteobacterias, así como Firmicutes y Actinobacterias (Etminani *et al.*, 2018; Zinniel *et al.*, 2002).

3.3.1.1 Actinobacterias

Son bacterias filamentosas Gram positivas, presentan un alto contenido de citosina y guanina en su ADN genómico, se producen por las esporas asexuales (ilustración 10), también son conocidas por producir metabolitos secundarios como productos bioactivos, son unicelulares, filamentosos y ayudan en la descomposición de biomasa vegetal (Tischler *et al.*, 2019; Barka *et al.*, 2016; Lewin *et al.*, 2016).

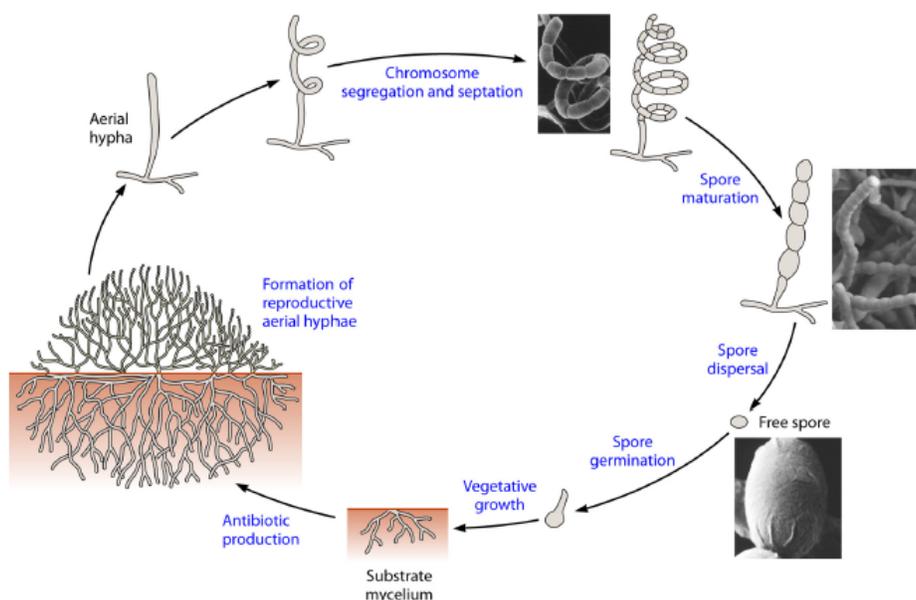


Ilustración 10. Ciclo de vida de los actinomicetos esporulantes. Fuente: Barka *et al.*, 2016.

Anteriormente eran clasificadas dentro del grupo de los hongos por presentar hifas aéreas que se asemejan a la morfología de los hongos, sin embargo, se observó que las actinobacterias presentan similitudes en la membrana celular, en la composición de lípidos y en el peptidoglicano de las bacterias Gram positivas lo que generó ser clasificadas dentro de la clase Actinobacteria del orden Actinomycetales y dominio Bacteria (Pelaz, 2014; Evangelista *et al.*, 2017). El estudio filogenético a partir del gen 16S rRNA ha permitido evidenciar la evolución que este grupo presenta, la cual determinaron el porcentaje de presencia en 4 diferentes ecosistemas (ilustración 11) (Lewis *et al.*, 2016). Las actinobacterias presentan estructuras (esporangios) que permite identificar y posteriormente clasificarlas fácilmente dentro del dominio bacteria y a su vez que permite diferenciarlas de los hongos; son consideradas como un potencial alto en el área de la biotecnología farmacológica por la capacidad de producir más de 10000 metabolitos secundarios activos

(Fernández, 2005; Das *et al.*, 2018). El género de *Streptomyces* es el grupo más grande que componen las actinobacterias, durante años se ha logrado evidenciar la producción, purificación y caracterización de antifúngicos, antibacterianos, antitumorales y compuestos antioxidantes a partir de *Streptomyces*, siendo poco más de 7,600 compuestos bioactivos producidos en este género como, por ejemplo: la geosmina, estreptomina, tetraciclina, entre otros. Las especies de los géneros *Actinoplanes*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Streptoverticillium*, *Streptosporangium* y *Saccharopolyspora* también pertenecen al grupo de actinobacterias (Evangelista *et al.*, 2017; Das *et al.*, 2018; Hidrin *et al.*, 2001).

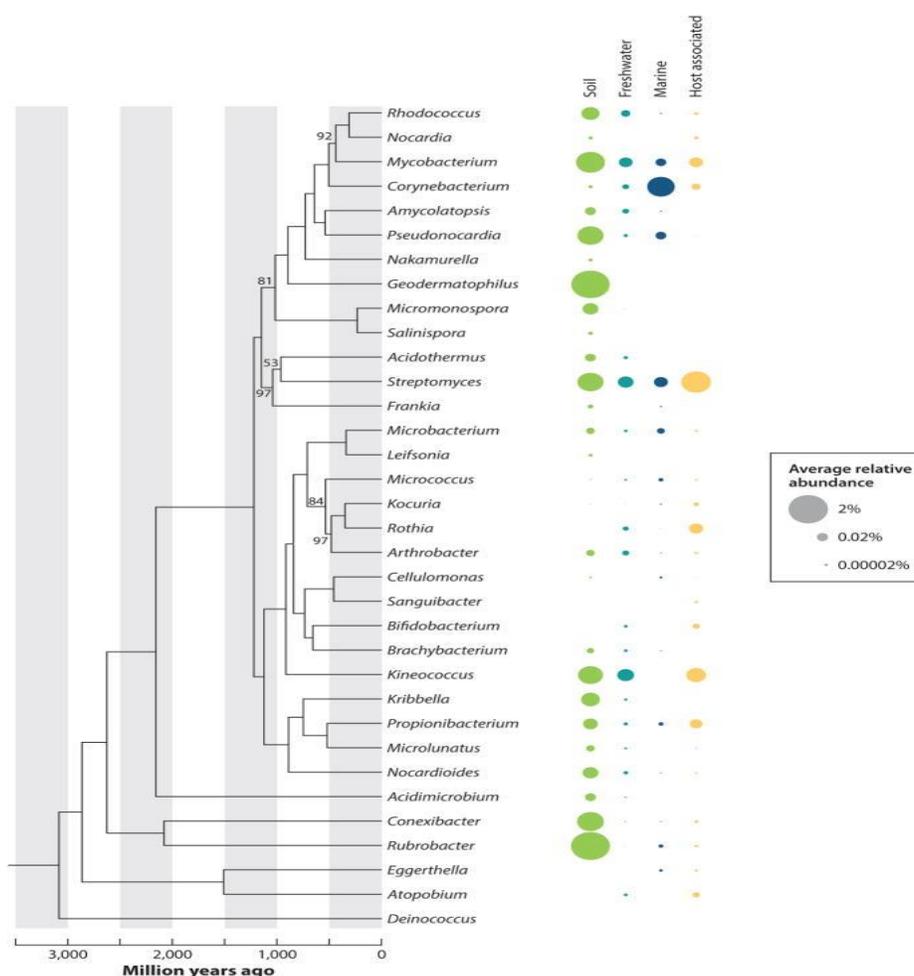


Ilustración 11. Estudios filogenéticos de 46 conjuntos de datos de genes 16S rRNA para determinar el porcentaje relativo promedio de lecturas asignadas a cada género actinobacteriano en 4 ecosistemas. Fuente: Lewin *et al.*, 2016.

3.3.2 Hongos endofíticos

Los hongos endofíticos permanecen en estado asintomático en el huésped, también conocidos como no *clavicipitaceus*, presentan una interacción simbiótico y mutualista. Sin embargo, pueden llegar a ser patógenos oportunistas o saprófitos agresivos provocando daños irreparables en el hospedero. Colonizan los tejidos internos (ilustración 12), pueden ser usados como una alternativa para el mejoramiento de cultivos agrícolas (Rajamanikyam *et al.*, 2017).

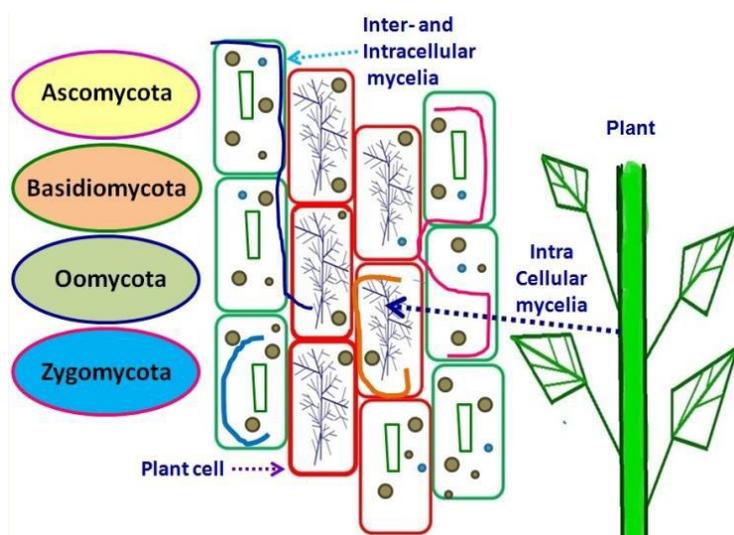


Ilustración 12. Clasificación de hongos endofíticos en tejidos vegetales. Fuente: Rajamanikyam *et al.*, 2017.

Estos microorganismos producen metabolitos que actúan como un agente biológico activo ayudando en la resistencia del huésped frente a estrés abiótico y biótico, mejoran la respuesta inmune contra invasores patógenos, pueden producir compuestos propios iguales o similares de la planta, ayudan en la degradación biológica para el reciclaje de nutrientes debido a la producción de enzimas (Rajamanikyam *et al.*, 2017). Los hongos endofíticos aislados de plantas que presentan propiedades para uso medicinales tienen mayor capacidad para la producción de metabolitos fuertes de tipo bactericida, fungicida y citotóxico (ilustración 13); tienen una gran demanda en el área farmacéutico gracias a sus propiedades antivirales, antimicrobianas y anticancerígenas (Sudha *et al.*, 2016). Se ha encontrado en la literatura que más de 100 familias de plantas se encuentran colonizadas por hongos endofitos, se han identificado son Ascomicetos, Basidiomicetos y

Zigomicetos, algunos ejemplos son los géneros de *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, entre otros (Tadych *et al.*, 2017; Padhi *et al.*, 2013).

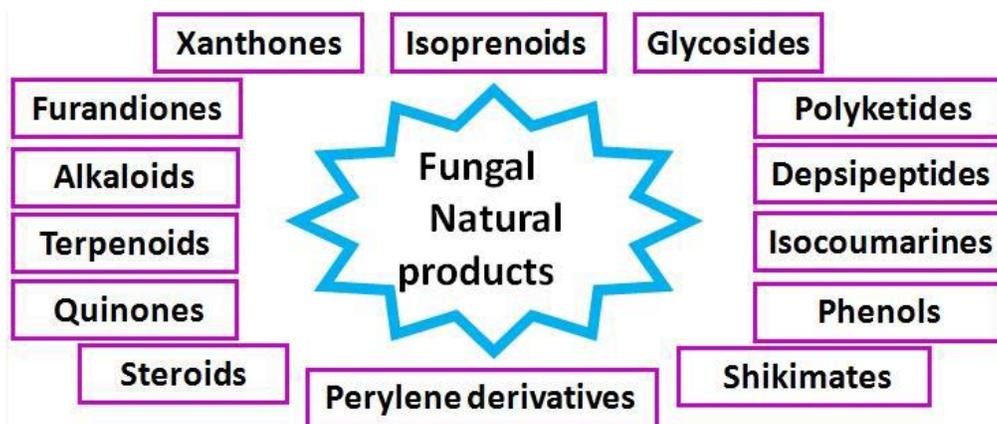


Ilustración 13. Tipos de metabolitos que producen los hongos. Fuente: Rajamanikyam *et al.*, 2017.

3.3.3 Levaduras endófitas

La asociación que se presenta entre la planta hospedera y las levaduras endófitas es de carácter mutualista, la cual la planta brinda las condiciones adecuadas para el crecimiento correcto de las levaduras fitófagas (Khunnamwong *et al.*, 2018). Este grupo de microorganismos tienen una función muy importante que consiste en la producción de auxinas como son el ácido índol-3-acético (IAA) y el ácido indol-3-piruvico (IPYA), este proceso ocurre mediante el empleo de la vía de biosíntesis de triptófano (ilustración 14) (Limtong *et al.*, 2014; Morffy *et al.*, 2020).

