



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO DE EDAFOLOGÍA

**Microorganismos cultivables de la filosfera, caulosfera y rizósfera de *Vanilla planifolia* recolectados de dos sistemas de acahual en Papantla, Veracruz**

YADIRA CORNEJO SILVA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016

---

La presente tesis titulada: “**Microorganismos cultivables de la filosfera, caulosfera y rizósfera de *Vanilla planifolia* recolectados de dos sistemas de acahual en Papantla, Veracruz**” realizada por el alumno: **Yadira Cornejo Silva** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS  
EDAFOLOGIA  
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

  
\_\_\_\_\_  
DR. ALEJANDRO ALARCÓN

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. ÁNGEL VILLEGAS MONTER

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. JOHN LARSEN

Montecillo, Texcoco, Estado de México, *Agosto* de 2016

**MICROORGANISMOS CULTIVABLES DE LA FILOSFERA, CAULOSFERA Y  
RIZÓSFERA DE *Vanilla planifolia* RECOLECTADOS DE DOS SISTEMAS DE  
ACAHUAL EN PAPANTLA, VERACRUZ**

Cornejo Silva Yadira, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2016

Este estudio determinó la población microbiana cultivable de la filosfera, caulosfera, rizoplasma y rizósfera de *Vanilla planifolia*, para detectar organismos benéficos en el crecimiento vegetal. La investigación se dividió en cuatro fases experimentales descritas en cuatro capítulos. El primer capítulo describe el aislamiento de la microbiota fúngica y bacteriana, en medios selectivos, a partir de plantas de vainilla recolectadas en dos sitios de cultivo en Papantla, Veracruz. El segundo capítulo hace referencia a la identificación tanto tradicional como molecular de los hongos endófitos de raíz y las bacterias productoras de índoles totales y solubilizadoras de fosfato. El tercer capítulo describe el comportamiento de los hongos aislados conjuntamente con bacterias, en dos medios de cultivo. El cuarto capítulo describe el efecto de las rizobacterias y los hongos endófitos fúngicos de raíz en el crecimiento y desarrollo vegetal de una planta modelo (rábano) y en plántulas de vainilla. El aislamiento y conservación de los hongos endófitos de raíz es difícil; sin embargo, se reportan por primera vez tres géneros que corresponden a los géneros *Exophiala* y a un consorcio *Paecilomyces-Verticillium*, cuyo crecimiento fue inhibido al interactuar con 21 bacterias, particularmente con el género *Pseudomonas*. *Exophiala* sp. promovió el desarrollo de rábano (*Raphanus sativus* L.), pero no estimuló el crecimiento vegetativo de plántulas de vainilla. Los microorganismos cultivables representan un potencial aprovechamiento biotecnológico dirigido al

cultivo de vainilla, pero es necesario evaluar a mayor profundidad, su interacción con plantas de vainilla.

**Palabras clave:** endófitos fúngicos, rizobacterias, ácido indolacético, solubilización de fósforo.

**CULTURABLE MICROORGANISMS FROM THE PHYLLOSPHERE,  
CAULOSPHERE AND RHIZOSPHERE OF *Vanilla planifolia* COLLECTED FROM  
TWO ACAHUAL CROPS IN PAPANTLA, VERACRUZ**

Cornejo Silva Yadira, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2016

This study determined the culturable microbial populations from the phyllosphere, caulosphere, rhizoplane, and rhizosphere of *Vanilla planifolia*, to obtain beneficial microorganismos on plant growth. The research was divided in four experimental stages described in four chapters. First chapter described the isolation of fungal and bacterial microbiota in selective media, from vanilla plants collected at two plantations in Papantla, Veracruz. Second chapter identified morphologically and molecularly, fungal root endophytes as well as indole acetic producing bacteria and phosphate solubilizing bacteria. Third chapter described the relationship between fungal endophytes and isolated bacteria in two culture media. Four chapter showed the effect of bacteria and endophytic fungi on plant growth of vanilla and *Raphanus sativus* as model plants. Isolation and maintenance of fungal endophytes is difficult; however, three fungal genera are reported for the first time in vanilla; the growth of *Exophiala* and a fungal consortium conformed by *Paecilomyces-Verticillium*, was inhibited by 21 bacterial strains, mainly *Pseudomonas*. *Exophiala* sp. promoted the growth of *R. sativus*, but did not stimulate the growth of vanilla plants. The culturable microorganisms represent a potential biotechnological approach directed to vanilla crops, but it is still necessary further evaluations for determining their interaction with vanilla plants.

**Key words:** fungal endophytes, rhizobacteria, indole acetic acid, phosphate solubilizers.

Dedico esta tesis a:

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados quienes han financiado la presente investigación.

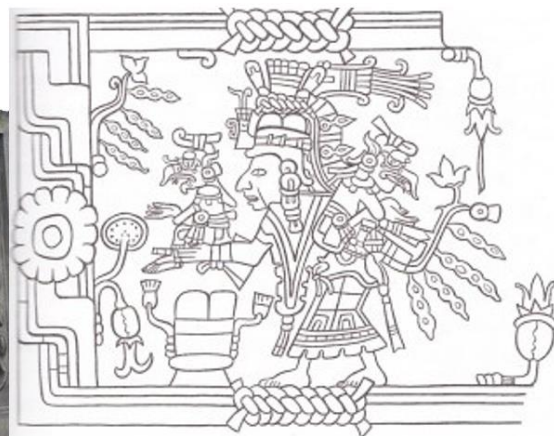
Las personas integrantes de mi Consejo Particular por el esfuerzo, la dedicación, el tiempo y el apoyo que me han brindado; así como a los profesores que he tenido en los distintos cursos del doctorado por su gran profesionalismo para inducirme a incrementar mi espíritu de investigadora.

Los campesinos vainilleros de Papantla, que contribuyeron enormemente para la realización de esta investigación. El amor y dedicación a su trabajo fueron fuente de continua inspiración.

Los compañeros de estudio doctoral y de departamento, así como al personal académico y administrativo del área por su constante apoyo.

Los amigos que me han acompañado en mi camino por la vida, sus palabras de ánimo fueron de gran importancia para continuar el presente trabajo.

Mi gran y hermosa familia por su apoyo moral brindado en todo momento e incentivar me a concluir con esta fase de mi carrera profesional.



## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	iv
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	x
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
Planteamiento del problema	2
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b>	4
Objetivo General	4
Objetivos Particulares	4
Hipótesis general	5
Hipótesis particulares	5
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	6
Efecto de la asociación de microorganismos fúngicos y bacterianos en las orquídeas	6
Microorganismos en orquídeas	6
Importancia del género <i>Vanilla</i>	7
Interacción micorrízica (orquídea-hongo)	10
Morfo-anatomía de interacción orquídea-hongo	12
Especificidad y función	16
Interacción orquídea-bacteria	17
Discusión de la literatura revisada y justificación de la investigación	21
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>Microorganismos cultivables de órganos aéreos y terrestres de <i>Vanilla planifolia</i> recolectadas en dos cultivos en acahual</b>	23
RESUMEN	23
ABSTRACT	24

INTRODUCCIÓN	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Propiedades físicas y químicas de los suelos de estudio	28
Aislamiento de bacterias, hongos y actinomicetos totales	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
Propiedades físicas y químicas de los suelos de estudio	32
Aislamiento de bacterias, hongos y actinomicetos totales	33
CONCLUSIONES	41
<b>CAPÍTULO V</b>	
<b>Caracterización de cepas bacterianas y fúngicas aisladas de <i>Vanilla planifolia</i>, y evaluación de su potencial biotecnológico</b>	42
RESUMEN	42
ABSTRACT	43
INTRODUCCIÓN	44
MATERIALES Y MÉTODOS	45
Caracterización de microorganismos	45
Caracterización enzimática	46
Identificación molecular	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
Caracterización de microorganismos	51
Caracterización enzimática	54
Identificación molecular	58
CONCLUSIONES	66
<b>CAPÍTULO VI</b>	
<b>Interacción de rizobacterias (productoras de ácido indolacético y solubilizadoras de fósforo) y hongos endófitos aislados de <i>Vanilla planifolia</i></b>	67
RESUMEN	67
ABSTRACT	68



INTRODUCCIÓN	69
MATERIALES Y MÉTODOS	70
Cultivos duales hongo <i>versus</i> bacterias	70
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
Cultivos duales hongo <i>versus</i> bacterias	71
CONCLUSIONES	78
<b>CAPÍTULO VII</b>	
<b>Comportamiento de la asociación o establecimiento de hongos endófitos aislados de raíz en plántulas de <i>Vanilla planifolia</i> en condiciones <i>in vitro</i></b>	79
RESUMEN	79
ABSTRACT	80
INTRODUCCIÓN	81
MATERIALES Y MÉTODOS	82
Ensayo con plántulas de <i>Vanilla planifolia</i>	83
Ensayo preliminares en plantas de interés hortícola	83
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
Ensayos con plántulas y semillas de <i>Vanilla planifolia</i>	85
Ensayos preliminares en plantas de interés hortícola	88
CONCLUSIONES	94
<b>CAPÍTULO VIII</b>	
<b>DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES</b>	95
LITERATURA CITADA	97
<b>ANEXO 1. Medios de cultivo y diluciones para el aislamiento de los microorganismos.</b>	120

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Morfología de la planta de vainilla. Tallo monopódico con el nodo con su hoja y su raíz adventicia, al lado derecho se observa la adhesión de la raíz al forofito (A). Flores de la vainilla (B y C), cuyo corte transversal muestran sus estructuras anatómicas (C). Una vez fecundada la flor se origina la vaina (D) que al madurar las semillas dentro de la vaina se tornan más oscuras (E); son subglobosas de color café oscuro o negro, vistas a 400X (F). (Fotografías: B, [http://grupogons.blogspot.mx/2011\\_06\\_01\\_archive.html](http://grupogons.blogspot.mx/2011_06_01_archive.html); C, <https://es.wikipedia.org/wiki/Vainilla#/media/File:VanillaFlowerLongitudinalSecciones.png> y E, <https://cilantroperonotanto.files.wordpress.com/2014/08/dsc2026.jpg>; A, D y F, Cornejo-Silva). 9
- Figura 2. Semillas de vainilla. Microfotografía de una semilla de vainilla (A). Gotas de aceite en las semillas (B). Germinación de las semillas in vitro (C). (Fotografías A y C tomadas de <http://www.foodnewslatam.com/paises/77-colombia/4418-la-vainilla-germina-m%C3%A1s-r%C3%A1pido-con-hongos.html>; B Cornejo-Silva) 10
- Figura 3. Microfotografía electrónica de barrido del desarrollo de la micorriza *Anoectochilus formosanus-Rhizoctonia*. La hifa (H) podría pasar a través de la pared celular (CW) en A, la forma de los pelotones (P) en BD dentro de las células corticales. Más tarde, el pelotón es digerido (en D). (Tomado de Chang y Chou, 2007). 13
- Figura 4. *Stanophea tigrina* madura sin flor (A), flor (B). Semilla (C) con embrión pequeño y carente de endospermo. Sección transversal de la raíz (D) con evidente formación de pelotones 14

en las células corticales (flecha). (Fotografías A, C y D de Cornejo-Silva y B, cortesía de Navarro E.)

- Figura 5. Ectomicorriza formada entre *Rhizanthella gardneri* y *Melaleuca scalena* (*Melaleuca uncinata* s.l.). Se observa, mediante la excavación parcial, la orquídea *R. gardneri* madura con flor (A); en la inserción la sección transversal de su rizoma con evidente formación de pelotones en las células corticales (flecha). Así como las raíces de *M. scalena* (B) ectomicorrizadas a partir de un aislado fúngico extraído de *R. gardneri* (RGBAB1), caracterizadas por su forma bulbosa y un manto fúngico de color oscuro. (Modificado de Bougoure et al., 2009). 15
- Figura 6. Población de bacterias, hongos y actinomicetos totales cultivables [unidades formadoras de colonias (UFC)] expresada en unidades logarítmicas, obtenida en tres microsítios A) rizósfera, B) rizoplano, C) caulósfera, y D) filosfera, de *Vanilla planifolia* cultivada bajo sistema tradicional de acahual. El asterisco indica diferencias significativas entre los sitios muestreados, Ejido 1° de Mayo y Cuyuxquihui, (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). n = 3; Medias + error estándar. 36
- Figura 7. Población de microorganismos cultivables totales con actividad fisiológica específica [unidades formadoras de colonias (UFC)] expresada en unidades logarítmicas, obtenida en tres microsítios A) rizósfera, B) rizoplano, C) caulósfera, y D) filosfera, de *Vanilla planifolia* cultivada bajo sistema tradicional de acahual. El asterisco indica diferencias significativas entre los dos sitios muestreados (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). n = 3; Medias + error estándar. 39
- Figura 8. Macrofotografías de tres colonias fúngicas aisladas a partir de los pelotones de *Vanilla planifolia*, después de 20 días de incubación a 28 °C en PDA 40

Figura 9.	Distribución de bacterias Gram en una planta de <i>Vanilla planifolia</i>	51
Figura 10	Cepa fotosintética aislada de la filosfera y caulosfera en medio Rennie (1981), A: macrofotografía de la colonia; microfotografías de la colonia “bacteriana”, se observan estructuras en forma de plumas en toda la circunferencia de la colonia (B, 200X), su asociación con la bacteria Gram positiva (C, 400X) cuya forma fue cocos (D, 1000X) y espículas de color verde (E, 600X)	52
Figura 11	Macro (A y C) y microfotografías (B: 100X y D: 60X) de dos colonias fúngicas aisladas a partir de los pelotones de <i>Vanilla planifolia</i> , después de 30 días de incubación a 28 °C en PDA. La barra representa 10 µm. (A-B) Género <i>Exophiala</i> (H1) y (B-C) consorcio fúngico de los géneros <i>Paecilomyces</i> y <i>Verticillium</i> .	54
Figura 12.	. Concentración (µg mL <sup>-1</sup> ) de la producción de ácido indolacético (AIA) con y sin triptófano (Trp), y solubilización de fosfato (P-solubilización) por bacterias aisladas de: A) rizósfera, B) rizoplano, C) caulosfera y D) filosfera de plantas de <i>Vanilla planifolia</i>	56
Figura 13.	Gel de agarosa al 1.2%, que muestra el perfil de tamaños en pb, de los amplicones obtenidos de la región 16S de ADN de las rizobacterias (carril 1-8, 10-13, 15) por PCR utilizando el marcador de peso molecular λPst1 (carril 9)	59
Figura 14.	Gel de agarosa al 1.2%, que muestra el perfil de tamaños en pb, de los amplicones obtenidos de la región 16S de ADN de las rizobacterias (carril 1, 3-20) por PCR utilizando el marcador de peso molecular λPst1 (carril 2)	60
Figura 15.	Gel de agarosa al 1.2%, que muestra el perfil de tamaños en pb, de los amplicones obtenidos de la región 16S de ADN de las rizobacterias (carril 1, 3-8) por PCR utilizando el marcador de peso molecular λPst1 (carril 2)	60

Figura 16	Gel de agarosa al 1.2% que muestra el perfil de tamaños en pb, de los amplicones obtenidos de la región ITS a partir de ADN de los hongos endófitos orquidoides por PCR utilizando el marcador de peso molecular $\lambda$ PstI.	64
Figura 17	Esquema para realizar los cultivos duales en cajas de Petri.	70
Figura 18.	Efecto de las rizobacterias en el crecimiento del género fúngico <i>Exophiala</i> sp. durante quince días de incubación a 28 °C a oscuridad y sembrados en los medios de cultivo Melin-Norkrans (A), o PDA (B)	73
Figura 19.	Efecto de las rizobacterias en el crecimiento del consorcio fúngico <i>Paecilomyces</i> - <i>Verticillium</i> sp. durante quince días de incubación, con dos medios de cultivo: Melin-Norkrans (A), o PDA (B)	74
Figura 20	Efecto de las rizobacterias en el crecimiento del género fúngico <i>Cordyceps</i> sp. durante quince días de incubación a 28 °C a oscuridad, en los medios Melin-Norkrans (A) y PDA (B).	75
Figura 21.	Efecto de las rizobacterias en el crecimiento del género fúngico <i>Beauveria</i> sp. durante quince días de incubación, con dos medios de cultivo: Melin-Norkrans (A y C), o PDA (B y D)	76
Figura 22.	Cultivos duales incubados a 28 °C durante 20 días. (Hongo endófito versus rizobacterias.paroductoras de ácido indolacético y solubilizadoras de fósforo) A – D: testigos fúngicos, E –G: hifas en contacto con las bacterias sin observarse cambios en la morfología e; I – L: inhibición del crecimiento hifal donde se observan modificaciones en la forma de la colonia en comparación al testigo, producción de metabolitos que forman un tipo de halo (K) o cambian la coloración del medio de cultivo (L)	77
Figura 23.	Esquema de los establecimiento de los tratamientos entre las semillas de rábano y los microorganismos inoculantes (hongos	84

	endófitos de raíz, o rizobacterias solubilizadoras de fósforo y productoras de ácido indolacético)	
Figura 24.	Microcosmos que muestran la interacción vainilla-endófito fúngico establecidos en frascos de 250 mL, después de ocho días de incubación (25±2 °C). A: Testigo, B: <i>Cordyceps</i> sp., C: Consorcio ( <i>Paecilomyces-Verticillium</i> ).	85
Figura 25	Raíces de <i>Vanilla planifolia</i> . A: Vista a 100 X proveniente de campo. Microfotografía de las raíces provenientes de los cultivos in vitro con el testigo (no inoculado), y con las cepas fúngicas endófitas aisladas de vainilla: <i>Exophiala</i> sp. (C) y consorcio ( <i>Phaeoacremonium-Verticillium</i> ) (D). B: 400X, C y D: 600X. La barra indica 10 µm	87
Figura 26.	Efecto de los endófitos fúngicos de raíz, en el peso seco total de plantas de vainilla, en comparación a un testigo (sin inocular), después de 15 días de la inoculación. n = 7. Medias + error estándar.	88
Figura 27.	Efecto de los endófitos fúngicos de raíz, en la longitud total de plantas de vainilla, en comparación a un testigo (sin inocular), después de 15 días de la inoculación. Las letras sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$ ); n = 10. Medias + error estándar.	89
Figura 28	Efecto de las rizobacterias en la longitud del rábano ( <i>Raphanus sativus</i> L.), a 15 días de su inoculación bajo temperatura ambiente en comparación a un testigo (sin inocular). Las letras diferentes sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$ ); n =10. Medias + error estándar.	89
Figura 29	Efecto de los endófitos fúngicos de raíz, en el peso fresco total de plantas de vainilla, en comparación a un testigo (sin inocular), después de 15 días de la inoculación. Las letras diferentes	90

	sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$ ); n = 10. Medias + error estándar.	
Figura 30	Efecto de las rizobacterias en el peso fresco de rábano ( <i>Raphanus sativus</i> L.), a 15 días de su inoculación bajo temperatura ambiente en comparación a un testigo (sin inocular). Las letras diferentes sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$ ); n =10. Medias + error estándar.	91
Figura 31	Efecto de los endófitos fúngicos de raíz, en el peso seco total de plantas de vainilla, en comparación a un testigo (sin inocular), después de 15 días de la inoculación. Las letras diferentes sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$ ); n = 10. Medias + error estándar	91
Figura 32	Efecto de las rizobacterias en el peso seco total de rábano ( <i>Raphanus sativus</i> L.), a 15 días de su inoculación bajo temperatura ambiente en comparación a un testigo (sin inocular). Las letras diferentes sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $\alpha=0.05$ ); n =10. Medias + error estándar	92
Figura 33	Ensayos en microcosmos con semillas de rábano y las capas bacterianas. Izquierda: observación macroscópica después de 15 días, a la derecha: observación microscópica a 120 X. A: Testigo, B – H: efecto de las cepas bacterianas en el desarrollo de las plántulas. B: 2 RzVpV; C: 40 RzsVpV; D: 14 RzVpV; E: 24 RzVpV; F: 32 RzsVpV; G: 34 RzsVpV; H: 10 RzVpV.	93

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Taxones del grupo Basidiomycota encontrados en las orquídeas	11
Cuadro 2.	Bacterias aisladas en orquídeas y efectos en la estimulación de la germinación de semillas	19
Cuadro 3.	Localización y características de los vainillales cultivados bajo sistema de acahual en Papantla, Veracruz	27
Cuadro 4.	Resultados del análisis físico y químico de los suelos en los dos vainillales de Papantla, Veracruz	33
Cuadro 5.	Actividad enzimática, pH al que trabaja y morfología bacteriana	57
Cuadro 6.	Actividad enzimática, pH al que trabaja las cepas endófitas fúngicas aisladas.	58
Cuadro 7.	Resultados del Blast realizado en el GenBank de la región 16S de las muestras de bacterias	62
Cuadro 8.	Resultados de la identificación molecular de muestras de hongos endófitos orquidioides mediante la comparación de secuencias ITS	66
Cuadro 9.	Claves de las rizobacterias empleadas en las inoculaciones en semillas de rábano	84



## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

Todas las plantas tienen microorganismos viviendo sobre ellas (epífitos) o dentro de sus tejidos (endófitos), los cuales pueden ser residentes o transitorios. De los cuales, los microorganismos residentes principales que conforman la microbiota nativa, puede o no estar fuertemente asociados con la planta y favorecer en su adaptación, actividad nutrimental y de protección (Selosse, 2010).

Dentro de los microorganismos que se pueden encontrar en las plantas están las bacterias, actinomicetos, hongos, protozoos, etc., los cuales cumplen una función fundamental en los procesos biogeoquímicos y edafogénicos. Las bacterias conforman el grupo más abundante, éstas colonizan a la planta en forma sucesiva con base a su ciclo fenológico y pueden ser parásitas, comensales o mutualistas, su número dependerá de los factores abióticos en los cuales la planta se desarrolle (Danhorn y Fuqua, 2007; Osorio *et al.*, 2008; Marschner, 2012). El segundo grupo más abundante corresponde a los hongos, los cuales se encuentran en su mayoría formando parte de la biota en el suelo, y algunos otros endófitos parásitos o simbioses (Hawksworth, 2001).