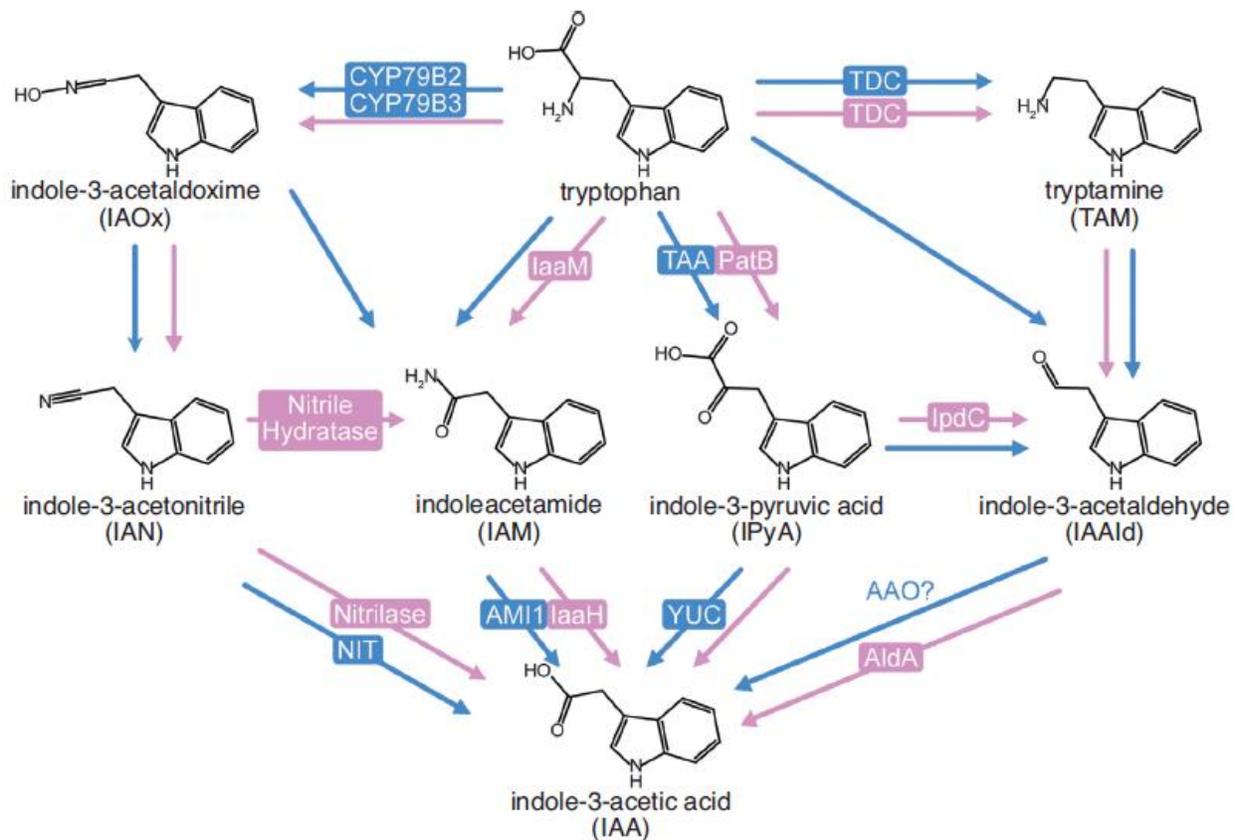


Ilustración 14. Vías biosintéticas para la obtención de la auxina IAA a partir de triptófano. Fuente: Morffy *et al.*, 2020.

En el grupo de las levaduras endófitas se encuentran las de tipo ascomicetos y basidiomicetos, por ejemplo, especies del género *Candida* y *Williopsis saturnus*, se debe resaltar que las levaduras endófitas se caracterizan como hongos unicelulares que realizan su reproducción de forma asexual mediante gemación, de igual manera las plantas que se encuentran sueltas y con una alta concentración de azúcares de tipo simple brinda las condiciones adecuadas para el crecimiento de este grupo de microorganismos (Isaeva *et al.*, 2010). Se ha observado que las levaduras endófitas presentan la capacidad de excretar los metabolitos secundarios que se producen en el hospedero mejorando su resistencia ante condiciones que son desfavorables como, por ejemplo, ayudando a que el hospedero se proteja ante fitopatógenos (Khunnamwong *et al.*, 2018; Limtong *et al.*, 2014).

3.4 Cultivos de tejido vegetal *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales y de células emplea medios de cultivos que proporcionen nutrientes en condiciones controladas de forma aséptica y libre de cualquier tipo de contaminantes como, por ejemplo, microorganismos para el desarrollo del crecimiento de tejidos, células y órganos vegetales (Moscatiello *et al.*, 2013; Espinosa-Leal *et al.*, 2018). Este tipo de cultivos *in vitro* se basan del principio de totipotencia este concepto hace referencia a la capacidad que tiene una sola célula para expresarse en la división celular mitótica alterando su metabolismo y su crecimiento para regenerar nuevas réplicas de la planta, es decir, que es la capacidad que tiene la célula para regenerar el fenotipo del organismo principal en su totalidad y poder diferenciarlo al mismo tiempo (Sánchez-Calvo *et al.*, 2014). Por lo general las divisiones celulares que ocurren en una planta se da en los meristemas, su funcionamiento puede estar activo o suprimido según los estándares de diferenciación mediante mecanismos de controles ambientales o genéticos (Arana, 2003).

La propagación *in vitro* también es conocida como micropropagación, es una técnica que permite propagar numerosas especies de plantas que se encuentran expuestas a enfermedades ya sea por la presencia de plagas o problemas a nivel de su genoma, entre otros factores; haciendo que se facilite su conservación para futuros ensayos o para fines económicos (Espinosa-Leal *et al.*, 2018). La Propagación *in vitro* tiene como objetivo principal la multiplicación de plantas por medio de diferentes vías:

1. **Organogénesis:** sucede un conjunto de cambios en la cual permite la obtención de diferentes órganos sin pasar por el estado embrionario, este proceso inicia primero en la formación de meristemas para dar con el proceso de regeneración (ilustración 15) (Tofiño, 2017).

Regeneración de plantas vía organogénesis (por formación de órganos como tallos, raíces, hojas)

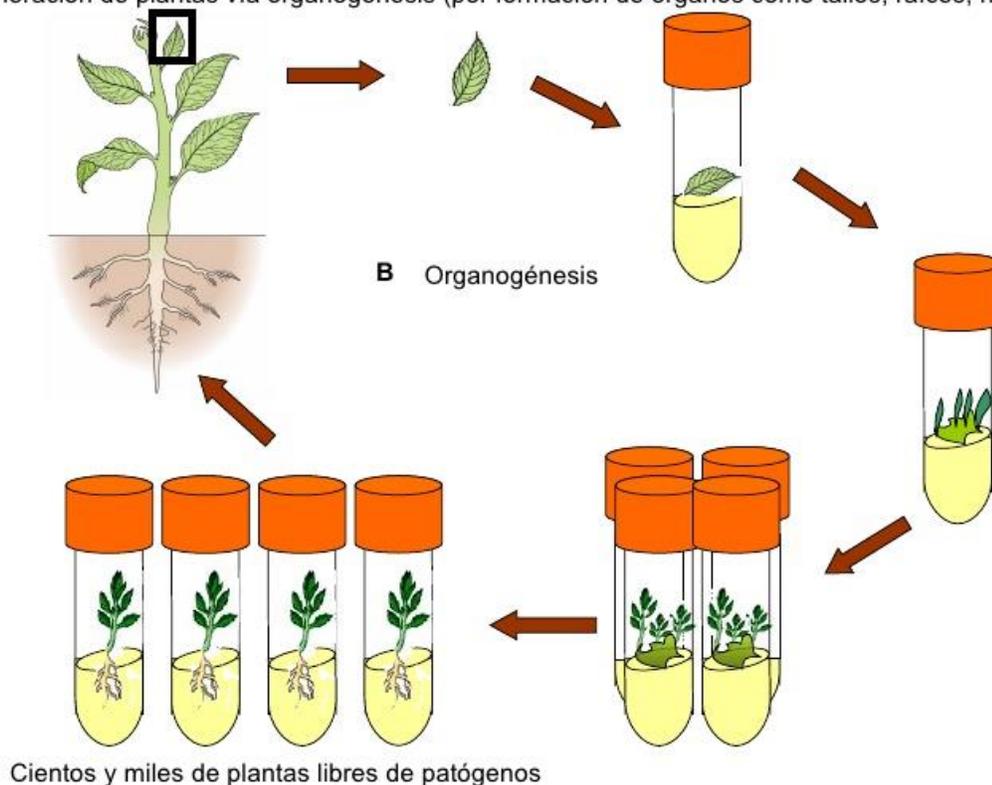


Ilustración 15. Proceso de organogénesis para la regeneración de plantas. Modificado del autor: Tofiño, 2017.

2. **Embriogénesis somática:** consiste en la formación de un embrión sin la necesidad de realizar una fusión de gametos, sino que sucede a partir de una célula (ilustración 16) (Castellanos *et al.*, 2006). Estos procesos embriogénicos pueden llegar a ser afectados por diversos factores generando dificultad al momento de realizar cultivos *in vitro* a partir de material vegetal, algunos de estos factores son el genotipo de la planta, las hormonas empleadas, las condiciones del cultivo, los componentes de los medios de cultivos empleados, y el estado fisiológico del explante a usar (Tofiño, 2017).

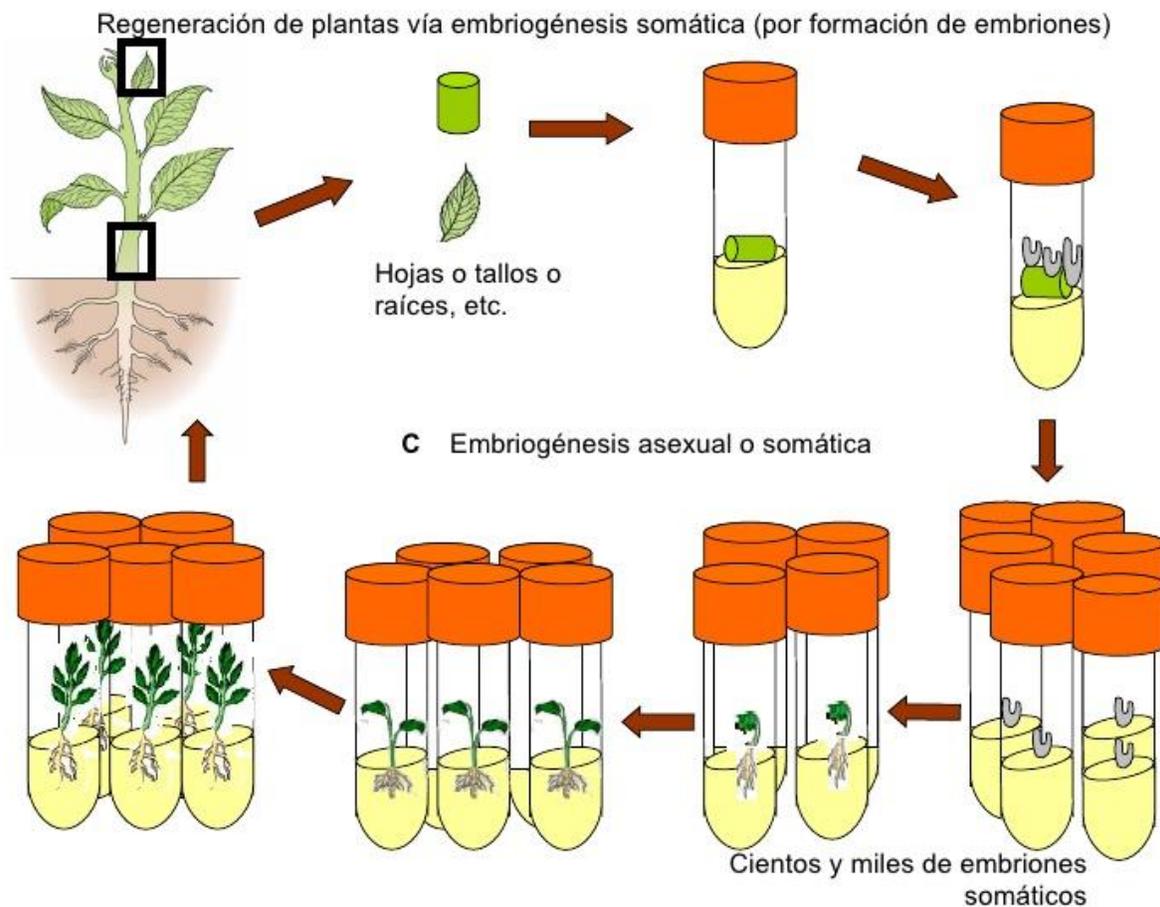


Ilustración 16. Proceso de regeneración a partir de la vía embriogénesis asexual o somática. Modificado de autor: Tofiño, 2017.

Los procesos anteriormente mencionados pueden ocurrir por dos vías que son la morfogénesis indirecta da lugar a la formación de brotes pasando a través de una fase intermedia donde se da la formación de callos a partir de células meristemáticas, a este proceso de formación de callos se le denomina callogénesis (ilustración 17a), mientras que la organogénesis directa no se da esa fase intermedia para la propagación de explantes (ilustración 17b) (Martín *et al.*, 2015; Serrano, 2015).

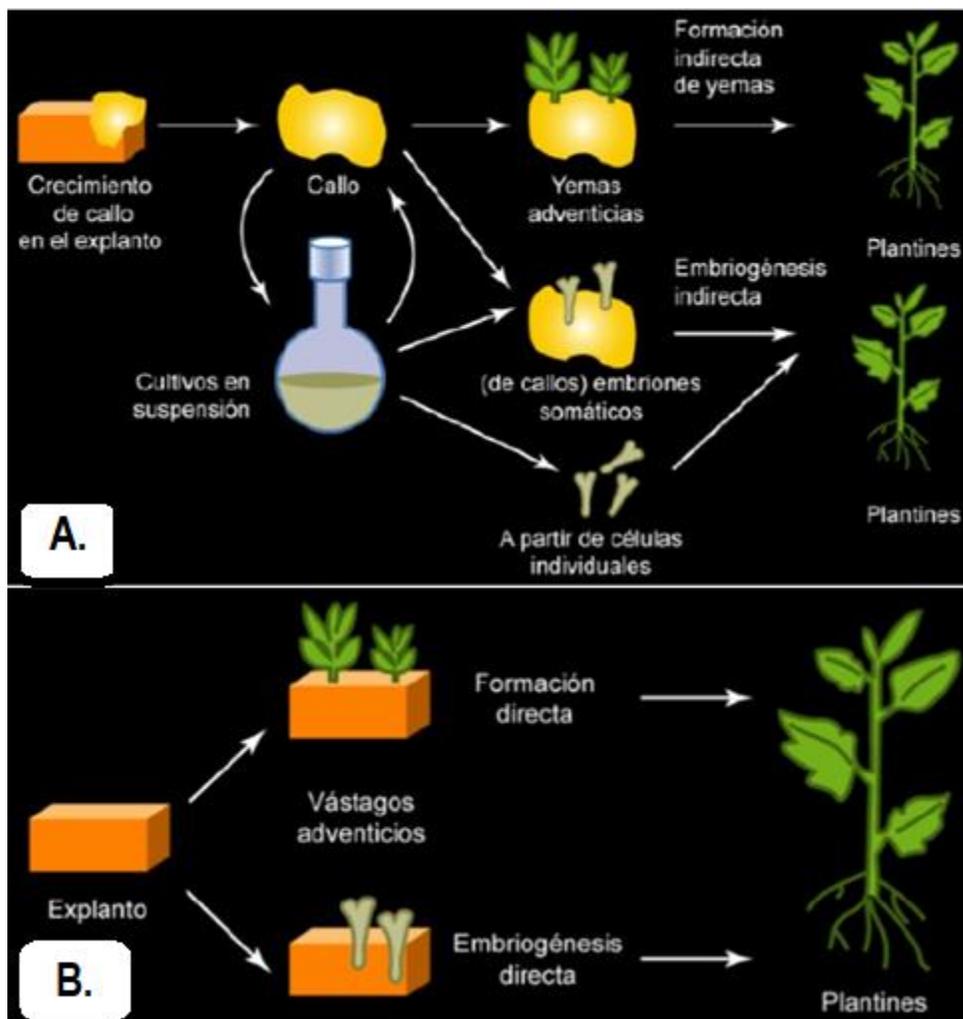


Ilustración 17. Proceso de morfogénesis indirecta y directa. Modificado de autor: Serrano, 2015.