Sin embargo, aunque los microorganismos se encuentran en todos los órganos de la planta, su estudio ha sido marginado a aquellos que se encuentran en la rizósfera (Tejera-Hernández *et al.*, 2013). Los resultados demuestran una gran variedad de microorganismos benéficos, determinantes para la salud de la planta y la fertilidad del suelo, participando también en muchos procesos clave del ecosistema (Nannipieri *et al.*, 2003). La identificación de estos microorganismos ha dado pauta a la generación de estrategias para la producción sostenible de la vaina, libre de agroquímicos y garantizando un producto orgánico de mejor competencia en el mercado (Mosquera-Espinosa *et al.*, 2012; Jiménez-Quesada *et al.*, 2015).

Para el caso de los vainillales se ha visto que las especies del género *Rhizoctonia* forman simbiosis rizosférica con la planta; sin embargo, aún se desconoce el mecanismo funcional de estos. Los estudios hasta el momento están relacionados con los problemas fitopatológicos a nivel de raíz, tallo, hoja y fruto, encontrándose como agentes causales de dichos problemas, a especies fúngicas como *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora meadii*, *Sclerotium rolfsii*, *Callospora vanillae*, *Colletotrichum vanilla*, *C. gloesporoides* y *Cylindrocladium quinquiseptatum* que se presentan principalmente por las condiciones climatológicas en la época de lluvias (Cardona *et al.*, 2012; Thomas y Bhai, 2000; Xiong *et al.*, 2016 ). Estos hongos causantes de enfermedades pueden ser controlados por fungicidas, y por agentes biológicos como *Actinomycetes* spp., *Trichoderma harzianum*, *Penicillium striatisporum*, *Verticillium lecanii*, *Chaetomium globosum*, *Chaetomium cochliodes*, *Emericella varicolor* y *E. nidulans*; así como por algunas bacterias endófitas. Otras enfermedades que se presentan en la vainilla son de tipo viral, causadas por *Cucumovirus* y *Potyvirus* (Pinaría *et al.*, 2010; Talubnak y Soyong, 2010; Marín *et al.*, 2012, Jiménez-Quesada *et al.*, 2015).

### **Planteamiento del problema**

La orquídea *Vanilla planifolia* (Jacks, ex Andrews) es la única de gran interés en diversas industrias, por lo cual ha surgido la necesidad de crear paquetes biotecnológicos que sean más generosos con el ambiente y que garanticen una mejor comercialización del producto, debido a que en Europa la vainilla de origen orgánico es altamente demandada (Jaramillo, 2012; Jaramillo *et al.*, 2013). Sin embargo, debido a que ésta orquídea se propaga por esqueje, la planta es susceptible a diversas enfermedades; de ahí la importancia de comprender inicialmente, la interacción planta y microorganismo, ya que la escasa información sobre la riqueza biológica y genética microbiana del vainillal, misma que tiene potencial enorme en la generación de paquetes biotecnológicos que no

perjudiquen el equilibrio ecológico del cultivo; además de contribuir con el problema socioeconómico que enfrenta el cultivo, mediante la disminución de las aplicaciones de fungicidas (para el control de patógenos, particularmente de los géneros *Fusarium* y *Colletotrichum*), y de fertilizantes que están causando problemas ecológicos en los sistemas (Adame *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2012).

Por ello, la presente investigación tiene como finalidad conocer la microbiota fúngica y bacteriana cultivable que se encuentra en la filosfera, caulosfera, rizoplano, y rizósfera de vainilla, lo cual en nuestro país, ha sido poco estudiado.

## CAPÍTULO II

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### Objetivo General

Conocer la población de la microbiota cultivable existente en la filosfera, caulosfera, rizoplano y rizósfera de *Vanilla planifolia* para discernir si son organismos benéficos y/o simbióticos mutualistas, y con potencial para estimular el crecimiento vegetal.

#### Objetivos Particulares

- Conocer la microbiota fúngica y bacteriana de la vainilla a partir de muestras de la parte aérea y terrestre provenientes de dos sitios de cultivo tradicional.
- Evaluar la actividad fisiológica de las cepas bacterianas y fúngicas endófitas aisladas para seleccionar microorganismos con potencial biotecnológico; y así realizar su identificación taxonómica mediante herramientas tradicionales y moleculares.
- Confrontar cepas bacterianas con hongos endófitos para determinar su compatibilidad al inocularlas de manera combinada.
- Realizar bioensayos *in vitro* con plántulas de *Vanilla planifolia* y los hongos endófitos para determinar si existe una asociación o estímulo del crecimiento vegetal.

## **Hipótesis general**

La microbiota bacteriana y fúngica cultivable de la rizósfera, caulósfera y filosfera de *Vanilla planifolia*, tendrá un microorganismo cuyo comportamiento mutualista o simbiótico, estimulará el crecimiento vegetal.

## **Hipótesis particulares**

- Será posible conocer la microbiota bacteriana y fúngica de la vainilla a partir de muestras de la parte aérea y terrestre de vanillales de Veracruz; al menos una cepa fúngica endófito y algunas bacterianas se podrán mantener en cultivo bajo condiciones de laboratorio, para usos en la presente investigación.
- Las cepas microbianas aisladas tendrán la capacidad de producir ácido indolacético y solubilizar el fósforo y al menos una pertenecerá al género *Bacillus* o *Pseudomonas*.
- Se obtendrán cepas compatibles (mutualistas) de rizobacterias y hongos endófitos de raíz que en cultivos duales crezcan en el mismo espacio sin afectar su crecimiento.
- De las pruebas con los endófitos fúngicos de la raíz (posibles simbioses) y las bacterias con potencial biotecnológico se obtendrán beneficios en el desarrollo vegetativo de vainilla a nivel de microcosmos.

## CAPÍTULO III

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### **Efecto de la asociación de microorganismos fúngicos y bacterianos en las orquídeas**

##### **Microorganismos en orquídeas**

Entre la microbiota asociada a las plantas, los hongos y las bacterias destacan por su abundancia, encontrándose asociados en diferentes órganos (hojas, tallos, raíces y suelo) los cuales pueden ser residentes o transitorios. Los microorganismos más estudiados son aquellos de la rizósfera, debido a que es la zona de mayor actividad metabólica porque la raíz de la planta libera en forma de mucílago compuestos orgánicos como azúcares, aminoácidos, vitaminas, proteínas, ácidos grasos, nitrógeno y fósforo, así como metabolitos secundarios (flavonoides) (Bogino *et al.*, 2013). Generalmente el mucílago cercano a la raíz está formado por compuestos orgánicos y metabolitos que provienen de la misma planta o de otros materiales (residuos vegetales o microbianos), que promueven o inhiben el crecimiento de hongos, bacterias y nemátodos (Griffiths *et al.*, 2007).

El mucílago influye en los procesos bioquímicos de las plantas, favoreciendo su crecimiento y protegiendo a la planta de patógenos; por lo cual, la comprensión entre sus diferentes interacciones son una fuente de aprovechamiento biotecnológico para lograr una sustentabilidad en el uso de la misma, destacándose dentro de las plantas ornamentales las orquídeas (Andreote, 2014).

Las orquídeas por su alto valor comercial (Munguía-Lino *et al.*, 2010), debido a su uso en diversas y variadas industrias, han sido sujetas de continuo saqueo de individuos silvestres, lo cual ha causado que la mayoría de las especies de orquídeas estén en algún estatus de protección (Luyando-Moreno *et al.*, 2011), aunado a los problemas causados por deforestación, contaminación e incendios.

Las orquídeas representan el 10% de las angiospermas y pertenecen a la familia Orchidaceae, la cual se considera una de las más diversas en el mundo con aproximadamente 25,000 especies (Jones, 2006; Chase *et al.*, 2015). Estas especies están distribuidas en todo el planeta, excepto en la Antártida (Whigham *et al.*, 2008), 1106 especies y subespecies de orquídeas se encuentran distribuidas en México con 159 géneros, de las cuales 444 especies y subespecies son endémicas, representando 40% de los taxos registrados en el país (Zambrano *et al.*, 2007).

De acuerdo con la norma NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010) los géneros de orquídeas que se encuentran en protección son: *Acianthera*, *Anathallis*, *Barkeria*, *Bletia*, *Chysis*, *Clowesia*, *Cuitlauzina*, *Dignathe*, *Encyclia*, *Epidendrum*, *Euchile*, *Govenia*, *Habenaria*, *Hagsatera*, *Kraenzlinella*, *Laelia*, *Lepanthes*, *Malaxis*, *Maxillaria*, *Mexipedium*, *Mormodes*, *Nemaconia*, *Oncidium*, *Pachyphyllum*, *Papperitzia*, *Physogyne*, *Pleurothallis*, *Ponthieva*, *Prosthechea*, *Pseudocranichis*, *Rhynchostele*, *Rodriguezia*, *Rossioglossum*, *Schiedella*, *Sigmatostalix*, *Stanhopea*, *Stelis*, *Trichocentrum* y *Vanilla*, éste último género con representantes endémicos. Aun cuando existen diversos programas para su conservación (reintroducción) o aprovechamiento sustentable (uso comercial), la mayoría de las orquídeas tienen escasa capacidad de germinación de semillas debido a la disminución en su viabilidad con respecto al tiempo transcurrido después de la polinización (Alegría, 2001; Nurse y Cavers, 2008). Además, mediante el cultivo de tejidos con el cual se obtienen sólo clones, se favorece la erosión genética (Rivas, 1998). En otros casos, la supervivencia de las orquídeas al momento de su aclimatación o reintroducción, es baja (Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea, 2007).

### **Importancia del género *Vanilla***

Este género pertenece al orden Asparagales de la familia Orchidaceae (Ploetz, 2007) con 110 especies registradas, de las cuales sólo tres son cultivadas comercialmente: *Vanilla thaihiensis*, *V.*

*pompona* y *V. planifolia*. Esta última, *V. planifolia*, es la principal fuente comercial de vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído), compuesto obtenido de las bayas, el cual se ha transformado en uno de los saborizantes naturales más importantes y caros del mundo (Bonfil, 1988). La vainillina se emplea en diversas industrias que van desde la alimentaria, licorera, refresquera, farmacéutica, cosmética y tabacalera; por lo que la vainilla se considera un cultivo con alto valor agregado (Anandan, 2004).

*Vanilla planifolia* es una orquídea hemiepífita perenne no saprofítica endémica de Centroamérica y de la región del Totonacapan en México (Veracruz y Puebla), cuyas condiciones climáticas son ideales para su crecimiento (temperatura media anual de 25°C y mínima de 12°C, con una precipitación pluvial de 1,000 mm, y una latitud Norte de 21°). Esta orquídea se cultiva y explota en los estados de Chiapas, Hidalgo, San Luis Potosí, Querétaro, Oaxaca, Michoacán, Tabasco y Quintana Roo (García-Cruz y Sosa, 1998; Arzani y González, 2007; Benavides *et al.*, 2010).

La vainilla es una planta de actividad fotosintética CAM, tallo monopódico (simple o ramificado) verde, suculento, cilíndrico y sarmentoso, con entrenudos de 10 a 15 cm de largo y de 10 a 15 mm de diámetro. En cada nodo se produce una sola hoja junto con un par (generalmente) de raíces adventicias carnosas y largas, que le sirven a la orquídea para adherirse al forofito o enrejado, y algunas veces son fotosintéticamente activas (Gehring *et al.*, 1998) (Fig. 1A). Sus flores son de color amarillo-verdosas (Fig. 1B y C), cada flor fecundada desarrolla un fruto en forma de vaina (Fig. 1D) en el cual se encuentran aproximadamente entre 70 a 90x10<sup>3</sup> de minúsculas semillas rudimentarias subglobosas de color café oscuro o negro (Castillo y Engleman, 1993; Benavides *et al.*, 2010) (Fig. 1E y F) con una longitud y ancho promedio de 312 y 260 µm con puntos de mayor espesor, de la cual es extraída la vainillina cuya cantidad varía de acuerdo al tiempo de maduración de la vaina (Palama *et al.*, 2009).



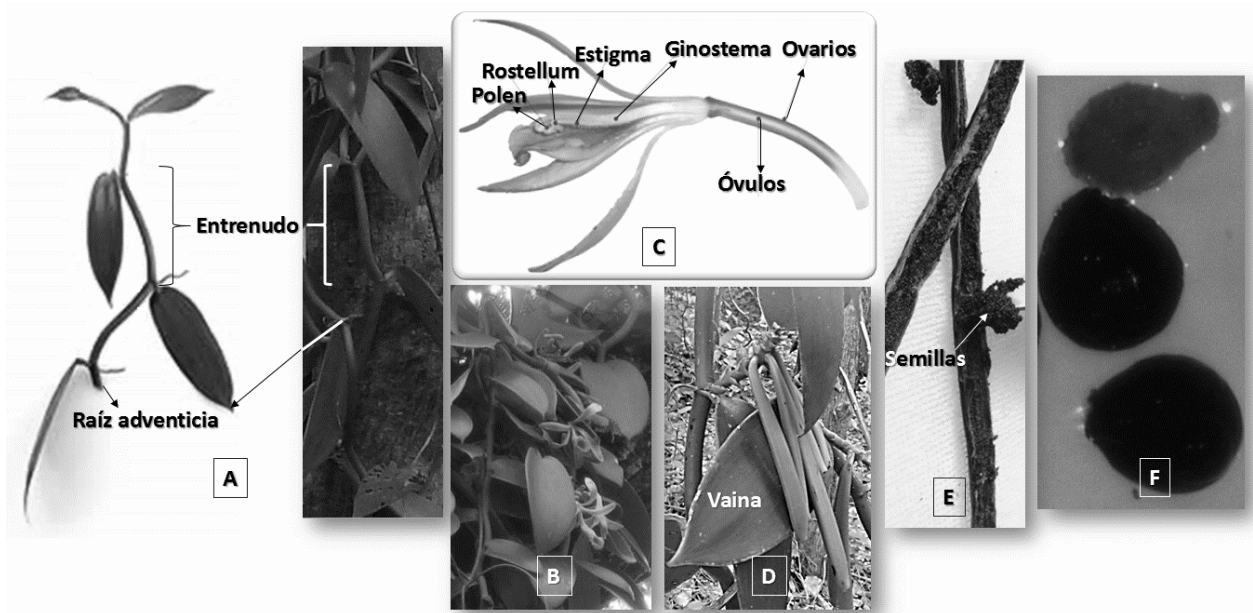


Figura 1. Morfología de la planta de vainilla. Tallo monopódico con el nodo con su hoja y su raíz adventicia, al lado derecho se observa la adhesión de la raíz al forofito (A). Flores de la vainilla (B y C), cuyo corte transversal muestran sus estructuras anatómicas (C). Una vez fecundada la flor se origina la vaina (D) que al madurar las semillas dentro de la vaina se tornan más oscuras (E); son subglobosas de color café oscuro o negro, vistas a 400X (F). (Fotografías: B, [http://grupogons.blogspot.mx/2011\\_06\\_01\\_archive.html](http://grupogons.blogspot.mx/2011_06_01_archive.html); C, <https://es.wikipedia.org/wiki/Vanilla#/media/File:VanillaFlowerLongitudinalSecciones.png> y E, <https://cilantroperonotanto.files.wordpress.com/2014/08/dsc2026.jpg>; A, D y F, Cornejo-Silva).

La germinación de las semillas se inhibe de manera natural por el endurecimiento de la testa y secreción de aceites (Fig. 2 A y B), además de que contienen embriones indiferenciados carentes de endospermo y cotiledones (Parra, 1987), los cuales deben crecer hasta romper la testa e iniciar la etapa de protocormo. Las células del protocormo poseen granos de almidón que sólo se encuentran en las primeras células después de la cubierta de la semilla y desaparecen durante la diferenciación meristemática (Philip y Nainar, 1988). De ahí que la orquídea requiera establecer la relación simbiótica o parasítica con el hongo, el cual absorbe y transloca nutrimentos tales como carbohidratos, minerales, vitaminas, hormonas y aminoácidos, para contribuir con la diferenciación meristemática foliar y radicular (Rasmussen y Rasmussen, 2007; Whigham *et al.*, 2008) (Fig. 2 C).

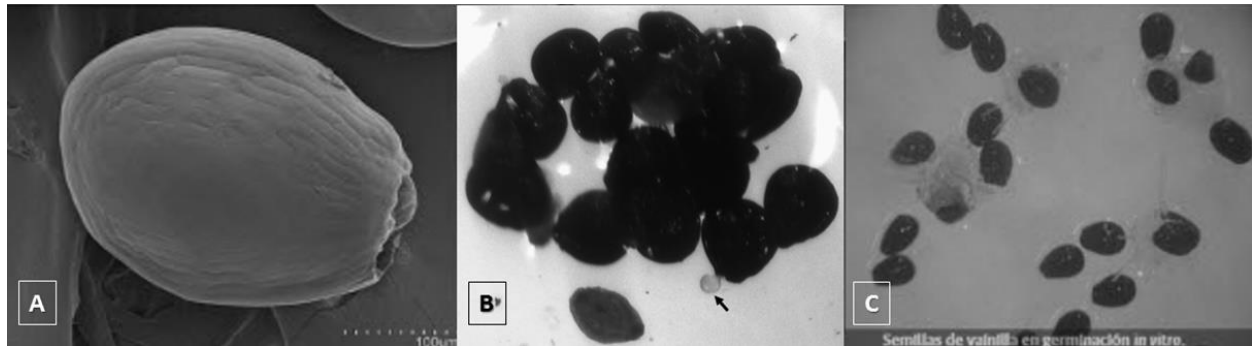


Figura 2. Semillas de vainilla. Microfotografía de una semilla de vainilla (A). Gotas de aceite en las semillas (B). Germinación de las semillas *in vitro* (C). (Fotografías A y C tomadas de <http://www.foodnewslatam.com/paises/77-colombia/4418-la-vainilla-germina-m%C3%A1s-r%C3%A1pido-con-hongos.html>; B Cornejo-Silva).

Sin embargo, debido al tiempo que se requiere para tener una planta adulta (4 años) para el establecimiento del cultivo, se emplean esquejes de entre 3-5 entrenudos, lo que conlleva a la degradación genética de la orquídea al propagarse clonalmente (Soto-Arenas y Cribb, 2010; Soto-Arenas y Dressler, 2010).

### **Interacción micorrízica (orquídea-hongo)**

La interacción micorrízica en orquídeas (mutualista) fue observada por primera vez por Noël León Bernard en 1899 en raíces de *Neottia nidus-avis*; ahora se sabe que la germinación se debe a la simbiosis con los hongos del orden Sebaciales (Selosse *et al.*, 2011).

Aunque los hongos que se asocian con las orquídeas son septados y, generalmente, provienen del suelo; ciertamente no se sabe el por qué son endófitos. Algunas de las hipótesis que se destacan sobre el cómo surge esta asociación endófito son: i) los organismos pueden estar presentes o asociados desde la semilla, los cuales provienen de la rizósfera, de la microflora del filoplano o ii) del material utilizado para la propagación vegetativa en donde pueden penetrar por estomas, heridas o áreas donde emergen las raíces laterales (Pérez *et al.*, 2009). Esta última hipótesis se sustenta en las estrategias tróficas que poseen los hongos (saprobios, mutualistas o parásitos) tales como

enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular de las células vegetales; además de los mecanismos de colonización y actuando de acuerdo a las condiciones bióticas y abióticas (Finlay, 2008; Pérez *et al.*, 2009; Mosqueira, 2010).

Los micobiontes pertenecen a los grupos: Ascomycota y Basidiomycota (Cuadro 1); sin embargo, la taxonomía y sistemática de estos hongos son hechas a base de sus fases asexuales (anamorfos) debido a que las fases sexuales (teleomorfos) son raramente encontradas en el campo o en el laboratorio (Jacquemyn *et al.*, 2011). Por lo anterior se utiliza el análisis molecular, como el análisis comparativo de las secuencias de regiones génicas de rADN, tales como la región ITS, para diferenciar géneros y especies fúngicas (Pelegriño y Bellusci, 2009; Boldrini *et al.*, 2010; Jacquemyn *et al.*, 2011). Los resultados sugieren que son muchos taxones de hongos que forman simbiosis con las orquídeas; sin embargo, se debe considerar el hecho de que los endófitos fúngicos sólo se han investigado en una pequeña proporción de especies de orquídeas y en limitados hábitats.

**Cuadro 1.** Taxones del grupo Basidiomycota encontrados en las orquídeas.

Heterobasidiomycetes			Homobasidiomycetes	
Orden	Género		Orden	Género
	Anamorfo	Teleomorfo		
	<i>Ceratorhiza</i>	<i>Ceratobasidium</i>	Gloeocystidiales	<i>Russula</i>
Ceratobasidiales	<i>Moniliopsis</i>	<i>Oliveonia</i> <i>Thanatephorus</i>	Hymenochaetales	<i>Erythromyces</i>
Tulasnellales	<i>Epulorhiza</i>	<i>Tulasnella</i>	Thelephorales	<i>Telephora</i> <i>Tomentella</i>
Auriculariales		<i>Sebacina</i>	Agaricales	<i>Armillaria</i> <i>Mycena</i>

Adaptado de Rasmussen (2002); Saunders y Owens (1998); Brundett (2002); Bougoure *et al.* (2007); Porrás-Alfaro y Bayman (2007); Agustini *et al.* (2009); Honrubia (2009).

## **Morfo-anatomía de interacción orquídea-hongo**

Los hongos compatibles con las orquídeas, pueden infectar a una semilla mediante tres formas: i) atravesando la testa de la semilla o por los rizoides, ii) por la micropila o iii) por grietas en el tegumento. Después de entrar en la semilla, la hifa se mueve por atracción hasta el suspensor, sitio donde hay abundantes sustancias fenólicas durante la imbibición; para posteriormente invadir la célula vegetal sin romper la membrana plasmática, crecer dentro de la célula y formar estructuras globosas, comúnmente conocidas como pelotones (Rivas *et al.*, 1998; Rasmussen y Rasmussen, 2009; Muthukumar *et al.*, 2011). En seguida se dan sucesivas divisiones celulares, el embrión crece y aumenta en volumen, originando el protocormo cuyo desarrollo muestra los siguientes eventos: i) aumento del volumen nuclear, ii) alteraciones en el citoesqueleto y iii) el desencadenamiento de varios ciclos en la síntesis de ADN en la célula hospedera. Posteriormente, el diámetro de las hifas disminuye, y pasan de célula a célula por la producción de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular.