La ventaja que presenta esta técnica se basa en que puede ser usada en especies que no tienen la capacidad de mantener su viabilidad a largo plazo, conserva la biodiversidad de las especies, es fácil de realizar, es rápida y eficiente, permite mejorar el genoma de una planta para liberarla de diferentes enfermedades a causa de factores bióticos y abióticos, como también es útil para la mejora de la producción de metabolitos secundarios y la multiplicación de las plantas a una gran escala (Moscatiello *et al.*, 2013; Sánchez-Calvo *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2008).

La propagación de plantas presenta una serie de etapas para que suceda con mayor efectividad (Paiva *et al.*, 2001):

- 1. Selección y preparación de la planta madre:** en esta etapa se observa que la planta madre no presente enfermedades por hongos y virus, debe estar en condiciones fuera de estrés y sanas en su totalidad para la obtención de explantes de buena calidad.
- 2. Establecimiento del cultivo de forma aséptica:** consiste principalmente en controlar la selección, el aislamiento y la desinfección de los explantes para establecer cultivos viables y axénicos.
- 3. Multiplicación:** tiene como objetivo aumentar y mantener la cantidad de brotes para multiplicaciones sucesivas y luego ser llevados a la siguiente etapa de producción. Es importante tener en cuenta el tipo de vía regenerativa que se va a emplear, siendo recomendable evitar la formación de callos como una estrategia para la reducción de riesgos en la variación somaclonal, esta variación consiste en un conjunto de cambios genotípicos en la planta regenerada a nivel *in vitro*. Los medios de cultivos empleados deben contener reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas, ácido giberélico la cual juegan un papel muy importante para aumentar el porcentaje de la multiplicación en los explantes.
- 4. Enraizamiento y aclimatización:** el enraizamiento puede suceder en condiciones *in vitro* o *ex vitro*, haciendo uso de sustratos y reguladores de crecimiento para la estimulación de la rizogénesis cuando se hace en condiciones *in vitro*. La aclimatización y el enraizamiento suceden simultáneamente y rara vez se da la formación de callos, en la etapa de aclimatización los explantes son muy sensibles haciendo que sufran diversos cambios durante la adaptación.

3.5 Métodos de conservación

Los microorganismos representan un papel muy importante para el funcionamiento y el mantenimiento de los ecosistemas, siendo una gran fuente de recursos para diversas áreas de la ciencia, como es en el desarrollo la agricultura, la industria, la medicina y la biotecnológica; es por esto que se desarrollaron técnicas que permite la preservación de las comunidades microbianas (Bermeo, 2017; Barragán *et al.*, 2009).

Estas técnicas tienen como objetivo asegurar y mantener la viabilidad, la estabilidad y la pureza de los cultivos que se quieren conservar por largos periodos de tiempo con la finalidad de que no se generen cambios a nivel genotípico y fenotípico (Barragán *et al.*, 2009; Bermeo, 2017; Homolka, 2014), es decir, que se mantengan como son originalmente y no se altere sus características, esto se logró deteniendo el metabolismo del microorganismo permitiendo su preservación y conservación hasta en un 90% (Barragán *et al.*, 2009). Por tal razón, es muy importante tener en cuenta varios factores para la selección de un método de conservación que consiste en identificar las características del microorganismo, este debe estar libre de contaminantes y ser de fácil manejo (Bermeo, 2017).

3.5.1. Congelación

El método de congelación es una las herramientas para conservar y preservar microorganismos a largo plazo permitiendo mantener la viabilidad, estabilidad y pureza; es una de las más recomendadas para aquellas cepas que no pueden ser conservadas a partir de la técnica de liofilización (Barragán *et al.*, 2009; Homolka, 2014). Este método consiste en suspender las células para ser conservadas a temperaturas inferiores a 0°C, se conoce 3 clasificaciones para este método según la temperatura que se emplea, las cuales son la congelación ordinaria (-5° a -20°C), congelación fría también conocida como ultracongelamiento (-20° a -80°C) y la congelación con nitrógeno líquido (-150° a -196°C), para implementar esta técnica se debe evitar la formación de cristales de hielo, ya que genera daños en el metabolismo del microorganismo haciendo que pierda su funcionalidad y viabilidad, por lo cual se requiere hacer uso de crioprotectores que tienen como función prevenir este suceso, algunos de los crioprotectores que se emplea son el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), leche descremada, aceite mineral estéril, entre otros (Bermeo, 2017;

Hernández *et al.*, 2014). Esta técnica presenta ciertas desventajas como son el alto costo de los equipos, el suministro de nitrógeno líquido, la temperatura, el transporte y envío de las cepas (Bermeo, 2017).

3.5.2 Método Castellani

Esta técnica permite la conservación de microorganismos tales como levaduras, hongos y algunas bacterias entre 2 y 5 años manteniendo su viabilidad, en este método se emplea el agua destilada estéril en el caso de bacterias y levaduras se suspende con un asa estéril, mientras que en el caso de los hongos se toman bloques del cultivo fúngico con el agar para ser conservados a una temperatura de 5°C (Bermeo, 2017; Weng *et al.*, 2011; Gato, 2010). Las ventajas que presenta consisten en disminuir el pleomorfismo en algunas de las especies fúngicas, es de bajo costo, sencillo, simple, seguro y rápido, mantiene la viabilidad, pureza y estabilidad fenotípica y genotípica. Se encontró en la literatura estudios que determinan que este método de conservación permite conservar 300 cepas de hongos filamentosos, 346 cepas de levaduras y 17 cepas de actinomicetos por periodos de hasta por 20 años (Panizo *et al.*, 2005; Sarmiento *et al.*, 2013). En otro estudio realizado por Baraskarathavan *et al.*, (2009) lograron la conservación de 4 especies de *Botryosphaeria* durante un periodo de 6 meses empleando agua estéril, aceite mineral, glicerol al 20% observando una viabilidad entre 81 y 100% de las cepas.

4. METODOLOGÍA

4.1 Selección de material vegetal

El material vegetal de *Seemannia sylvatica* (Kunth) Hanst, planta *in natura*, se recolectó del invernadero agrícola del Departamento de Biología Vegetal en el distrito de Barão Geraldo del municipio de Campinas - São Paulo (S 22°49'10", NO 319°, O 47°41'4" a una temperatura de 28°C). Esta especie es mantenida y cultivada en un invernadero agrícola en el Departamento de Biología Vegetal, Instituto de Biología - Universidad Estatal de Campinas, por el grupo de investigación del Prof. Dr. Marcos José Salvador para ser utilizado en este estudio (Anexo I). La identificación botánica fue realizada por el especialista Dr. Alain Chautems (Conservatorio y Jardín Botánico de Ginebra, Ginebra, Suiza) y se depositó en el herbario UEC-UNICAMP (MJS0016).

4.2 Aislamiento de microorganismos endofíticos

A partir de *Seemannia sylvatica* se seleccionaron hojas bajo ciertas condiciones como son la ausencia de enfermedades, deben ser hojas jóvenes de color verde brillantes. Para realizar el proceso de limpieza y desinfección del material vegetal se utiliza el protocolo estandarizado por Costa *et al.*, (2012) sometiendo a un proceso de limpieza con agua corriente y detergente neutro para la eliminación de cualquier tipo de contaminantes sólidos que se encuentran presentes en las hojas. Posteriormente se realizó una desinfección con etanol al 70% por 1 minuto, hipoclorito de sodio al 2.5% por 4 minutos, etanol al 70% por 30 segundos, agua destilada estéril por 2 minutos. Una vez que se finalizó la etapa de desinfección de las hojas, se procedió a confirmar el protocolo de desinfección mediante controles, para ello se tomaron alícuotas del agua destilada estéril que se usó en el enjuague final en los siguientes medios de cultivos: TSA, AN, SC, YSA, ISP2, ISP4, R₂A, SNA, PDA, CZ, SDA, MEA, MS a 25°C durante 7 días (Anexo II y III).

Se realizaron dos procedimientos para el aislamiento de microorganismos endofíticos según el protocolo de Costa *et al.*, (2012) con algunas modificaciones como fue el reemplazo de la solución NaCl por solución PBS en el macerado, las siembras se realizaron en los medios de cultivos mencionados anteriormente:

- 1) Se realizaron cortes en las láminas foliares (hojas) retirando los bordes y la nervadura para la estimulación del crecimiento de los microorganismos endófitos presentes.
- 2) Macerado de las láminas foliares en un mortero estéril con solución PBS, el extracto del tejido obtenido se incubó a 25°C por 7 días.

Las colonias que presentaron diferentes morfologías en ambos métodos de aislamiento fueron seleccionadas y purificadas en Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) a 25°C por 7 días. Se realizó descripción morfológica y posteriormente se conservaron mediante 2 técnicas diferentes (ultracongelamiento a -80°C y método Castellani).

4.3 Caracterización morfológica de las cepas cultivables

La descripción de las cepas cultivables aislados de la planta en estudio se realizó mediante caracterización micro y macroscópica. Para la descripción macroscópicas de bacterias, levaduras y hongos endofíticos se aislaron las colonias en todos los medios de cultivos empleados durante el aislamiento y fueron determinadas: forma, color, textura, tamaño, pigmentación del medio. Para la descripción microscópica de bacterias y levadura se realizó tinción de Gram. En el caso de los hongos se empleó la técnica de microcultivos y el método de la cinta transparente haciendo uso de un microscopio óptico marca Leica a un aumento de 40X para hongos y 100X para bacterias.

4.4 Conservación de cepas

Las cepas aisladas y caracterizadas fueron conservados empleando dos métodos diferentes que son método de ultracongelamiento y el método Castellani con la finalidad de preservar y mantener la viabilidad, pureza y estabilidad de cada una de las cepas a largo plazo.

4.4.1 Método Castellani

A partir de cultivos monospóricos en diferentes medios de cultivos con 5 días de incubación, se realizaron cortes de aproximadamente 4 a 6 mm² con una lámina de bisturí estéril a los medios que contenían las cepas fúngicas axénicas, mientras las cepas bacterianas y levaduras se realizó una suspensión empleando un asa microbiológica estéril, se procedió a transferir el material en tubos criogénicos que contenían 1mL de agua destilada estéril y se almacenaron a 5°C (Bermeo, 2017).

4.4.2 Método Ultracongelamiento a -80°C

Se realizó el mismo procedimiento que el método Castellani para el corte y transferencia de los cubos de agar y la suspensión celular a tubos criogénicos, con la excepción de que los tubos contenían glicerol al 20% y se realizó un primer enfriamiento a -20°C y posteriormente se llevaron a -80°C (Bermeo, 2017).

4.5 Obtención de cultivos *in vitro*

4.5.1 Organogénesis directa

Para la obtención de plántulas empleando la técnica de organogénesis directa se usaron explantes de *Seemannia sylvatica* planta *in natura*, para ello se recolectaron hojas de la especie en cajas de Petri grandes, se procedió a realizar un primer lavado de las hojas con agua corriente, seguido de un segundo lavado con 100mL agua destilada con detergente neutro por 10 minutos y se desinfectaron con 200mL de solución de hipoclorito de sodio al 1,5% v/v durante 15 minutos.

Pasado el tiempo, se sumergieron en 100mL de etanol al 70% v/v durante 1 minuto, finalmente se realizó tres lavados con agua destilada estéril. Una vez finalizado el protocolo de limpieza y desinfección, se procedió a realizar el diseño experimental para la obtención de plántulas (tabla 1), para ello se realizaron cortes de 0.5cm² en los explantes retirando los bordes y nervadura central y se inocularon en tubos de ensayos con medios de cultivo MS (Murashige & Scoog, 1962) ajustando el pH a 6.0 con solución de hidróxido de sodio 1M, se adicionaron concentraciones diferentes de fitoreguladores en combinación de una auxina (ácido naftalenacético de 0.1 a 0.3mg/L) y una citoquinina (6-bencilaminopurina de 1.0 a 3.0mg/L) con un total de 16 tratamientos K1 (control) y K2 a K16 (combinaciones de fitoreguladores), a todos los tratamientos se le realizó 5 réplicas. Se incubó a 25°C por 20 días en medio MS suplementado con los fitoreguladores, se hizo monitoreo cada dos días a todos los cultivos.

Tabla 1. Diseño experimental para la obtención de plántulas de *Seemannia sylvatica* en medio MS en combinación de hormonas fitoreguladoras empleando diferentes concentraciones.

BAP (mg/L)	ANA (mg/L)			
	0,0	0,1	0,2	0,3
0,0	0,0 x 0,0 (K1)	0,0 x 0,1 (K2)	0,0 x 0,2 (K3)	0,0 x 0,3 (K4)
1,0	1,0 x 0,0 (K5)	1,0 x 0,1 (K6)	1,0 x 0,2 (K7)	1,0 x 0,3 (K8)
2,0	2,0 x 0,0 (K9)	2,0 x 0,1 (K10)	2,0 x 0,2 (K11)	2,0 x 0,3 (K12)
3,0	3,0 x 0,0 (K13)	3,0 x 0,1 (K14)	3,0 x 0,2 (K15)	3,0 x 0,3 (K16)

4.5.2 Callogénesis

Para la obtención de células indiferenciadas (callos), se realizó el mismo protocolo estandarizado en organogénesis directa, con la excepción de las hormonas usadas. En este protocolo se hizo uso de la combinación entre la auxina 2,4-Diclorofenoxiacético (0,3 a 0,9mg/L) y la citoquinina 6-bencilaminopurina (0,3 a 0,9mg/L) (tabla 2) (Almeida *et al.*, 1999).

Tabla 2. Diseño experimental para la obtención de callos de *Seemannia sylvatica* en medio MS en combinación de hormonas fitoregulatoras empleando diferentes concentraciones.

BAP (mg/L)	2,4-D (mg/L)			
	0,0	0,3	0,6	0,9
0,0	0,0 x 0,0 (D1)	0,0 x 0,3 (D2)	0,0 x 0,6 (D3)	0,0 x 0,9 (D4)
0,3	0,3 x 0,0 (D5)	0,3 x 0,3 (D6)	0,3 x 0,6 (D7)	0,3 x 0,9 (D8)
0,6	0,6 x 0,0 (D9)	0,6 x 0,3 (D10)	0,6 x 0,6 (D11)	0,6 x 0,9 (D12)
0,9	0,9 x 0,0 (D13)	0,9 x 0,3 (D14)	0,9 x 0,6 (D15)	0,9 x 0,9 (D16)

6. RESULTADOS

6.1 Aislamientos de microorganismos endofíticos cultivables

En las diferentes técnicas empleadas para el aislamiento de microorganismos endofíticos, se evidenció mayor crecimiento microbiano a partir del aislamiento por corte de hoja, siendo 58 las cepas aisladas de *Seemannia sylvatica* en los diferentes medios de cultivos, a comparación del protocolo de macerado con solución PBS se obtuvieron 14 cepas, lo que generó una totalidad de 72 cepas aisladas (34 fúngicas, 38 levaduras y bacterianas). Al realizar el método 1 (corte de hoja) se identificó mayor crecimiento microbiano a comparación del método 2 (macerado de hoja); debido a que en el proceso del macerado se requiere ejercer fuerza para el triturado de las láminas foliares provocando rupturas en su estructura celular, siendo un factor clave para posibles contaminaciones (tabla 4).

Los controles realizados a partir del agua destilada estéril del último enjuague empleado durante el proceso de desinfección de las hojas no se obtuvo crecimiento alguno en todos los medios de cultivos, indicando que el proceso de limpieza y desinfección de las hojas recolectadas fue eficiente (tabla 4).

Tabla 4. Total de cepas aisladas a partir de *Seemannia sylvatica* empleando diferentes técnicas de aislamiento.

Método empleado	Tipo de microorganismo endofítico		N° cepas aisladas
	Hongos	Levaduras y bacterias	
Control	0	0	0
Corte de hoja	33	25	58
Macerado con solución PBS	1	13	14
TOTAL	34	38	72

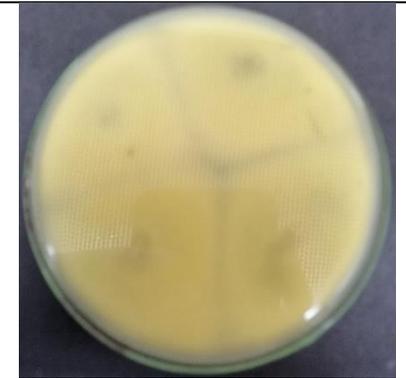
6.2 Descripción morfológica de las cepas aisladas

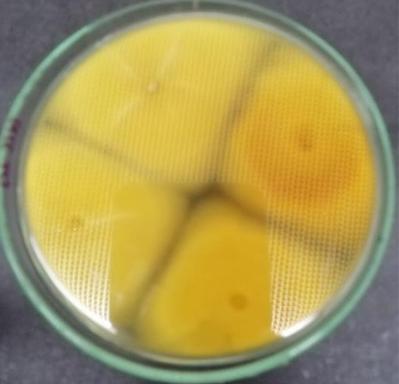
A continuación, se puede evidenciar el aislamiento de diferentes microorganismos endofíticos mediante la técnica corte de hoja:

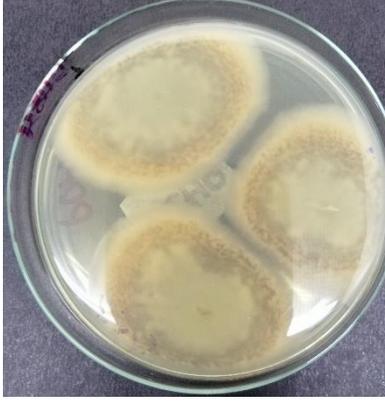
Los aislamientos realizados a partir de los cultivos *in vitros* se logró obtener 9 cepas de levaduras y bacterias (KCL1 – KCL9), la cual presentaron características similares en el aspecto (cremosas), su coloración y tamaño variaron. La cepa KCL9 fue la única en presentar una pigmentación de color negro en todo el medio de cultivo, mientras que las demás cepas no presentaron pigmentación. Igualmente se obtuvo 22 cepas fúngicas, todas las cepas presentaron morfologías totalmente diferentes, la cual varía su tamaño, la coloración, aspecto (tabla 5). Las cepas KCH3 y KC18 presentan ciertas similitudes en su morfología, al igual que sucede con las cepas KCH16 con KCH17, KCH13 con KCH14; la única cepa fúngica que presentó pigmentación en el medio de cultivo fue la KCH10.

Durante el proceso de un segundo aislamiento dio como resultado las mismas cepas obtenidas en el primer aislamiento, siendo la cepa fúngica KCH2 nuevamente la de mayor crecimiento; con excepción de que se obtuvo 3 cepas nuevas clasificadas como: KCL7 presentando características de coloración fucsia, tamaño grande y aspecto rugoso, esta cepa creció solamente en medio MS superando el crecimiento de las cepas KCL5, KCL4 y KCL2 del primer aislamiento; KCL8 y KCT9 son las únicas cepas con capacidad de presentar pigmentación en todo el medio de cultivo (KCL8 de coloración amarillo pardo y KCL9 de coloración negra).

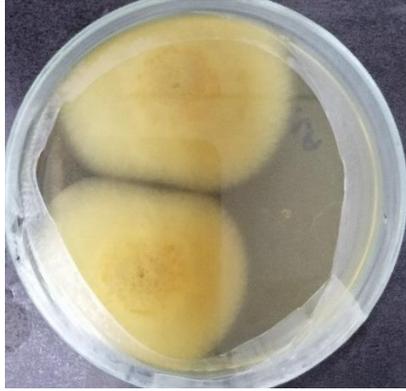
Tabla 5. Descripción macroscópica de los hongos aisladas de los cultivos *in vitro* en medio SDA.

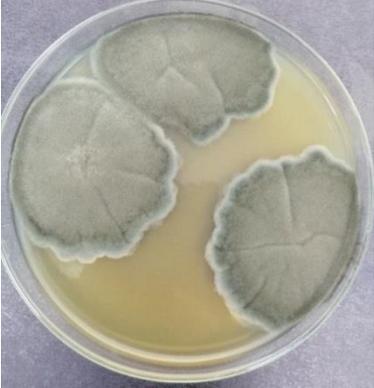
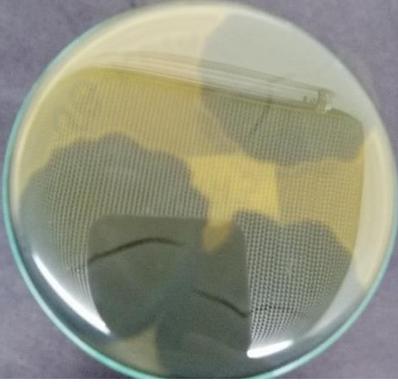
N°	Código	Descripción Macroscópica		
		Características	Anverso	Reverso
1	KCH1	Filamentoso, color rosa palo con negro en el anverso, color amarillo ámbar en el reverso, tamaño grande		
2	KCH2	Filamentoso, color blanco en el anverso, color blanco opaco en el reverso, tamaño grande		
3	KCH3	Filamentoso, color verde con halo blanco en el anverso, color negro en el reverso, tamaño grande		

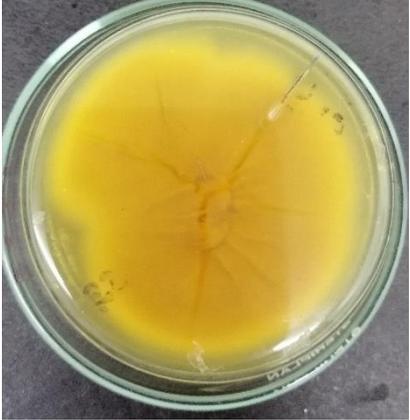
4	KCH4	Filamentoso, color blanco en el anverso, color amarillo ámbar en el reverso, tamaño grande		
5	KCH5	Algodonoso, color blanco grisáceo con halos traslucidos en el anverso, color café ámbar en el reverso, tamaño grande		
6	KCH6	Algodonoso, color verde con blanco en el anverso, color negro azulado en el reverso, tamaño grande		

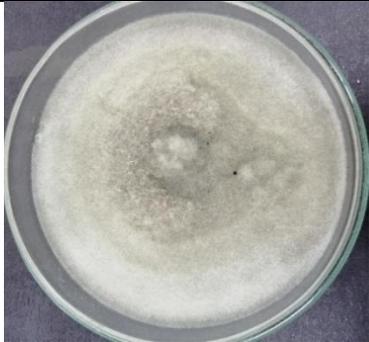
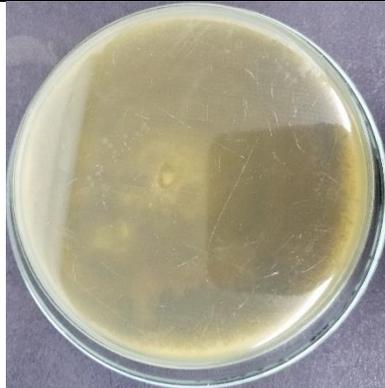
7	KCH7	Filamentoso, color blanco en el anverso, color ámbar en el reverso, tamaño grande		
8	KCH8	Algodonoso, color blanco con verde en el anverso, color ámbar en el reverso, tamaño grande		
9	KCH9	Algodonoso, color blanco grisáceo con halos opacos en el anverso, color café verdoso en el reverso, tamaño grande		

10	KCH10	Filamentoso, color blanco en el anverso, color rojo ladrillo en el reverso, produce pigmentación en el medio, tamaño grande		
11	KCH11	Filamentoso, color negro en el centro con verde, color blanco alrededor y halos opacos en el anverso y en el reverso, tamaño grande		
12	KCH12	Algodonoso, color blanco en el anverso y blanco opaco en el reverso, tamaño grande		

13	KCH13	Polvoriento, color negro grisáceo con halos opacos en el anverso, color gris con blanco opaco en el reverso, tamaño grande		
14	KCH14	Polvoriento, color verde azulado con halos blancos opacos en el anverso y reverso, tamaño mediano		
15	KCH15	Filamentoso, color blanco con halos opacos en el anverso, color blanco opaco con halos en el reverso, tamaño grande		

16	KCH16	Filamentoso, color gris con blanco alrededor en el anverso, color café grisáceo en el reverso, tamaño grande		
17	KCH17	Algodonoso, color gris con blanco en el anverso, color ámbar en el reverso, tamaño grande		
18	KCH18	Polvoriento, color verde con halo blanco en el anverso, color negro con halo blanco en el reverso, tamaño grande		

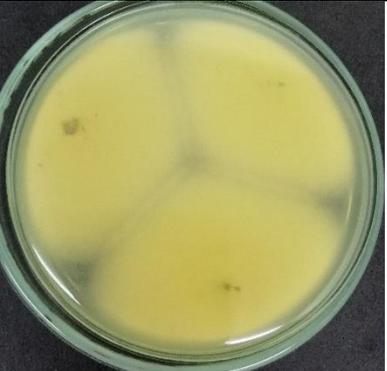
19	KCH19	Filamentoso, color naranja con negro y blanco alrededor con halo blanco traslucido en el anverso, color ámbar con halo blanco en el reverso, tamaño grande		
20	KCH20	Filamentoso, color café claro con amarillo pálido alrededor y halos blanco en el anverso, color amarillo ámbar y halo en el reverso, tamaño grande		
21	KCH21	Rugoso, color verde claro en el anverso, color verde oscuro en reverso, tamaño mediano		

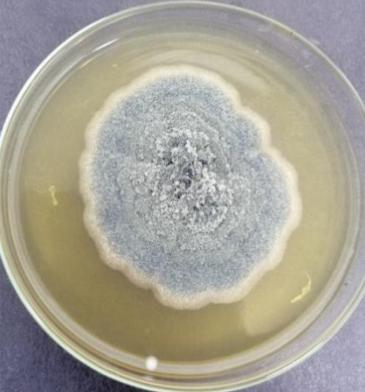
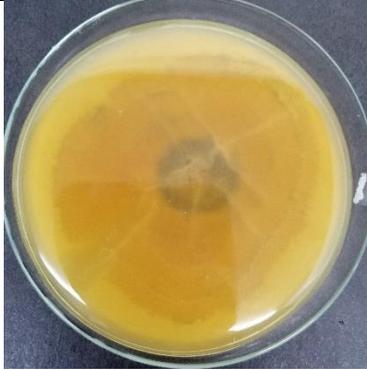
22	KCH22	Algodonoso, color grisáceo en el anverso, color café oscuro en el reverso, tamaño grande		
----	-------	--	---	---

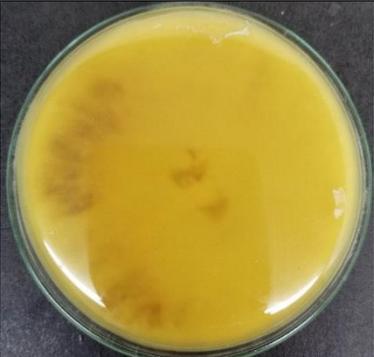
Los aislamientos realizados en los diferentes medios de cultivos (ISP2, AN, SDA, PDA, YSA) fueron purificados en medio SDA (tabla 6), se observó que la cepa KCHM5 presenta similitudes en su morfología con las cepas KCH3 y KCH18.