Después de la formación del protocormo, los primeros pelotones formados pasan por el proceso de degradación, para prevenir de daños en el citoplasma del hospedero, las hifas del pelotón lisadas son aisladas por sintatos de la pared celular del hospedero, más tarde, la célula vegetal puede ser colonizada más de una vez por las hifas de los hongos (Fig. 3). En estado adulto (Fig. 4), generalmente, los hongos se encuentran en las raíces a nivel de las células corticales después de las células del velamen (Chang y Chou, 2007; Porrás-Alfaro y Bayman, 2007; Boldrini *et al.*, 2010); el pelotón se separa de la célula cortical mediante la membrana perifúngica (Boldrini *et al.*, 2010). Esta micorriza histológicamente, de manera visual, parece al tipo “Paris” de la micorriza arbuscular (Rasmussen y Rasmussen, 2009).

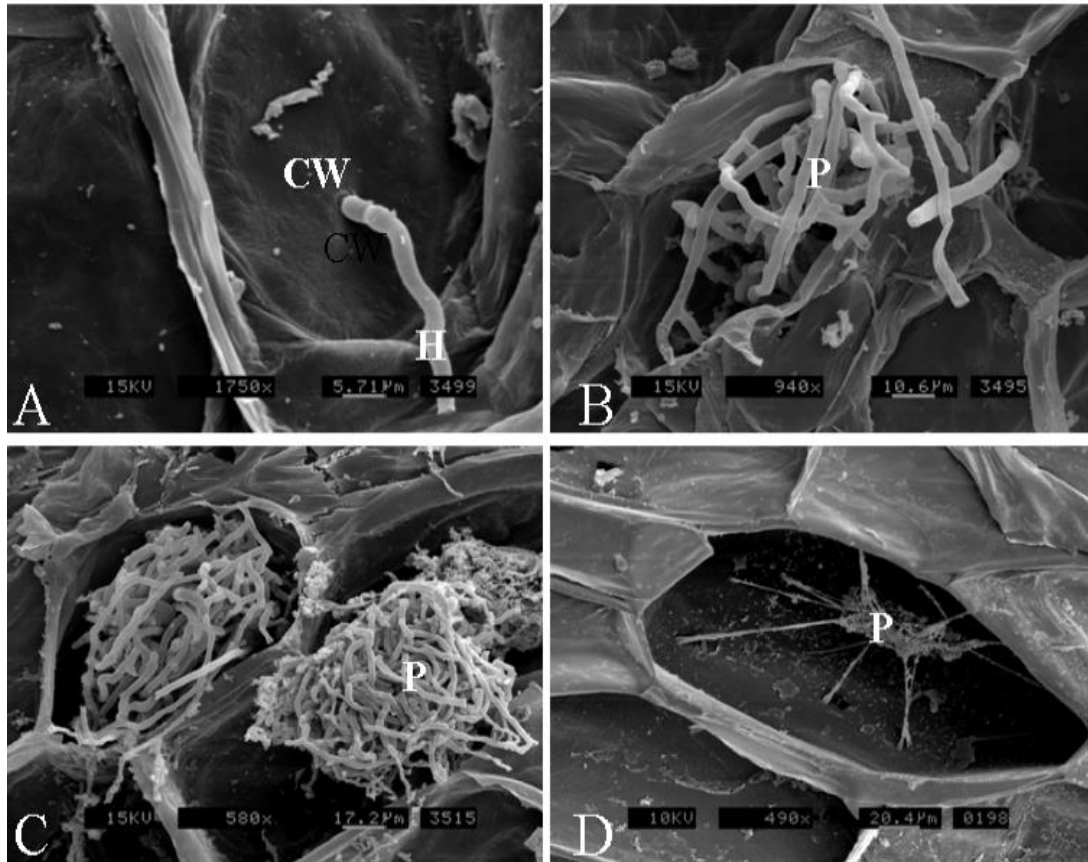


Figura 3. Microfotografía electrónica de barrido del desarrollo de la micorriza *Anoectochilus formosanus-Rhizoctonia*. La hifa (H) podría pasar a través de la pared celular (CW) en A, la forma de los pelotones (P) en BD dentro de las células corticales. Más tarde, el pelotón es digerido (en D). (Tomado de Chang y Chou, 2007).

El grado de asociación del micobionte con la orquídea varía de acuerdo con la capacidad fotosintética de la planta; con la estación en la que se realicen los estudios y los factores ambientales (Beltrán-Nambo *et al.*, 2012). Las orquídeas fototróficas terrestres dependen al inicio de su ciclo de vida del micobionte que provee el agua (Yoder *et al.* 2000, 2010), los carbohidratos y minerales (nitrógeno y fósforo) que requieren para la germinación de las semillas, y para el desarrollo del protocormo (fase subterránea), (Trudel *et al.*, 2003; Cameron *et al.*, 2006). La simbiosis prevalece

o no, cuando la orquídea se vuelve autótrofa (comienzo de su actividad fotosintética), aunque aún es poco claro (Lee, 2002; Brundett, 2006; Dearnaley, 2007; Swarts y Dixon, 2009).

La mayoría de las orquídeas fototróficas permiten el ingreso de una amplia gama de micobiontes con la finalidad de que se establezca el que mejor convenga de acuerdo a los factores ambientales donde se desarrollen; sin embargo, tiene un hongo micorrízico dominante (McCormick *et al.*, 2006; Dearnaley y Le Brocque, 2006).

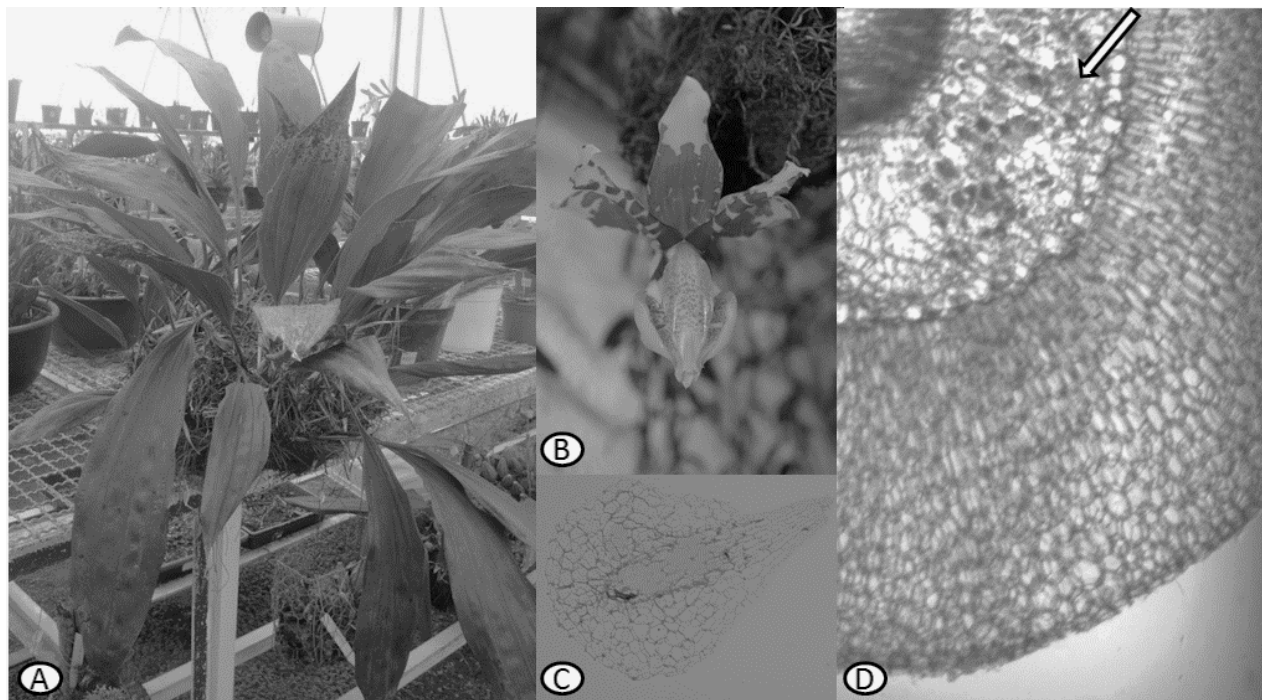


Figura 4. *Stanophea tigrina* madura sin flor (A), flor (B). Semilla (C) con embrión pequeño y carente de endospermo. Sección transversal de la raíz (D) con evidente formación de pelotones en las células corticales (flecha). (Fotografías A, C y D de Cornejo-Silva y B, cortesía de Navarro E.)

Existe una relación directa entre la distribución y especificidad fúngica con la rareza de las orquídeas (Bonnardeaux *et al.*, 2007). La distribución de las orquídeas depende de la necesidad de luminosidad, de condiciones climáticas y nutrimentales, siendo estos últimos los determinantes para

el crecimiento del hongo micorrízico y de la orquídea (Jersáková y Malinová, 2007; González *et al.*, 2007).

Las orquídeas sin clofófila son micotróficas y requieren al micobionte a lo largo de su ciclo de vida por carecer de la capacidad de satisfacer sus necesidades de carbono (Honrubia, 2009; Schotz *et al.*, 2010; Hashimoto *et al.*, 2012). Algunos autores sugieren que el hongo determina la estabilidad de la simbiosis y activación de la producción de fitoalexinas (Pérez *et al.*, 2002), lo cual provee protección contra la herbivoría (Schulz y Boyle, 2005) por lo que garantiza la supervivencia de las plántulas (Chang, 2007), incluso que estos hongos están asociados tróficamente a otros hospedantes pudiendo comportarse como ectosimbionte (Fig. 5) (Bougoure *et al.*, 2009).

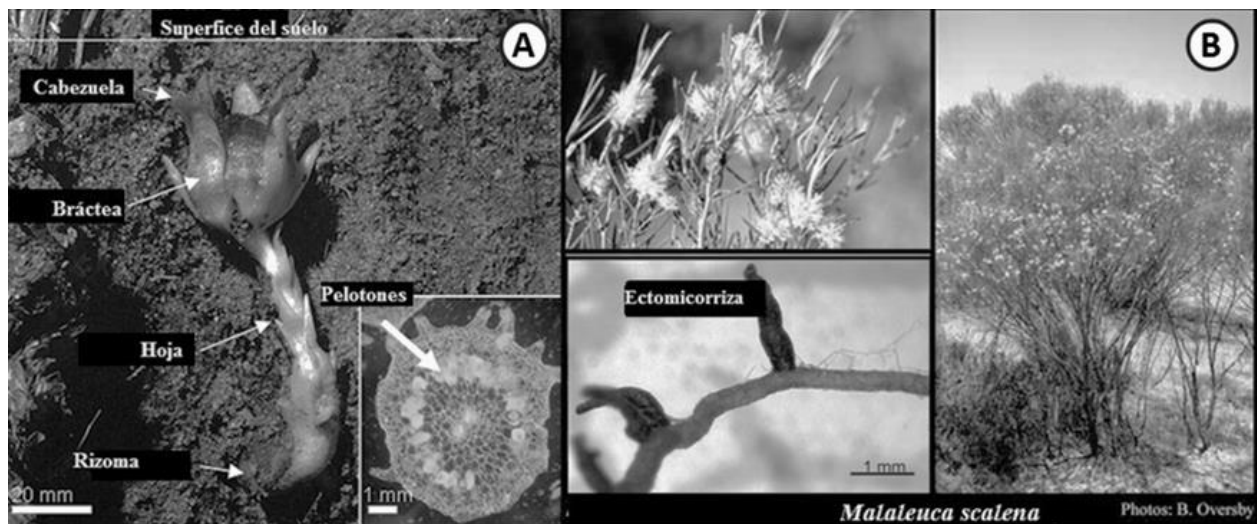


Figura 5. Ectomicorriza formada entre *Rhizanthella gardneri* y *Melaleuca scalena* (*Melaleuca uncinata* s.l.). Se observa, mediante la excavación parcial, la orquídea *R. gardneri* madura con flor (A); en la inserción la sección transversal de su rizoma con evidente formación de pelotones en las células corticales (flecha). Así como las raíces de *M. scalena* (B) ectomicorrizadas a partir de un aislado fúngico extraído de *R. gardneri* (RGBAB1), caracterizadas por su forma bulbosa y un manto fúngico de color oscuro. (Modificado de Bougoure *et al.*, 2009).

## Especificidad y función

Los estudios que han tratado de dilucidar los beneficios de los hongos endófitos han demostrado que existe cierta especificidad (Yuan *et al.*, 2010; Jacquemyn *et al.*, 2011), la cual varía entre la especie del hospedante y el hábitat. En algunos casos, no solo proporcionan los elementos esenciales para su desarrollo, sino también representan una fuente de resistencia a la desecación (Cameron *et al.*, 2006; Whigham *et al.*, 2008; Rasmussen y Rasmussen, 2009). Para el caso de *Vanilla planifolia*, especie de interés para este trabajo, se reporta comúnmente el género *Rhizoctonia*; sin embargo, no se conoce si esta orquídea está más estrechamente relacionada con los grupos saprófitos o parásitos de dicho género y si existe alguna especificidad con otros géneros fúngicos (Porrás-Alfaro y Bayman, 2007; Agustini *et al.*, 2009; Honrubia, 2009).

Otros estudios han demostrado que tal relación simbiótica mejora: el crecimiento (vegetativo y reproductivo), la supervivencia de las plántulas, la inducción de floración temprana y el aumento de la calidad de la flor (Pérez *et al.*, 2002; Chang, 2007). De acuerdo a los resultados de los estudios realizados, los hongos que forman simbiosis con las orquídeas son: *Eupolorhiza*, *Ceratorhiza*, *Habenaria* y *Mycena*, dichos hongos estimulan la germinación, nutrición y crecimiento de numerosas orquídeas de los géneros *Anoectochilus*, *Arundina*, *Changnienia*, *Cemastra*, *Cymbidim*, *Blettia*, *Dendrobium*, *Doritaenopsis*, *Epigenium*, *Gostrodia*, *Haemaria*, *Liparis*, *Paphiopedilum*, *Phalaenopsis*, *Pleione*, *Spiranthes*, *Spathoglottis*, *Vanda*. En estas orquídeas, resaltan los hongos pertenecientes al grupo *Rhizoctonia* que en combinación con fuentes de carbono y fósforo tienen un efecto positivo no sólo en la germinación, sino también en la sobrevivencia de las plántulas al momento del trasplante, en la estimulación del crecimiento vegetativo y reproductivo, y en conferir resistencia a enfermedades provocadas por virus (Ek *et al.* 1983; Ramos *et al.* 2007; Tsavkelova *et al.* 2007). Chang y Chou (2007) observaron que las plantas de *Anoectochilus formosanus* micorrizadas con dos cepas de *Rhizoctonia* (R02 y R04) mostraron mayor: i) actividad enzimática



de superóxido dismutasa (SOD) en las hojas, ii) actividad de fosfatasa ácida y alcalina en las raíces y, iii) contenido de ácido ascórbico, polifenoles, flavonoides y polisacáridos.

Mediante técnicas moleculares se ha comprobado el beneficio de la simbiosis en la absorción y translocación de nutrientes tales como N, P, K y Ca (Lee, 2002; Shan *et al.*, 2002; Cameron *et al.*, 2006); además del mejoramiento del crecimiento vegetativo y reproductivo de las orquídeas, así como la inducción de floración temprana y el aumento de la calidad de la flor (Chang, 2007). Algunos otros hongos endófitos sintetizan metabolitos de interés farmacéutico, como *Epicoccum nigrum* que sintetiza epicorazine, mientras que *Phoma* sp. produce pirenofenol, ambos hongos aislados de orquídeas del género *Dendrobium* (Xing *et al.*, 2011).

### **Interacción orquídea-bacteria**

Existe diversos microorganismos en las orquídeas, no sólo en las raíces, sino también en las hojas, raíces adventicias, bulbos, etc. (Zhi-Lin *et al.*, 2009), en los cuales se tienen escasos estudios. Hasta el momento, se ha estudiado más las asociaciones micorrízicas debido a su importancia ecológica, y porque: i) es una interacción diferente a otros tipos de micorriza y ii) sus patrones de infección determinan los sitios de establecimiento de las orquídeas (Batty *et al.*, 2002; Tao *et al.*, 2008). Por tal motivo, los estudios de la microbiota en orquídeas, se enfocan más a nivel rizosférico.

Además de los hongos, se encuentra otro grupo más abundante, las bacterias. Estas bacterias se asocian más con las raíces, y corresponden entre el 7 y 15% con el total de células microbianas, participan en la formación de los microagregados, liberan compuestos ricos en aminoácidos y polisacáridos que modifican las poblaciones microbianas adyacentes (Serrano *et al.*, 2008).

Dentro de los géneros más abundantes de bacterias endófitas en orquídeas terrestres destacan *Streptomyces* y *Bacillus* (Gram positivas) y en las orquídeas epífitas destacan bacterias Gram

negativas como *Pseudomonas* y *Flavobacterium*; y a nivel rizoplano las del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Erwinia* (Tsavkelova *et al.*, 2004, 2007; Amarapurken y Dake, 2011).

*Bacillus* y *Pseudomonas* poseen la capacidad de cambiar las formas insolubles a solubles, al secretar ácidos orgánicos como fórmico, propiónico, glicólico, láctico, fumárico y succínico; o sintetizar sustancias como etileno, ácido abscísico (ABA), brasinoesteroides, oligosacarinas, ácido salicílico y ácido jasmónico, que estimulan el crecimiento de la planta y tienen importancia en el desarrollo de la simbiosis, en la germinación de las semillas (Cuadro 2), o en la maduración de la orquídea de acuerdo a la concentración de fitohormonas que liberan estos microorganismos (Gray y Smith, 2005; Caesar-TonThat *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2012).

Por ejemplo, se reconoce que algunas rizobacterias endófitas como *Pseudomonas fluorescens*, aisladas de la orquídea terrestre *Pterostylis vittata*, favorecen el desarrollo de otras plantas (Tarkka y Frey-Klett, 2008). Algunas bacterias heterotróficas, provenientes de las orquídeas tropicales *Calanthe*, *Acampe* y *Dendrobium*, producen ácido-3-indol-acético (IAA, auxina) importante para la división, alargamiento y diferenciación de las células y tejidos de las plantas, jugando un papel preponderante en el xilema y en la formación de raíces. Otras bacterias forman matrices que pueden tener efectos neutrales como por ejemplo los géneros *Xanthomonas* y *Rhodococcus*, o producir alta concentración de polisacáridos que favorecen la asociación con otros microorganismos como *Anthrobacter*, *Pseudomonas*, *Aquaspirillum* y *Rhodococcus* (Tsavkelova *et al.*, 2004). Lo anterior favorece a la planta al incrementar la disponibilidad de los nutrientes en los sitios donde se desarrollan.

**Cuadro 2. Bacterias aisladas en orquídeas y efectos en la estimulación de la germinación de semillas.**

Hábito de crecimiento	Especie de Orquídea	Especie bacteriana	Promueve la germinación	Referencias
Terrestre	<i>Pterostylis vittata</i>	<i>Xanthomonas maltophilia</i> , <i>Bacillus cereus</i>	+	Wilkinson 1989,1994
		<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Arthrobacter</i>	-	
Terrestre	<i>Calanthe vestita</i> var. <i>rubro-oculata</i>	<i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i>	+	Tsavkelova <i>et al.</i> 2001
Epífita	<i>Dendrobium moschatum</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Xanthomonas</i>	+	Tsavkelova <i>et al.</i> 2001
		<i>Curtobacterium</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Nocardia</i> ,	±	
Epífita	<i>Laelia purpurata</i> , <i>L. flava</i> brasil <i>Oncidium varicosum</i> , <i>Miltonia flavecens</i> , <i>Dendrobium moschatum</i> , <i>D. fimbriatum</i> , <i>D. nobilis</i> , <i>Vanda tricolor</i> , <i>Epidendrum</i> sp, <i>Coelogyne lawrenceana</i> , <i>C. massangeana</i>	<i>Azospirillum</i>	±	Lange y Moreira, 2002
Epífita	<i>Acampe papillosa</i>	Endotrófica (Raíces aéreas) <i>Bacillus</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Xanthomonas</i>	+	Tsavkelova <i>et al.</i> 2004
		(Sustrato) <i>Alcaligenes</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>	+	
Epífita	<i>Dendrobium moschatum</i>	Raíces (adventicias) <i>Bacillus</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Xanthomonas</i>	+	Tsavkelova <i>et al.</i> 2004

		(sustrato) <i>Acinetobacter, Aquaspirillum</i>	+	
Epífita	<i>Dendrobium moschatum</i>	<i>Bacillus, Pseudomonas, Rhodococcus</i> <i>Rhizobium, Microbacterium</i>	+	Tsavkelova <i>et al</i> , 2007
		<i>Sphingomonas, Mycobacterium</i>	++	
Epífita	<i>Dendrobium noble</i>	<i>Bacillus cereus, Pseudomonas sp</i>	+	Amarapurkar y Dake, 2011
	<i>Cattleya walkeriana</i>	<i>Bacillus, Burkholderia, Enterobacter, Curtobacterium</i>	-	
Epífita	<i>Cattleya walkeriana</i>	<i>Bacillus, Enterobacter</i>	+	Fernandes <i>et al.</i> 2011

Ejemplo de otros microorganismos asociados a las raíces de las orquídeas son las cianobacterias, organismos procariotas diazotróficos que forman biopelículas en el velamen, aportando a la orquídea, el nitrógeno necesario para su desarrollo, así como de proveer humedad constante evitando la desecación, y manteniendo una temperatura cálida (Tsavkelova, 2011). Los géneros encontrados son *Nostoc*, *Anabaena*, *Oscillatoria* y *Calothrix*, siendo los dos primeros géneros los dominantes en el sustrato y raíces adventicias en las orquídeas epífitas *Acampe papillosa*, *Phalaenopsis amabilis* y *Dendrobium moschatum*, resaltando su importancia como fuente de nitrógeno para la formación de micorrizas (Tsavkelova *et al.*, 2003). Sin embargo, esta interacción tripartita es afectada de acuerdo a la época del año, edad de la raíz, y por la colonización del hongo micorrízico (Wilkinson, 1989; Tsavkelova *et al.*, 2004; Amarapurkar y Dake 2011).