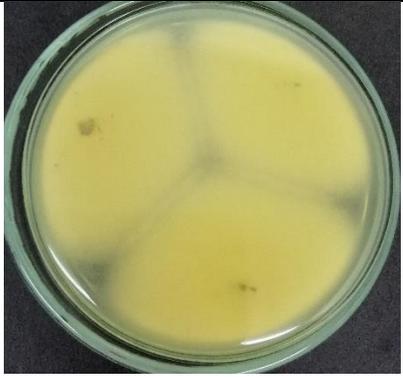
Tabla 6. Descripción macroscópica de los hongos aislados a partir del método corte de hoja en medio de cultivo SDA.

N°	Código	Descripción Macroscópica		
		Características	Anverso	Reverso
1	KCMH1	Algodonoso, color verde oliva en el anverso, color negro con halo blanco en el reverso, tamaño grande, aislado del medio ISP2		

2	KCMH2	Algodonoso, color blanco con verde en el anverso, color ámbar en el reverso, tamaño grande, aislado del medio AN		
3	KCMH3	Algodonoso, color gris en el centro y blanco alrededor en el anverso, color ámbar en el reverso, tamaño grande, aislado del medio AN		
4	KCMH4	Filamentoso, color naranja en el centro con blanco alrededor y halo opaco, color ámbar con blanco opaco en el reverso, tamaño grande, aislado del medio PDA		

5	KCMH5	Polvoriento, color verde grisáceo con halo blanco opaco en el anverso, color negro con halo blanco opaco en el reverso, tamaño grande, aislado del medio PDA		
6	KCMH6	Filamentoso, color azul verdoso con halo opaco en el anverso, color negro con halo blanco opaco en el reverso, tamaño grande, aislado del medio PDA		
7	KCMH7	Filamentoso, color gris en el centro con naranja y blanco alrededor en el anverso, color ámbar en el reverso, tamaño		

		grande, aislado del medio PDA		
8	KCMH8	Algodonoso, color blanco con café claro en el anverso, color amarillo ámbar en el reverso, tamaño grande, aislado del medio SDA		
9	KCMH9	Polvoriento, color verde claro con halos blanco en el anverso, color amarillo ámbar en el reverso, tamaño grande, aislado del medio YSA		
10	KCMH10	Rugoso, color blanco opaco con halo traslucido en el anverso, color ámbar con halo traslucido en el reverso, tamaño grande, aislado del medio YSA		

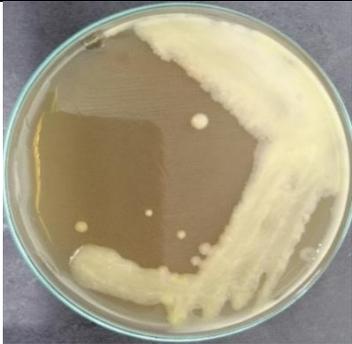
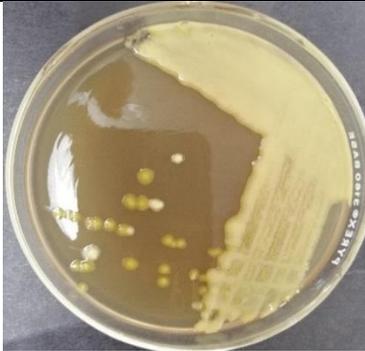
11	KCMH11	Filamentoso, color blanco en el anverso, color blanco opaco en el reverso, tamaño grande, aislado del medio AN		
----	--------	--	--	---

Se logró obtener 16 cepas de levaduras y bacterias (KCML1 – KCML16) a partir del método corte de hoja, la cual la mayoría presentaron características similares en el aspecto (cremosas), su coloración y tamaño variaron (tabla 7).

Tabla 7. Descripción macroscópica de las levaduras y bacterias aisladas en 9 diferentes medios de cultivos (ISP2, ISP4, AN, SDA, PDA, R₂A, CZ, MEA, TSA) y purificadas en medio SDA a partir de corte de hoja.

N°	Código	Medio de cultivo aislado	Descripción Macroscópica	
1	KCML1	ISP4	Cremosa, amarilla, blanda, pequeña	

2	KCML2	AN	Rugosa, blanco opaco, mucoide, grande	
3	KCML3	AN	Rugosa, blanco opaco, dura, mediana	
4	KCML4	SDA	Cremosa, blanco, blanda, pequeña	Sin registro fotográfico, cepa contaminada
5	KCML5	PDA	Cremosa, naranja, blanda, pequeña	Sin registro fotográfico, cepa contaminada
6	KCML6	CZ	Cremosa, blanco traslucido, blanda, mediana	Sin registro fotográfico, cepa contaminada
7	KCML7	CZ	Cremosa, blanca, blanda, mediana	

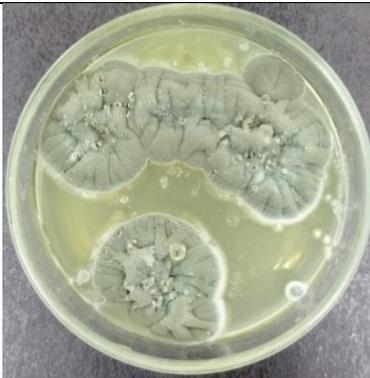
8	KCML8	R ₂ A	Cremosa, amarillo opaco, blanda, grande	
9	KCML9	ISP2	Rugosa, amarillo fuerte, mucoide, pequeña	
10	KCML10	R ₂ A	Rugosa, blanco opaco, dura, pequeña	
11	KCML11	MEA	Rugosa, amarilla, mucoide, pequeña	

12	KCML12	TSA	Cremosa, blanco opaco, blanda, grande	
13	KCML13	TSA	Cremosa, amarillo traslucido, blanda, pequeña	
14	KCML14	ISP4	Cremosa, amarillo traslucido, blanda, mediana	
15	KCML15	AN	Cremosa, blanco opaco, blanda, grande	

16	KCML16	AN	Cremosa, amarilla traslúcida, blanda, grande	
----	--------	----	---	---

Se logró el aislamiento de una sola cepa fúngica (tabla 8) y 13 cepas de levaduras y bacterias a partir del método de macerado con solución PBS, siendo menor el número de aislamiento a comparación del método de corte de hoja, todas las cepas presentaron morfologías diferentes.

Tabla 8. Descripción macroscópica del hongo aislado en medio de cultivo SC.

N°	Código	Características	Descripción Macroscópica	
			Anverso	Reverso
1	KCMBH1	Rugoso y polvoriento, color verde con halos blancos opacos en el anverso y ámbar con halos opacos en el reverso, tamaño mediano, aislado del medio SC		

Las 38 cepas restantes aisladas no fue posible realizar ensayos que permitiera identificar si corresponden a levaduras o a bacterias. Sin embargo, se observó que las cepas KCL5, KCL4 y KCL2 se lograron aislar en los diferentes medios de cultivos empleados (TSA, SC, AN, R₂A, YSA, ISP2, IPS4, MS), siendo las únicas en obtenerse en los dos métodos de aislamientos a comparación de las otras cepas.

Varias de las cepas que se lograron aislar presentaron ciertas similitudes en su morfología lo que puede deducir que posiblemente sea la misma especie o probablemente pertenezcan al mismo

género. A las cepas no fue posible realizarles descripción microscópica para poder asignar con certeza la clasificación taxonómica de cada una, provocando como consecuencia que este proyecto no se pudiera finalizar en su totalidad. Logrando solamente la descripción macroscópica y conservación de las cepas, sin embargo, a algunas de las cepas no fue posible realizar la evidencia fotográfica debido a la presencia de contaminación causados por factores externos.

6.3 Obtención de plántulas *in vitro* de *Seemannia sylvatica*

Se realizó tres cultivos *in vitros* de *Seemannia sylvatica* a partir de tres protocolos de limpieza y desinfección del material vegetal, observando que el último protocolo estandarizado empleado al realizar el tercer cultivo *in vitro* fue más eficiente que los otros.

Al momento de realizar el primer cultivo *in vitro* el protocolo empleado no fue efectivo, debido a que al momento de realizar el proceso de desinfección de las hojas con 1 mL de Tween 20 con 100 mL de agua destilada estéril en agitación por 10 minutos provocó daños en las estructuras de las hojas generando quemaduras en un tiempo inferior de 3 minutos. A su vez el uso de hipoclorito por 20 minutos terminó de provocar daños irreparables en las hojas, esto generó una mala limpieza y desinfección, haciendo mayor la presencia de contaminación; esto se corroboró con el control de aislamiento (análisis del agua destilada), debido a que estos primeros controles obtenidos del primer aislamiento se dio la presencia de microorganismos, razón por la cual los microorganismos aislados de los cultivos *in vitro* se pueden catalogar como posibles contaminantes. De los tubos empleados para la regeneración *in vitro* de la planta solamente 1 de los 16 tratamientos fue posible mantenerlo axénico y el único en demostrar crecimiento de la planta *in vitro* de aproximadamente 3 cm entre las 12 y 16 semanas (ilustración 18). Mientras los cultivos empleados en callogénesis no fue posible obtener ningún resultado positivo, debido a la presencia de crecimiento microbiano en todos los medios de cultivos usados.



Ilustración 18. Primer cultivo *in vitro* de *Seemannia sylvatica* a partir de hoja en medio MS suplementado con fitohormonas a diferentes concentraciones para la obtención de plántulas (BAP y ANA) a 25°C durante 16 semanas. Fuente: Collazos, 2020.

Del segundo cultivo *in vitro* realizado solamente se logró mantener axénico entre 6 tubos de 80, en la cual a las 12 semanas empezó a mostrar crecimiento para la formación de plántula *in vitro*. Los cultivos empleados para calogénesis nuevamente no fue posible obtener resultados favorables, presentaron crecimiento microbiano. En este segundo cultivo *in vitro* se realizó una modificación el proceso de limpieza y desinfección de las hojas, en la cual el tiempo de exposición en el hipoclorito pasando de 20 minutos a 10 minutos, al igual que se reemplazó el Tween 20 en agitación por un detergente neutro de forma manual. En este protocolo no se presentó quemaduras y se obtuvo menos rupturas en las hojas durante el lavado, sin embargo, no fue efectivo en su totalidad. Ya que al mantener las hojas en agua destilada estéril al finalizar la desinfección mientras se realizaba los cortes, presentaron quemaduras con rapidez lo que impidió obtener cultivos viables (ilustración 19).

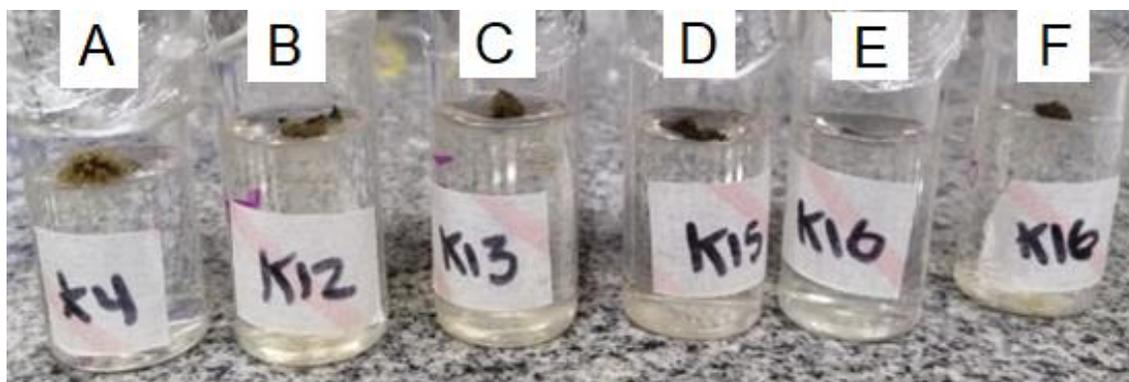


Ilustración 19. Segundo cultivo *in vitro* de *Seemannia sylvatica* axénicos con crecimiento a las 12 semanas a 25°C en medio MS suplementado con BAP y ANA a diferentes concentraciones para la obtención de plántulas. Fuente: Collazos, 2020.

En el tercer cultivo *in vitro* realizado se modificó nuevamente el protocolo en donde se usó detergente neutro, hipoclorito por 4 minutos, al finalizar la desinfección de las hojas se dejaron en solución PBS para evitar el proceso de marchitez. Aquí se observó que en las hojas no se provocó las quemaduras ni la marchitez a comparación de los cultivos anteriores, esto quiere decir que al exponer las hojas en el menor tiempo de posible ante el hipoclorito fue un punto a favor, sin embargo, se observó que la solución PBS debido a las sales que contiene facilitó disminuir el proceso de marchitez y quemaduras en las hojas para poder realizar los cultivos. Esto se pudo evidenciar ya que más de 20 tubos se mantuvieron axénicos durante 10 semanas demostrando un crecimiento leve solamente en uno de los tratamientos (K5: 75µL BAP) a las 10 semanas (ilustración 20). Al momento de hacer el protocolo para la obtención de callogénesis se presentó nuevamente crecimiento microbiano, sin embargo, en los controles del agua utilizada en el proceso de limpieza y desinfección no se obtuvo ningún crecimiento microbiano, lo que indica que todos los microorganismos aislados son endofíticos de la planta.

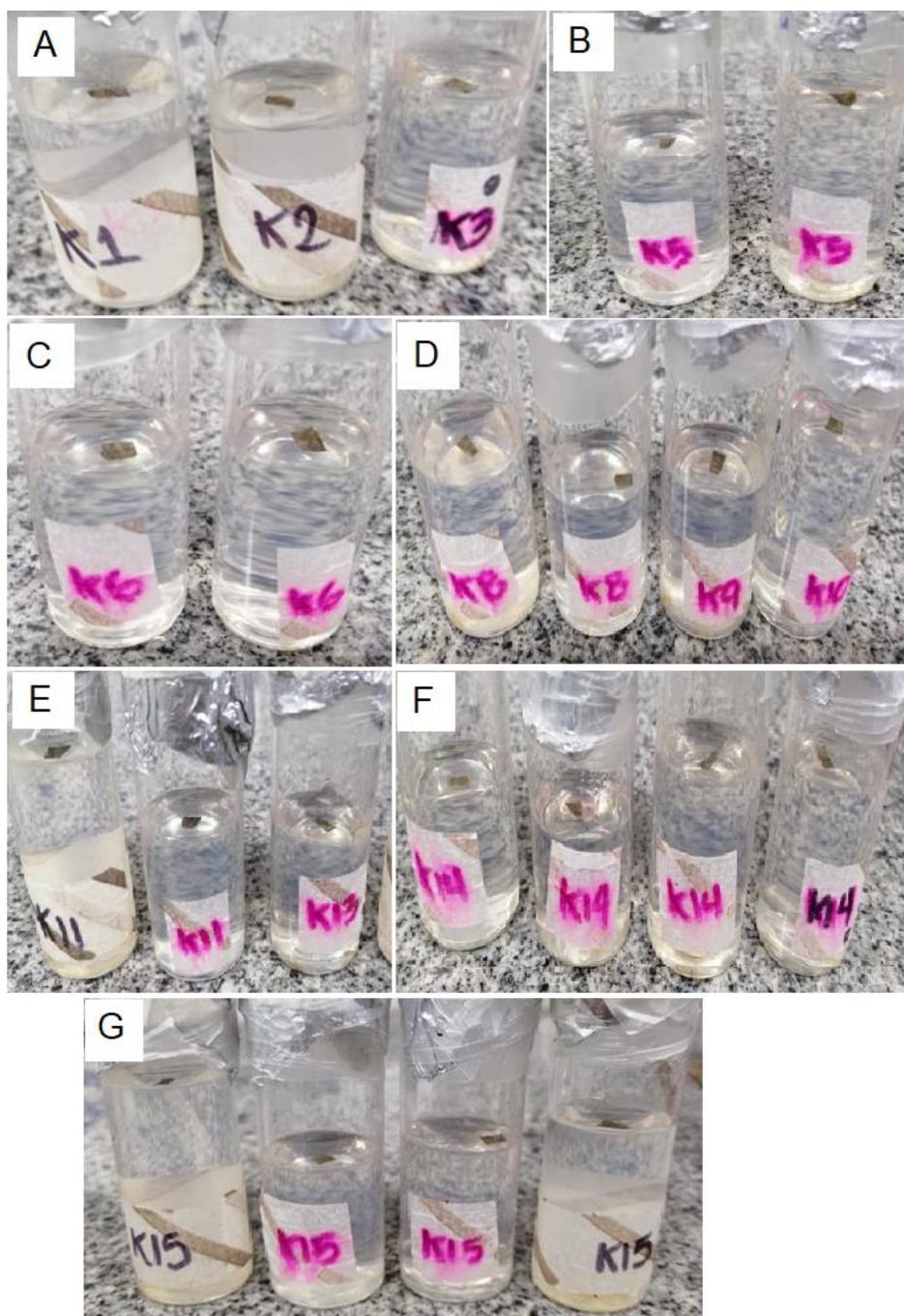


Ilustración 20. Tercer cultivo *in vitro* de *Seemannia sylvatica* para la obtención de plántulas, presentando crecimiento leve a las 10 semanas a una temperatura de 25°C en medio MS suplementado con BAP y ANA en diferentes concentraciones. Fuente: Collazos, 2020.

7. DISCUSIÓN

7.1 Aislamiento y caracterización morfológica

El mayor crecimiento fúngico se obtuvo en 2 de 34 cepas aisladas (KCH1 y KCH2), siendo el medio MS empleados en los cultivos *in vitros* fue el que presentó mayor crecimiento microbiano. La cepa KCH2 se obtuvo en un mayor porcentaje de crecimiento en los distintos medios de cultivos, seguido de KCH1. Los aislamientos a partir de los cultivos *in vitros* fue mayor, puesto a que el número de cepas aisladas fue elevada a comparación de los otros medios de cultivos empleados en el mismo método (corte de hoja), sin embargo, estos microorganismos se pueden considerar como contaminantes, ya que la finalidad de los cultivos *in vitro* es la formación de plántulas y callos de forma aséptica sin la presencia de microorganismos, por tanto, no se debe generar presencia microbiana. Se logró evidenciar que las colonias de la especie KCH2 no creció en los todos medios de cultivos (SNA, PDA, CZ, SDA, MEA, MS) obteniendo solamente crecimiento en gran proporción en los medios MS, PDA y SDA, mientras que fue bajo el crecimiento en los otros 3 medios, sin embargo, fue la cepa que más creció. La especie KCH1 solamente fue posible aislarlo del medio MS, las demás cepas fúngicas se obtuvieron en bajo crecimiento.

La solución PBS presenta un pH de 7.4, se compone principalmente de sales (cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio) y es eficiente para procesos de lavados de material celular por su capacidad de evitar la desecación de biomoléculas en la célula (desnaturalización); las moléculas de agua presente en la solución hacen que este se adhiera a las biomoléculas de la célula inmovilizándolas para prevenir el ingreso del agua desecando la célula (Lichtenauer *et al.*, 2009). Esta solución suele usarse para realizar diluciones y lavados a suspensiones celulares tanto de células animales como células vegetales, en un estudio realizado a partir de células animales se logró observar que la solución PBS permitió una eficiencia en el lavado dando buen rendimiento en la recuperación de las células (Santos *et al.*, 2002), el uso de esta solución en material vegetal se da la absorción del fosfato lo que genera que se inmovilice las moléculas del agua (Lichtenauer *et al.*, 2009).

El glicerol es uno de los crioprotectores más usados para la conservación de comunidades microbianas con alto potencial biotecnológico. Este tipo de crioprotector minimiza el daño producido al momento de realizar procesos de congelamiento y descongelamiento de la comunidad microbiana (Yu *et al.*, 2015). La temperatura en el proceso de ultracongelamiento permite que el microorganismo detenga su proceso metabólico favoreciendo su conservación, sin embargo, presenta una cierta desventaja al momento de realizar un primer enfriamiento a -20°C y al pasar a -80°C ocasionando cierto daño en la estructura de la pared celular de las cepas por la posible formación de cristales de hielo, por ello es recomendable hacer uso de crioprotectores como el glicerol (Jang *et al.*, 2017). A pesar de que puede llegar a presentar esta desventaja, este método es muy efectivo para conservación de microorganismos a largo plazo manteniendo la viabilidad, la pureza y la estabilidad tanto a nivel fenotípico como genotípico (Homolka, 2014). El método Castellani es igualmente efectivo para emplearse en la conservación de microorganismos, ya que según estudios que se han realizado permite conservar hasta por periodos de 5 años, un ejemplo claro es el un estudio realizado por Bermeo (2017) logró evaluar la viabilidad, la pureza y la velocidad de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* sometiendo a una conservación en agua destilada estéril. Otro ejemplo, es el estudio realizado por Baraskarathavan *et al.*, (2009) logrando mantener la viabilidad de *Botryosphaeria* en un 81 a 100% realizando conservación a partir de las técnicas de ultracongelamiento y Castellani.

7.2 Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

Las técnicas empleadas en los cultivos de tejidos vegetales suelen aplicarse en especies que presentan capacidad para producir sustancias bioactivas con propiedades farmacológicas como recursos terapéuticos para diversos tratamientos (Espinosa-Leal *et al.*, 2018; Martín *et al.*, 2015). Las técnicas *in vitro* en comparación con los cultivos tradicionales presentan una mayor ventaja, principalmente en la producción de productos bioactivas en condiciones ambientales controlados y en un alto contenido, lo que permite una mejoría en el proceso de organogénesis; sin embargo, se ha observado que al momento en que estos microorganismos producen metabolitos secundarios pueden promover o inhibir el crecimiento de las plantas (Sánchez-Calvo *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2008; Villanueva *et al.*, 2013). Autores señalan que las fitohormonas que se emplean en estas técnicas suelen obtenerse a partir de microorganismos como bacterias, hongos y levaduras

(Villanueva *et al.*, 2013), la cual emplean rutas metabólicas para la producción, un ejemplo claro es la ruta que emplean las levaduras para la producción de la hormona AIA e IPYA su proceso de obtención se da a partir del triptófano (Morffy *et al.*, 2020).

Las hormonas que se emplean para obtener cultivos *in vitros* ayudan en la regeneración de la planta, se debe resaltar que se puede presentar una serie de inconvenientes en este proceso si no se cuenta las proporciones y la cantidad que se emplea de auxina/citoquinina (Serrano, 2015). Algunos de los inconvenientes que se pueden generar en los cultivos *in vitro* se da debido a la composición del medio de cultivo que se emplea, de igual forma la interacción de los regulares en el crecimiento de las plantas, el tipo de explante a usar y las condiciones genotípicas que presenta la planta generan problemas al momento de querer emplear estas técnicas para la preservación de las especies y su producción en alta concentración de biomasa (Kazeroonian *et al.*, 2018; Pérez *et al.*, 2008).

Si la proporción de las hormonas empleada es próxima o superior a 1.0 en altas cantidades permite la formación de callos, sin embargo, si se aplica una proporción superior a 1.0 en elevadas cantidades de hormonas se da la formación de rizogénesis, es por eso que los diseños experimentales que se quieran desarrollar ya sea para la producción de algún metabolito que produzca una planta de interés o en su defecto preservarla, se debe hacer combinaciones de las hormonas teniendo en cuenta la cantidad y la proporción para determinar cuál es la efectiva a emplear en la planta de interés (Serrano, 2015). Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente se puede evidenciar que las concentraciones empleadas para la formación de callos a partir de callogénesis en esta investigación no se tuvo en cuenta la proporción y la cantidad que se empleó de las hormonas en los cultivos generando que no se diera de forma correcta el proceso. De igual manera en los tres cultivos *in vitros* realizados para la obtención de plántulas se evidencia que la cantidad de hormonas empleadas no son del todo efectiva, debido a que el tiempo que los cultivos requieren es demasiado extenso, ya que se obtiene la regeneración de la planta a partir de 12 semanas de incubación, por tal motivo se requiere tener en cuenta la proporción y la cantidad a usar para ver si es posible contrarrestar el tiempo de incubación para acelerar el crecimiento. Al evidenciar los resultados obtenidos en la investigación realizada por Almeida *et al.*, (1999) se logró se dio la regeneración de la planta entre los 20 y 30 días (3 a 4 semanas) a partir de callogénesis de la especie *Sinningia allagophylla*.

Según estudios realizados en otras especies pertenecientes a la familia de Gesneriaceae ha sido efectivo el uso de las hormonas ANA y BAP a las concentraciones estipuladas en este proyecto encontrándose dentro del rango. En 2017 la investigación realizada por Silva *et al.*, observaron que el uso de las hormonas ANA e AIA a concentraciones entre 0.1 a 0.5mg/L en la especie *Saintpaulia ionantha* H. Wendl (violeta africana) fue efectivo para la obtención de organogénesis directa. Otro estudio realizado por Almeida *et al.*, (1999) observó que al emplear el medio MS suplementado con las hormonas AIA a una concentración de 0.1 a 0.5mg/L y BAP a una concentración de 0.01 a 0.1mg/L en *Sinningia allagophylla* favoreció la formación de callos. En otro estudio realizado se observó que al emplear concentraciones iguales de ANA y BAP a 0.5mg/L permitió la regeneración de explantes de hojas del crisantemo (Kazeroonian *et al.*, 2018). Se debe resaltar que las hormonas presentan diferentes acciones como, por ejemplo, la AIA y ANA permiten el elongamiento celular, ambas son auxinas y son las más usadas; mientras que la 2,4-D siendo una auxina promueve la formación de callos y tiene propiedades herbicidas; de las citoquininas BAP promueve la diferenciación y división celular; las giberelinas estimulan la germinación (Paiva *et al.*, 2001).

8. CONCLUSIONES

- En referencia a la descripción macroscópica fue posible determinar las características que presentaron los 72 microorganismos endofíticos aislados de las láminas foliares de *Seemannia sylvatica* observando que todas las cepas presentaron morfologías distintas, sin embargo, se evidenció que solo unas cuantas cepas presentan ciertas similitudes haciendo que probablemente sean del mismo género, pero diferente especie o posiblemente sea la misma especie. Igualmente se evidencia que el método de corte de hoja es más efectivo para obtener un gran número de microorganismos en comparación con el método de macerado de hojas con solución PBS, obteniendo un total de 58 cepas por corte de hoja y 14 cepas por macerado.
- Fue posible conservar cada una de las cepas a partir de los dos métodos de conservación (ultracongelamiento y Castellani), basados en la literatura se logró observar que estos dos métodos son efectivos para conservar comunidades microbianas a largo plazo, se espera poder mantener la viabilidad y pureza de cada una de las cepas conservadas, lo que permitirá realizar nuevamente esta investigación.
- Al detallar los sucesos ocurridos durante los 3 cultivos *in vitros* realizados para la obtención de plántulas a partir de organogénesis directa fue efectivo emplear el tercer protocolo de limpieza y desinfección del material vegetal, debido a que el número de cultivos axénicos fue mayor en comparación con los otros dos protocolos de limpieza y desinfección empleados en los cultivos *in vitro* 1 y 2; sin embargo, es necesario emplear una alternativa para acelerar el tiempo que requiere los cultivos para lograr tener crecimiento en menor tiempo. El proceso de callogénesis para la obtención de cultivos *in vitros* de callos no fue efectivo, ya que la proporción y la cantidad de hormonas empleadas no fueron efectivas.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar nuevamente el aislamiento de microorganismos de la planta *in natura* tanto de su hábitat inicial y de la planta que se encuentra en el herbario del UEC-UNICAMP, es decir, que es necesario hacer los aislamientos a la planta en su hábitat natural como de la planta que se encuentra en condiciones controladas, ya que al modificar las condiciones de su hábitat genera un cambio en el metaboloma de la planta, por lo cual los microorganismos endófitos que interaccionan con la planta se verán alterados. Por ello se recomienda realizar nuevamente este estudio teniendo en cuenta más factores como son: el aislamiento de microorganismos endófitos de la planta en los dos hábitat, realizar la clasificación taxonómica tanto a las cepas que se aíslen al repetir estudio como a las que ya se encuentran en conservación para determinar si en efecto estas primeras cepas aisladas se consideran endófitas, de igual manera se recomienda tener en cuenta la cantidad y la proporción de las hormonas para la producción de callos; una vez que se logre cumplir con estas recomendaciones se espera lograr realizar las perspectivas propuestas.