Uno de los géneros bacterianos sobresalientes es *Bacillus* originalmente aislado de *Dendrobium leonis*, estimula significativamente la germinación y desarrollo de diferentes especies de orquídeas epífitas y terrestres (*Dendrobium*, *Paphiopedilum*, *Ponthieva* y *Dactylorhiza*). En particular, *B. cereus* contribuye con la micorrización, comprobado mediante el análisis de la actividad fosfatasa (Tsavkelova *et al.*, 2007; Karuppiah y Rajaram, 2011). Otras especies como *Pseudomonas putida*, mineralizan formas orgánicas de P (ortofosfato) mediante la enzima fosfatasa, liberando el fosfato para que sea tomado por el micelio micorrízico y así, mejorar la absorción por la planta (Wilkinson, 1989; Barea *et al.*, 2005; Tarkka y Frey-Klett, 2008).

### **Discusión de la literatura revisada y justificación de la investigación**

De acuerdo con la información anterior, se puntualizan los factores por los cuales la vainilla está dentro del estatus de peligro de extinción, así como su problemática biológica, ecológica y comercial en la que se encuentra actualmente. Se enfatiza la necesidad de la generación de información, no sólo agrológica sino también biológica del sistema vainillal como tal, con la finalidad de que se

puedan generar paquetes agroecológicos amigables con el ambiente que ayuden en el mantenimiento y conservación de este cultivo en las zonas tradicionales que han demostrado producir vainilla de mejor calidad comercial.

Los estudios realizados hasta el momento, principalmente en orquídeas de interés farmacéutico, dan ejemplos claros sobre la importancia de los microorganismos simbioses o acompañantes, provenientes y aislados de los sitios de origen, y denotando beneficios en la germinación, el desarrollo, la floración y la generación de metabolitos de interés económico.

Por lo anterior, en el presente trabajo se decidió trabajar en diferentes fases, la primera para conocer la microbiota cultivable existente de la vainilla a partir de un sitio de origen y tradición del cultivo (Papantla) para posteriormente, mediante técnicas enzimáticas y de identificación tradicional y molecular, seleccionar aquellos microorganismos. Después de esta selección se llevaron a cabo cultivos duales (hongo-bacteria) a fin de conocer el tipo de interacción que pueden tener las bacterias y los hongos aislados, a la par se llevaron a cabo las pruebas para determinar si estos microorganismos se asociaron o estimularon el crecimiento vegetal.

## CAPÍTULO IV

### Microorganismos cultivables de órganos aéreos y terrestres de *Vanilla planifolia* recolectadas en dos cultivos en acahual

#### RESUMEN

La vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks, ex Andrews) es una orquídea monocotiledónea tropical que proporciona, tanto en su parte aérea como terrestre, micronichos donde crecen bacterias y hongos. Estos microorganismos pueden ser funcionales en la generación de paquetes agrobiotecnológicos útiles para el cultivo y protección de esta orquídea. El objetivo del presente trabajo fue conocer el número de microorganismos cultivables presentes en la rizosfera, rizoplano, caulosfera y filosfera de vainilla recolectada en dos sitios de cultivo tradicional en el estado de Veracruz. Se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) y siembra en superficie de placa en agar por triplicado, en medios generales de cultivo para la cuantificación de bacterias, hongos, actinomicetos, y medios específicos para fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo, proteolíticos, amilolíticos, lipolíticos y celulolíticos. Los microorganismos más abundantes en ambos sitios fueron las bacterias, seguidas por actinomicetos y hongos, y en orden de magnitud fueron más abundantes en rizoplano > rizosfera > caulosfera > filosfera. En cuanto a grupos microbianos de actividad fisiológica específica, su abundancia mostró el siguiente orden filosfera < caulosfera < rizoplano < rizosfera. Se discute la función de los microorganismos rizosféricos y del rizoplano en la disponibilidad de nutrimentos necesarios la vainilla. Los microorganismos cultivables detectados en este trabajo representan un potencial de aprovechamiento biotecnológico dirigido al cultivo de vainilla.

**Palabras clave:** poblaciones microbianas, filosfera, caulosfera, rizoplano, rizósfera

## CHAPTER IV

### **Culturable microorganisms from aerial and terrestrial organs of *Vanilla planifolia* collected from two acahual crops**

#### **ABSTRACT**

*Vanilla* (*Vanilla planifolia* Jacks, ex Andrews) is a monocot tropical orchid that provides microniches for bacteria and fungi, in aerial or terrestrial organs. These microorganisms may be functional for generating biotechnological approaches for the cultivation and protection of this orchid. The aim of this study was to determine the number of culturable microorganisms in the phyllosphere, caulosphere, rhizoplane, and rhizosphere of vanilla plants collected at two sites of traditional culture in Veracruz state. The counting of colony forming units (CFU) was performed on agar of selective culture media for the quantification of bacteria, fungi, actinomycetes, and those bacteria with specific activity such as nitrogen fixing free living bacteria, phosphate solubilizers, as well as proteolytic, amylolytic, lipolytic and cellulolytic microorganisms. The most abundant organisms in both sites were bacteria, followed by actinomycetes and fungi: rhizoplane > rhizosphere > caulosphere > phyllosphere. In the case of microbial groups with specific physiological activity, their abundance showed the following order: phyllosphere < caulosphere < rhizoplane < rhizosphere. The rhizosphere and rhizoplane microorganisms may play an important role on nutrient availability for vanilla plants. The culturable microorganisms detected in this study may represent a potential biotechnological tool for being directed to the cultivation of vanilla.

**Key words:** microbial populations, phyllosphere, caulosphere, rhizoplane, rhizosphere



## INTRODUCCIÓN

La vainilla es una orquídea trepadora epífita perenne no saprofítica, endémica de Centroamérica, cuyo origen es la zona norte del estado de Veracruz. Su cultivo es de alto valor comercial debido a su uso en diversas y variadas industrias; además, sus representantes endémicos se encuentran protegidos por la NOM-059-SEMARNAT-2010 debido al continuo saqueo de individuos silvestres, y por la deforestación, la contaminación y por incendios (Luyando-Moreno *et al.* 2011; Munguía-Lino *et al.* 2010; SEMARNAT, 2010). Cabe resaltar que los cultivos mexicanos de vainilla presentan enfermedades, plagas y erosión genética al usar la propagación clonal (Kelso-Bucio *et al.* 2012).

Para resarcir lo anterior, se han realizado investigaciones sobre diferentes métodos y medios de cultivo para propagar a la vainilla *in vitro* (Kalimuthu *et al.* 2006; Palama *et al.* 2010; Jericó *et al.* 2014). Del mismo modo, se tienen avances sobre el manejo agronómico y fitopatológico, en particular con la identificación y grado de patogenicidad de ciertos géneros fúngicos que atacan a esta orquídea (Talubnak y Soyong, 2010; Adame-García *et al.* 2011; Cardona *et al.* 2012).

Otros trabajos, utilizan microorganismos endófitos rizosféricos específicos para generar bioinoculantes usados en programas de conservación y aprovechamiento de orquídeas, resaltando su papel biológico dentro de las plantas (Ahemad y Saghir, 2011; Chutima y Lumuyong, 2012; Hossain *et al.*, 2013); al influir de manera positiva en su adaptación ambiental, su actividad nutricional, y en su resistencia a patógenos (Selosse, 2004; Sarabia-Ochoa *et al.*, 2010; Schenk *et al.*, 2012). En México, específicamente en el Distrito Federal y en los estados de Chiapas y Michoacán, se han empleado hongos endorrizosférico para fortalecer programas de conservación de

orquídeas terrestres y epífitas (Rangel-Villafranco y Ortega-Larrocea, 2007; Beltrán-Nambo *et al.* 2010).

Lo anterior denota la importancia de conocer a los microorganismos existentes en la orquídea *Vanilla planifolia*. La cual proporciona microhábitats muy particulares tanto en su parte aérea (tallos, raíces adventicias, hojas, flores, frutos) como en su parte terrestre (raíz). Así la zona del tallo se identifica como caulosfera, filosfera para la hoja y rizósfera para la raíz (Moffett, 2000; Lindow y Brandl, 2003; Hallman y Berg 2006). Estos microhábitats son dinámicos, encontrándose microorganismos residentes o transitorios, epífitos (estar sobre la planta) o endófitos (dentro de la planta) que pueden interactuar de manera muy general o específica de acuerdo al grado de asociación que tenga con la planta (Melotto *et al.*, 2008; Berg *et al.*, 2011). Estos estudios son una herramienta útil en la generación de nuevas biotecnologías.

Por lo anterior, en el presente trabajo se propuso conocer mediante el recuento poblacional, el número de microorganismos formadores de colonias de la orquídea *Vanilla planifolia*, en dos sitios de cultivo tradicional en el estado de Veracruz con diferentes edades, a nivel de rizósfera, rizoplano, caulosfera y filosfera; así como aquellas colonias de microorganismos que pudieran fijar nitrógeno, solubilizar fósforo, o bien con una actividad enzimática específica (amilolítica, proteolítica, lipolítica y celulolítica).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Suelos de estudio**

En septiembre del 2012 se muestrearon dos vainillales bajo sistema de acahual con diferentes años de manejo (Cuadro 1), en las localidades Ejido primero de Mayo (N 20° 17.17' W 97° 14.18') y de Cuyuxquihui (N 20° 17.07' W 97° 16.36') ubicados en el municipio de Papantla, estado de Veracruz, México. El clima de la región es cálido, con una temperatura media anual de 22.9° C, con

abundantes lluvias en verano y principios de otoño; con una precipitación media anual de 1 695.9 mm (Servicio Meteorológico Nacional, 2012).