10. PERSPECTIVAS

Este estudio abre perspectivas para próximas investigaciones como:

- Proceder a obtener extractos crudos en acetato de etilo y etanol de la planta *in natura* y, para aquellos con cantidad en términos de masa, realizar la evaluación *in vitro* de la actividad antioxidante, antimicrobiana (contra bacterias y hongos) y el efecto sobre la viabilidad celular de cultivos de células tumorales y no tumorales, seleccionando el extracto más prometedor en términos de bioactividad;
- Efectuar el cultivo en pequeña escala los microorganismos endofíticos cultivables y proceder a obtener extractos crudos en acetato de etilo y etanol, definiendo el medio de cultivo con el mejor rendimiento en términos de crecimiento, rendimiento en masa de los extractos y bioactividad;
- Obtener el perfil químico de los extractos bioactivos por UHPLC / ESI-MS en estudio de desreplicación;
- Continuar con el fraccionamiento, aislamiento y la identificación estructural de las sustancias bioactivas que no pueden identificarse en el paso de desreplicación del extracto con la cantidad en términos de masa y con un resultado más prometedor en términos de bioactividad;
- Determinar la actividad biológica del potencial inhibitorio de las proteínas quinasas C (PKC) a las muestras con mejores resultados en los ensayos celulares y esa cantidad presente en términos de masa.

BIBLIOGRAFÍA

- Almeida , V., & Pastor, S. (1999). *Sinningia allagophylla* (Gesneriaceae): cultivo in vitro de una planta nativa del cerrado brasileño. *Revista Brasileña de Botánica*, 22 (3), 381 - 384.
- Arana , F. (2003). *Callogénesis y Establecimiento de suspensiones celulares en el árbol del NIM (Azadirachta Indica, A.JUSS)*.
- Araujo , A., Souza, V., & Chautems, A. (2005). Gesneriaceae da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasil. Bot.*, 28(1), 109 - 135.
- Baby, J., & Mini, P. (2011). Bioactive Compounds from Endophytes and their Potential in Pharmaceutical Effect: A Review. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 1(3), 291 - 309.
- Barka , E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & Wezeld, G. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, Vol 8(1), 1 - 44.
- Barragán , D., & Lesmes, A. (2009). “Comparacion de Dos Metodos de Conservación, Liofilizacion y Microsecado Sobre Tres Especies Bacterianas”: Eleccion Del Mejor Metodo. *PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA*, 8 - 12.
- Baskarathevan, J., Jaspers, M., Jones, E., & Ridgway, H. (2009). Evaluation Of Different Storage Methods For Rapid And Cost-Effective Preservation Of *Botryosphaeria* Species. *New Zealand Plant Protection*, 62, 234 - 237.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 4 (suppl), 1044 - 1051 .
- Bermeo, L. (2017). Influencia de tres métodos de conservación sobre la estabilidad y producción del hongo *Pleurotus ostreatus*. *UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES*, 29 - 33.
- Bologna, P., & Stancanelli, S. (2019). Influence of volume container in the production of rhizomes in *Seemannia* (Gesneriaceae). *Ornamental Horticulture.*, 25(3), 287 - 292.
- Burt. (1963). Studies in the Gesneriaceae of the Old World. XXIV. Tentative keys to the tribes and genera. *Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh* 24, 205 - 220.
- Burt, B., & Wiehler., H. (1995). Classification of the family Gesneriaceae. *Gesneriana* 1. 1 - 4.
- Cairampoma, L., & Martel, C. (2012). Notas sobre los visitantes florales de *Seemannia sylvatica* (Kunth) Hanstein (Gesneriaceae). *Rev. peru. biol.*, 19(1), 011 - 016.
- Camargo, E., Rodrigues, L., & Araujo, A. (2011). Pollination biology and reproduction of *Seemannia sylvatica* (Kunth) Hanstein (Gesneriaceae) in the Serra da Bodoquena National Park, Mato Grosso do Sul. *Biota Neotrop.*, 11(4), 125 - 130.

- Castellanos , O., Rodríguez, A., Rodríguez, J., & Rodríguez, B. (2006). Indirect organogenesis and in vitro rooting of *Paulownia elongata*. *e-Gnosis*, 4(15), 1 - 12.
- Costa, L., Queiroz, M., Borges , A., Moraes, C., & Araújo, E. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 1562 - 1575.
- Das, R., Romi, W., Das, R., Sharma , H., & Thakur, D. (2018). Antimicrobial potentiality of actinobacteria isolated from two microbiologically unexplored forest ecosystems of Northeast India. *BMC Microbiology* 18:71, 1 - 16.
- Dhayanithy, G., Subban, K., & Chelliah, J. (2019). Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with *Catharanthus roseus*. *BMC Microbiology* 19:22, 1 - 14.
- Ek-Ramos, M., Gomez-Flores, R., Orozco-Flores, A., Rodríguez-Padilla, C., González-Ochoa, G., & Tamez-Guerra, P. (2019). Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. *Front Microbiol. Vol. 10, No. 463*.
- Espinosa-Leal, C., Puente-Garza, C., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Nature Public Health Emergency Collection* 248(1), 1 -18.
- Etminani, F., & Harighi, B. (2018). Isolation and Identification of Endophytic Bacteria with Plant Growth Promoting Activity and Biocontrol Potential from Wild Pistachio Trees. *The Plant Pathology Journal* 34(3), 208 - 217.
- Evangelista, Z., Quiñones, E., & Rincón, G. (2017). Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *Temas de Ciencia y Tecnología, Vol 21 N° 63*, 39 - 51.
- Fernández, C. (2005). Análisis de la diversidad de Actinomicetos asociados a raíces de *Lupinus angustifolius*. *Trabajo de Grado. Departamento de Microbiología y genética. Universidad de Salamanca. Salamanca*.
- Firáková, S., Šturdíková, M., & Múčková, M. (2007). Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia, Bratislava*, 62/3, 251 - 257.
- Francis, I., Holsters, M., & Vereecke, D. (2010). The Gram-positive side of plant–microbe interactionse. *Environmental Microbiology*, 12(1), 1 - 12.
- Frank, A., Saldierna, J., & Shay, J. (2017). Review Transmission of Bacterial Endophytes. *Journal Microorganisms* 5(4): 70, 1 - 21.
- Fritsch, K. (1893 - 1894). Gesneriaceae. in A. Engler and K. Prantl, eds. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien IV/ 3B. W. Engelmann, Leipzig.*, 133 -144 (1893), 145 - 185 (1894).
- Gato, Y. (2010). "Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* Rifai". *Fitosanidad vol. 14, no. 3*, 189 - 195.

- Glick, B. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Hindawi Publishing Corporation Scientifica*, 1 - 15.
- Gouda, S., Das, G., Sen, S., Shin, H.-S., & Patra, J. (2016). Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. *Frontiers in Microbiology*. 7:1538.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* (27), 1 - 93.
- Hamayun, M., Afzal Khan, S., Ahmad, N., Tang, D.-S., Kang, S.-M., Na, C.-I., Sohn, E.-Y., Hwang, Y.-H., Shin, D.-H., Lee, B.-H., Kim, J.-G., & Lee, I.-J. (2009). Cladosporium sphaerospermum as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of Glycine max (L.) Merr. *World Journal of Microbiology and Biotechnol* (25), 627 – 632.
- Hernández, D., & Loaiza, A. (2014). Selección de un método para la conservación y preservación de Actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira (Trabajo de pregrado). Universidad Tecnológica De Pereira. *Universidad Tecnológica de Pereira, Risaralda*.
- Hidrin, N., Goodfellow, M., Boiron, P., Moreno, M., & Serrano, J. (2001). Los estreptomices. Actualización y revisión didáctica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(1), 36 - 38.
- Hinoshita, L., Araujo, A., & Goldenberg, R. (2018). Os gêneros *Besleria*, *Codonanthe*, *Gloxinia*, *Napeanthus*, *Nematanthus* e *Seemannia* (Gesneriaceae) no estado do Paraná. *Rodriguésia* 69(2), 631 - 647.
- Homolka, L. (2014). Preservation of Live Cultures of Basidiomycetes - Recent Methods. *Fungal Biol* 118(2), 7 - 25.
- Isaeva, O., Glushakova, A., Garbuz, S., Kachalkin, A., & Chernov, I. (2010). Endophytic yeast fungi in plant storage tissues. *Biology Bulletin* 37(1), 26 - 34.
- Jang, T., Park, S., Yang, J., Kima, J., Seok, J., Park, U., Choi, C. W., Lee, S. R., & Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *INTEGR MED RES* 6, 1 - 7.
- Kandel, S., Joubert, P., & Doty, S. (2017). Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. *Microorganisms*, 1 - 26.
- Kazeroonian, R., Mousavi, A., Jari, S., & Tohidfar, M. (2018). Factors Influencing *in vitro* Organogenesis of *Chrysanthemum morifolium* cv. 'Resomee Splendid'. *Iranian Journal of Biotechnology*, 16(2), 1 - 8.
- Khare, E., Mishra, J., & Arora, N. (2018). Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. *Frontiers in Microbiology* 9:2732., 1 - 12.
- Khunnamwong, P., Jindamorakot, S., & Limtong, S. (2018). Endophytic yeasts diversity in leaf tissue of rice, corn and sugarcane cultivated in Thailand assessed by a culture-dependent approach. *Fungal Biology*, 4 - 9.

- Lewin, G., Carlos, C., Chevrette, M., Horn, H., McDonald, B., Stankey, R., Fox, B. G., & Currie, C. (2016). Evolution and Ecology of Actinobacteria and Their Bioenergy Applications. *Annu Rev Microbiol.* 70, 235 – 254.
- Li, J., Zhao, G.-Z., Huang, H.-Y., Qin, S., Zhu, W.-Y., Zhao, L.-X., Xu, L.-H., Zhang, S., Li, W.-G., & Strobel, G. (2012). Isolation and characterization of culturable endophytic actinobacteria associated with *Artemisia annua* L. *Antonie van Leeuwenhoek* (2012) 101, 515 – 527.
- Lichtenauer, M., Nickl, S., Hoetzenecker, K., Mangold, A., Moser, B., Zimmermann, M., Hacker, S., Niederpold, T., Mitterbauer, A., & Ankersmit, H. (2009). Phosphate Buffered Saline Containing Calcium and Magnesium Elicits Increased Secretion of Interleukin-1 Receptor Antagonist. *LABMEDICINE j Volume 40 Number 5*, 290 - 293.
- Limtong, S., Kaewwichian, R., Yongmanitchai, W., & Kawasaki, H. (2014). Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World J Microbiol Biotechnol*, 1 - 12.
- Liu, H., Carvalhais, L., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P., Pieterse, C., & Schenk, P. (2017). Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. *Frontier Microbiology*, 1 - 17.
- Luo, S., Xu, T., Chen, L., Chen, J., Rao, C., Xiao, X., Wan, Y., Zeng, G., Long, F., Liu, H., & Liu, Y. (2012). Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18. *Appl Microbiol Biotechnol* (93), 1745 – 1753.
- Martín, R., Chong-Pérez, B., & Pérez-Alonso, N. (2015). Organogénesis *in vitro* en el género *Digitalis*. *Biocnología Vegetal Vol. 15, No. 4*, 195 - 206.
- Mesquita, R., Nóbrega, M., & Araújo, W. (2016). Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology*, 86 - 98.
- Morffy, N., & Strader, L. (2020). Old Town Roads: routes of auxin biosynthesis across kingdoms. *Current Opinion in Plant Biology*, 55, 21 - 27.
- Moscatiello, R., Baldan, B., & Navazio, L. (2013). Chapter 5 Plant Cell Suspension Cultures. *Methods Mol Biol.* 953, 77 - 93.
- Nair, D., & Padmavathy, S. (2014). Review Article: Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. *Hindawi Publishing Corporation*, 1 - 12.
- Padhi, L., Mohanta, Y., & Panda, S. (2013). Endophytic fungi with great promises: A Review. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* 3(3), 152 - 170.
- Paiva, R., & Paiva, P. (2001). Chapter 1, cultura de tecidos vegetais. *Universidade Federal De Lavras*, 8 - 9.

- Panawala, L. (2017). *Difference Between Cotyledon and Endosperm*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/316699174_Difference_Between_Cotyledon_and_Endosperm
- Panizo, M., Reviákina, V., Montes, W., & González, G. (2005). Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25, 35-40.
- Pêgo, R., Grossi, J., Honorato, P., Garde, G., & Alves, C. (2013). Leaf Cutting Propagation of *Seemanian sylvatica* (Kunth) Hants. *Pêgo, R. G., Grossi, J. A. S., Honorato, P. R., Garde, G. P., & Alves, C. M. L. (2013). Leaf Cutting Propagation Of Seemanian sylvatica (Kunth) Hants. Acta Horticulturae, (1000), 251 - 256.*
- Pelaz, G. (2014). Aislamiento y estudio de la diversidad de las poblaciones de Actinobacterias presentes en muestras de compost. 8 - 10.
- Pérez, M., Armas, R., Delgado, M., & Hernández, C. (2008). Organogénesis indirecta a partir de meristemos apicales caulinares de la variedad cubana de arroz Reforma. *Cultivos Tropicales*, 29(1), 23 - 28.
- Perret, M., Chautems, A., Araujo, A., & Salamin, N. (2013). Temporal and spatial origin of Gesneriaceae in the New World inferred from plastid DNA sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171, 61 - 79.
- Rajamanikyam, M., Vadlapudi, V., Amanchy, R., & Upadhyayula, S. (2017). Endophytic Fungi as Novel Resources of natural Therapeutics. *Biological and Applied Sciences*, 1 - 26.
- Roalson, E., Boggan, J., Skog, L., & Zimmer, E. (2005). Untangling Gloxinieae (Gesneriaceae). I. Phylogenetic Patterns and Generic Boundaries Inferred from Nuclear, Chloroplast, and Morphological Cladistic Datasets. *TAXON* 54(2), 389 - 410.
- Sánchez-Calvo, L., & Alvarenga-Venutolo, S. (2014). Callus formation of cell suspensions in *Uncaria tomentosa* (cat's claw). *Tecnología en Marcha*. 28(1), 105 - 120.
- Santos, R., Silva, J., Costa, S., Rodrigues, A., Lôbo, R., & Figueiredo, J. (2002). Effect of 0.9% saline solution and phosphate buffer saline at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles. *Revista Brasileira de Investigación Veterinaria y Ciencia Animal*, 39 (5), 254 - 259.
- Sarmiento, Y., Hazel, A., & Cárdenas, D. (2013). Evaluation of the stability of *Trichoderma* sp. and *Azotobacter* sp. preserved by different methods. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol. 15, Núm. 1.
- Serrano, L. (2015). Tema 2. cultivos *in vitro*. *Universidad Pablo de Olavide*, 1 - 10.
- Serrano-Serrano, M., Rolland, J., Clark, J., Salamin, N., & Perret, M. (2017). Hummingbird pollination and the diversification of angiosperms: an old and successful association in Gesneriaceae. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1852).

- Silva, F., Pereira, L., & Silveira, C. (2008). Micropropagation of *Alibertia edulis* Rich. *Brazilian Archives Of Biology And Technology.*, 51(6), 1103 - 1114.
- Sudha, V., Govindaraj, R., Baskar, K., Al-Dhabi, N., & Duraipandiyar, V. (2016). Properties of Endophytic Fungi. *Braz. arco. biol. Technol.* vol.59 , 1 - 7.
- Tadych , F., & White, F. (2017). Endophytic Microbes. *ElsevierInc.*, 1 - 13.
- Tischler, D., Van Berkel, W. J., & Fraaije, M. W. (2019). Actinobacteria, a Source of Biocatalytic Tools. *Frontiers in Microbiology*, 1 - 4.
- Tofiño, M. (2017). Optimización de la producción de alcaloides en *Zephyranthes carinata* por medio de Organogénesis o Embriogénesis Somática *in vitro*. *Universidad ICESI, Santiago de Cali*, 20.
- Verdan, M., & Stefanello , M. (2012). Secondary Metabolites and Biological Properties of Gesneriaceae Species. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY – Vol. 9* , 2701 - 2731.
- Verdan, M., Ehrenfried, C., Scharf, D., Cervi, A., Salvador, M., Barison, A., & Stefanello, M. (2014). Chemical Constituents from *Sinningia canescens* and *S. warmingii*. *Natural Product Communications* 9(10), 1535 - 1537.
- Verdan, M., Scharf, D., Barison, A., Salvador, M., & Stefanello, M. (2017). Further chemical constituents from *Sinningia canescens* and *S. leucotricha* (Gesneriaceae). *Phytochemistry Letters* 22, 205 - 209.
- Verdan, M., Unemoto, L., Faria, R., Salvador, M., Lemos de Sá, E., Barison, A., & Stefanello, M. (2013). Leucotrichoic acid, a novel sesquiterpene from *Sinningia leucotricha* (Gesneriaceae). *Tetrahedron Letters* 54, 4735 - 4737.
- Villanueva, F., Ávila, M., Mansilla, A., Abades, S., & Cáceres, J. (2013). Effects Of Auxins And Cytokinins On Tissue Culture Of *Ahnfeltia Plicata* (Hudson) Fries, 1836 (Ahnfeltiales, Rhodophyta) From Magellan Region. *Anales del Instituto de la Patagonia*, 41(1), 99 - 111.
- Webb, C., & Lloyd, D. (1986). The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24:1, 163 - 178.
- Weber, A., Clarck, J., & Möller, M. (2013). Anew Formal Classification Of Gesneriaceae. *Selbyana* 31(2), 68 - 94.
- Weng , Z., Maldonado, G., Junco , R., Borrego , S., Álvarez , I., Hechavarría , Z., & Hernández , N. (2011). *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus* spp. of food origin and its conservation in distilled water. *Rev Cubana Hig Epidemiol* vol.49 no.2 Ciudad de la Habana, 191 - 201.
- Wiehler. (1983). A synopsis of the neotropical Gesneriaceae. *Selbyana* 6[1982], 1 - 219.
- Xifreda, C. (1996). Citas Nuevas O Críticas Para La Flora Argentina Ii: *Gymnostoma* Y *G. Nematanthodes* (Gesneriaceae). *Instituto de Botánica Darwinion* 34(1-4), 383 - 388.

- Xin, G., Zhang, G., Kang, J. W., Staley, J. T., & Doty, S. L. (2009). A diazotrophic, indole-3-acetic acid-producing endophyte from wild cottonwood. *Biology and Fertility of Soils* *Volume 45 (6)* , 669 - 674.
- Yu, C., Reddy, A., Simmons, C., Simmons, B., Singer, S., & VanderGheynst, J. (2015). Preservation of microbial communities enriched on lignocellulose under thermophilic and high-solid conditions. *Biotechnology for Biofuels* *8:206*, 1 - 123.
- Zinniel, D., Lambrecht, P., Harris , N., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G., & Vidaver, A. (2002). Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 2198 - 2208.

ANEXOS

Anexo 1. Prueba del registro de acceso emitida por el Sistema Nacional para la Gestión del Patrimonio Genético y los Conocimientos Tradicionales Asociados (SISGEN).



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A3C4070

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A3C4070
Usuário:	UNICAMP
CPF/CNPJ:	46.068.425/0001-33
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Sinningia speciosa
Sinningia magnifica
Sinningia gigantifolia
Sinningia araneosa
Sinningia schiffneri
Sinningia mauroana
Sinningia striata
Sinningia sp
Sinningia douglasii
Seemannia sylvatica
Sinningia sp
Seemannia sp
Sinningia sp

Nematanthus fluminensis

Nematanthus fritschi

Sinningia sp

Sinningia sp

Título da Atividade: UpiKqCeJzR84Z88vm6IMUJzdT84xYPRmD4QGoWCwtFvX2haoVqmnKhJ6pq
RaGJnyXtLZ12bA0r18d8fK2xTRoG6hl/zh/8e8BbMOjk+qlay6QmG7pn42HvEZ
GofBWxohqm/cCaZfG8waqUqAZhpx8tr1K8kz1QMF8rF4daP8q8JMSLhNDBFf
G==

Equipe

Marcos Jose Salvador	UNICAMP
Wallace Ribeiro Correa	Instituto Federal do Sul de Minas Gerais, Inconfidentes,
Alvaro Jose Hernandez-Tasco	IB-UNICAMP
Alessandra Freitas Seraln	IB-UNICAMP
Maria Eilda Alves Stefanello	UFPR
Candida Aparecida Leite Kacsuya	Universidade Federal da Grande Dourados
Carlos José Alvarez Cantero	IB-UNICAMP

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: Trabalhos científicos publicados (completos e i

Outros resultados

Data do Cadastro: 04/11/2018 01:38:30

Situação do Cadastro: Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 22:33 de 04/11/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - SISGEN

Anexo 2. Preparación de medios de cultivos.

Medio de cultivo	Componentes
<p>Medio Murashige & Skoog (MS) pH 6.0</p>	<p>Sacarosa 30 gr/L Inositol 0.1 gr/L Phytigel 2.5 gr/L Carbón activado 0.5 gr/L Macronutrientes 100 mL/L Micronutrientes 1 mL/L Hierro-EDTA 5 mL/L Vitaminas 1 mL/L Agua destilada 893 mL/L</p>
<p>Agar Sabouraud-Dextrosa (SDA) pH 5.6</p>	<p>Peptona 10 gr/L D (+)-Glucosa 40 gr/L Agar 15 gr/L Agua destilada 1 L</p>
<p>Agar Papa Dextrosa (PDA) pH 5.6</p>	<p>Almidón de papa 4 gr/L Dextrosa 20.5 gr/L Agar 15 gr/L Agua destilada 1 L</p>

<p>Agar Czapeck (CZ) pH 6.8</p>	<p>Nitrato sódico 2 gr/L Cloruro potásico 0.5 gr/L Sulfato magnésico 0.5 gr/L Sulfato ferroso 0.1 gr/L Fosfato dipotásico 1 gr/L Sacarosa 30 gr/L Agar 12 gr/L Agua destilada 1 L</p>
<p>Agar Extracto de Malta (MEA) pH 5.6</p>	<p>Extracto de Malta 20 gr/L Peptona 1 gr/L Glucosa 20 gr/L Agar 15 gr/L Agua destilada 1 L</p>
<p>Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) pH 5.6</p>	<p>Glucosa 0.2 gr/L Sacarosa 0.2 gr/L KH₂PO₄ 1 gr/L KNO₃ 1 gr/L MgSO₄ 7H₂O 0.5 gr/L KCl 0.50 gr/L Agar 20 gr/L Agua destilada 1 L</p>
<p>Agar Nutritivo (AN) pH 6.8 – 7.0</p>	<p>Peptona 5 gr/L Extracto de carne/levadura 3 gr/L</p>

	<p>Agar 15 gr/L Cloruro de sodio 5 gr/L Agua destilada 1 L</p>
<p>Agar Yeast Starch Agar (YSA)</p>	<p>Almidón 10 gr/L Extracto de levadura 3 gr/L KH₂PO₄ 0.2 gr/L MgSO₄ 7H₂O 0.2 gr/L Agar 20 gr/L Agua destilada 1 L</p>
<p>Agar Tripticasa de soja (TSA) pH 7.3</p>	<p>Triptona 1.5 gr /L Peptona de soja 0.5 gr/L NaCl 1.5 gr/L Agar 15 gr/L Agua destilada 1 L</p>
<p>Agar R₂A pH 7.2</p>	<p>Extracto de levadura 0.5 gr/L Peptona 0.5 gr/L Casamino acids 0.5 gr/L Almidón 0.5 gr/L Dextrosa 0.5 gr/L Pirúvato de sodio 0.3 gr/L KH₂PO₄ 0.3 gr/L MgSO₄ 0.05 gr/L Agar 15 gr/L Agua destilada 1 L</p>

<p>Agar Synthetic Complete (SC)</p>	<p>NaCl 5 gr/L MgSO₄ 0.2 gr/L NH₄H₂PO₄ 1 gr/L KH₂PO₄ 1 gr/L Na₃C₆H₅O₇ 2 gr/L Azul de bromotimol 0.024 gr/L Agar 20 gr/L Agua destilada 1 L</p>
<p>International Streptomyces Project-2 Medium (ISP2) pH 7.2</p>	<p>Extracto de levadura 4 gr/L Extracto de Malta 10 gr/L Dextrosa 4 gr/L Agar 20 gr/L Agua destilada 1 L</p>
<p>Inorganic Salt Starch Agar Medium No. 4 (ISP4) pH 7.2</p>	<p>Solución 1: Almidón 10 gr Agua destilada 500 mL Solución 2: Extracto de levadura 3 gr KH₂PO₄ 7H₂O 1 gr NaCl 1 gr CaCO₃ 2 gr Solución sales de traza 1 mL Agar 20 gr</p>

	<p>Agua destilada 500 mL</p> <p>Solución sales de traza:</p> <p>CuSO₄ 5H₂O 0.64 gr / 0.1 L</p> <p>FeSO₄ 7H₂O 0.11 gr / 0.1 L</p> <p>MnCl₂ 4H₂O 0.72 gr / 0.1 L</p> <p>ZnSO₄ 7H₂O 0.15 gr / 0.1 L</p>
--	--

Anexo 3. Preparación de las soluciones para medio MS.

Solución	Componentes
<p>Macronutrientes</p> <p>10X por litro</p>	<p>NH₄NO₃ 16.5 gr</p> <p>KNO₃ 19 gr</p> <p>CaCl₂ 2H₂O 4.4 gr</p> <p>MgSO₄ 7H₂O 3.7 gr</p> <p>KH₂PO₄ 1.7 gr</p>
<p>Micronutrientes</p> <p>100X por 100 mL</p>	<p>H₃BO₃ 620.0 gr</p> <p>MnSO₄ 4H₂O 2.23 gr</p> <p>ZnSO₄ 7H₂O 910.0 gr</p> <p>KI 83.0 gr</p> <p>NaM₀O₄ 25.0 gr</p> <p>CuSO₄ 5H₂O 25.0 gr</p> <p>CaCl₂ 6H₂O 25.0 gr</p>

<p>Hierro quelante (Fe-EDTA) Por 250 mL</p>	<p>Na₂ EDTA 1.87 gr FeSO₄ 7H₂O 1.4 gr</p>
<p>Vitaminas Por 100 mL</p>	<p>Ácido nicotínico 50 mg Pirodoxina 50 mg Tiamina 50 mg</p>