**Cuadro 3. Localización y características de los vainillales cultivados bajo sistema de acahual en Papantla, Veracruz**

Localidad (Papantla, Ver.)	Coordenadas	Elevación (metros sobre el nivel del mar)	Tipo de cultivo	Vegetación acompañante	Edad del vainillal (años)
Ejido 1° de Mayo	N 20° 17.17' W 97° 14.18'	220	Acahual	Pimienta Cedro	2.5
Cuyuxquihui	N 20° 17.07' W 97° 16.36'	260	Acahual alto	Herbáceas Epífitas	11

La vegetación inicial de ambos sitios ejidales era la selva baja perennifolia con rocas aflorantes y con una amplia pendiente (mayor a 45°), por costumbre realizan roza tumba y quema para el establecimiento de los cultivos, en este caso un vainillal empleando a pichoco (*Erythrina* sp.) como tutor, combinado con otros cultivos agrícolas en el margen del terreno (maíz, chile y calabaza o frijol). La vegetación de la primera zona de muestreo 1° de Mayo (Cuadro 1), representa un relicto de un acahual muy joven para el uso del cultivo de vainilla, debido a que hacen un continuo cambio de plantas, en este sitio las plántulas tenían 7 m de altura, los árboles sombra eran cedros (*Meliaceae*); algunas herbáceas más abundantes como malvas, mala mujer (*Urticaceae*) y barbasco (*Dioscoreaceae*) cubrían el suelo, el último de importancia económica en la zona para la elaboración de canastas. En algunos sectores de la zona, estaban iniciando la reforestación con lichi (*Litchi chinensis* Sonn.) y pimienta negra (*Piper nigrum* L.). La segunda zona de muestreo, Cuyuxquihui (Cuadro 3), representa el sitio de mayor tradición para el cultivo de vainilla, y se ubica a unos 150

km de la zona arqueológica del mismo nombre, en donde la vegetación se encuentra conformada por pichoco (*Fabaceae*), cedro (*Meliaceae*) y palma camedor (*Areaceae*) utilizada para adornos florales. Dentro de los cultivos agrícolas había plantación de chile de árbol (*Capsicum frutescens* L.), pimienta (*Piper* sp.) y chiltepín (*Capsicum annuum* L.); otras plantas silvestres comerciales eran estropajo (*Luffa aegyptiaca* Mill.), jícara de árbol (*Crescentia cujete* L.) y una calabacita trepadora (*Melothria scabra* Naudin). Las plantas de vainilla tenían entre 10 - 15 m de altura.

### **Propiedades físicas y químicas de los suelos de estudio**

En cada uno de los vainillales, se tomaron muestras del suelo rizosférico y vegetal (raíces, tallos y hojas) de cinco individuos (Martins, 1993) empleando el método de cuadrantes. Las muestras fueron transportadas en frío en bolsas de plástico para su procesamiento en el laboratorio.

Del suelo rizosférico se realizó una muestra compuesta de cada uno de los sitios y se envió al laboratorio central universitario de suelos de la Universidad Autónoma Chapingo, para que analizarán su textura (hidrómetro de Bouyoucos, 1962); materia orgánica (Walkley y Black; 1934) pH (potenciométrico relación suelo agua 1:2), conductividad eléctrica (CE; puente de conductividad en relación suelo), capacidad de intercambio catiónico (CIC, acetato de amonio 1.0N pH 7.0 centrifugación); los macronutrientes como fósforo (P, Olsen y Sommers, 1982), nitrógeno (N, método Kjeldahl, extraído con cloruro de potasio 2N y determinado por arrastre de vapor), potasio (K, extraído en acetato de amonio 1.0N pH 7.0 relación 1:20 y determinado por espectrofotometría de emisión de flama); calcio y magnesio (Ca y Mg, extraído en acetato de amonio 1.0N pH 7.0 relación 1:20 y determinado por espectrofotometría de absorción atómica).

### **Aislamiento de bacterias, hongos y actinomicetos totales**

Se tomaron 10 g del suelo rizosférico (primeros 20 cm) y 1g de raíz para la determinación de la población microbiana presente en cada una de las muestras mediante el recuento de unidades

formadoras de colonias (UFC). Se utilizó el método de cuantificación de colonias en diluciones decimales seriadas y se sembraron 100 µL por extensión con una asa de Drigalsky en forma de L en la superficie de la placa, en cajas de Petri, con agar nutritivo para bacterias, agar papa dextrosa para hongos y Czapeck para actinomicetos por triplicado (Ramírez-Gama *et al.* 2006).

Para el caso del material vegetal (hoja y tallo), tomado a 1 m de altura del suelo, se lavó con abundante agua para remover el suelo y polvo, posteriormente se esterilizaron superficialmente con etanol al 70% por 30 segundos a 2 minutos seguido de un lavado con una solución al 20% de hipoclorito de sodio (de nivel comercial 5%) por 2 minutos y otro lavado con Tween 20 al 0.01% seguido de tres lavados con agua destilada estéril (Rodrigues, 1994; Bayman *et al.*, 1997). Posteriormente, en condiciones estériles, se disectaron 10 mm<sup>2</sup> de hoja considerando tres secciones: distal, central y proximal; en el caso del tallo se tomaron muestras de 10 mm<sup>2</sup>. Se tomaron 10 secciones de cada muestra y se procedió con el método de cuantificación de colonias en diluciones decimales seriadas y siembra en superficie en placa, como se hizo en rizósfera y rizoplano.

Las placas inoculadas con las muestras fueron incubadas a 28° C por cuatro días para bacterias y hongos, y siete días para actinomicetos.

### **Microorganismos con actividad enzimática específica**

Se emplearon medios selectivos para aislar aquellos microorganismos de vida libre con capacidad de fijar nitrógeno, y a microorganismos capaces de solubilizar fósforo, degradar el almidón, la celulosa, las proteínas y los lípidos. Cada uno de los medios se inoculó con 100 µL de las muestras decimales seriadas (10 a la 10) de acuerdo a lo indicado en el Anexo 1, se extendieron en la superficie de la caja de Petri por extensión con el asa de Drigalsky, por triplicado. Las cajas inoculadas fueron incubadas por 7 días a 28°C.

Para el aislamiento de los microorganismos de vida libre capaces de fijar nitrógeno atmosférico se empleó el medio de Rennie (1981) el cual consta de dos soluciones: A)  $K_2HPO_4$  0.8 g,  $KH_2PO_4$  0.2 g,  $NaCl$  0.1 g,  $NaFeEDTA$  0.028 g,  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  0.025g, extracto de levadura 0.025 g, manitol 5 g, sacarosa 5 g, lactato de sodio (60% v/v) 0.5 mL, agua destilada 900 mL, agar 15g y B)  $MgSO_4 \cdot H_2O$  0.2 g,  $CaCl_2$  0.06 g, agua destilada 100 mL, se ajustó el pH a 7.0; después de esterilizarse se enfrió y agregó 100  $\mu$ L de biotina y 200  $\mu$ L de ácido *p*-aminobenzóico. Para aquellos microorganismos capaces de solubilizar fósforo se empleó el medio Pikovskaya D–Glucosa 10 g,  $(NH_4)_2SO_4$  0.5 g,  $Ca_3(PO_4)_2$  5 g,  $NaCl$  0.2 g,  $KCl$  0.2 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.002 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.002 g, extracto de levadura 0.5 g, agar 15 g, y agua destilada 1000 mL; el pH se ajustó a 7. Los microorganismos capaces de solubilizar fosfato formaron halos claros alrededor de colonia (Sharma *et al.* 2011).

La determinación cualitativa de la capacidad hidrolítica para proteínas se consideró un medio que contenía agar nutritivo (20g) y gelatina (4g) en 1000 mL de agua, adicionándose 5 mL de una solución de gelatina al 8% por cada 100 mL del medio ajustado a pH 6. Para conocer si existió o no la hidrólisis se agregó una solución saturada de  $(NH_4)_2SO_4$ , para observar un halo claro que indica la hidrólisis de la proteína (Saksirirat y Hoppe, 1991).

Los microorganismos amilolíticos se cultivaron en agar almidón al 2%, después de la incubación se agregó solución de yoduro de potasio al 1 %; la zona clara alrededor de la colonia indicó la presencia de las enzimas amilolíticas (Pochon y Tardieux; 1965; Rodríguez *et al.*, 2006).

La producción de lipasas se determinó con medio base de peptona de carne 20 g,  $NaCl$  10 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.2g con 20 mL de Tween 20 y 15 g de agar a pH 7.0; la actividad lipolítica se confirmó al observarse un halo claro alrededor de la colonia (Sierra, 1956; Ivonilde *et al.*, 2006).

Para la detección de aquellos microorganismos poseedores de la enzima celulasa, se cultivaron en agar carboximetilcelulosa 2 %, con 5 mL de solución estándar Winogradski, 1 g de  $NH_4NO_3$ , 20

mL de extracto de suelo, 1 mL de la solución de micronutrientes, 10 g de carboximetilcelulosa y 10 g de agar en 1000 mL de agua. La actividad positiva de la celulasa fue observada mediante un halo de color naranja alrededor de la colonia; este halo se ve al revelar el medio con 1 mL de rojo Congo al 1% por un minuto, y enjuagar dos veces el exceso del colorante con 2mL NaCl<sub>2</sub> al 1M (Suyama *et al.*, 1993).

Pasado el tiempo de incubación, se observó el crecimiento de las colonias y se realizó el recuento de las colonias formada en cada medio de cultivo, para posteriormente calcular el número de unidades formadoras de colonias (UFC) para cada uno de los micronichos estudiados (rizósfera, rizoplano, caulosfera y filosfera). Los valores de ambos sitios se analizaron mediante análisis de varianza y una prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) utilizando el programa estadístico SAS Versión 9.0.

### **Hongos endófitos**

Las raíces, tallo y hojas se esterilizaron de acuerdo a la metodología de Rodrigues (1994) y Bayman *et al.* (1997). Se colocaron de 3 a 12 secciones por caja y por triplicado, con medio PDA<sup>®</sup> con sulfato de estreptomina (0.16 mg L<sup>-1</sup>) y gentamicina (0.32 mg L<sup>-1</sup>), incubados a 28° C en oscuridad. Después de 2 a 5 días, cualquier crecimiento hifal fue transferido a cajas de Petri con medio PDA a 28° C y fueron subcultivados cuatro veces cada 3 a 6 días.

Para obtener las cepas fúngicas de la raíz con probable potencial simbiótico, se realizó una esterilización previa para después hacer cortes transversales de 2 a 5 mm cada 1.5 cm. Se corroboró la presencia de pelotones observando el corte en el microscopio óptico a 100X y 400X para después retirar el velamen de la raíz y sumergir es segmento de la raíz en una solución de gentamicina-estreptomina en relación 2:1 p/p. Posteriormente, bajo condiciones estériles, el segmento de la raíz fue disectado completamente hasta liberar los pelotones; se colocaron entre 9 y 12 pelotones en cajas

de Petri en medio PDA® y medio de agar fúngico (5 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 g  $\text{KCl}$ , 0.1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1g extracto de levadura, 8 g de agar bacteriológico en 1000 mL de agua a pH 5.5) por triplicado. Las cajas fueron incubadas a 28°C en oscuridad, después de 2-5 días cualquier crecimiento hifal fue transferido a medios PDA y fueron subcultivados cuatro veces cada 3 a 6 días. (Ortega-Larrocea, 2008; Agustini *et al.* 2009, Gezgín y Eltem, 2009).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Propiedades físicas y químicas de los suelos de estudio**

Los resultados del análisis de los suelos rizosféricos de los vainillales (Cuadro 4) muestreados de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000, denotaron suelos francos con alto contenido de materia orgánica, lo que indica la formación de agregados que crean un complejo de cambio entre el suelo y la vainilla debido a la buena aireación permeabilidad y capacidad de retención de agua media (Benton, 2012; Castellanos *et al.*, 2000).

El primer sitio muestreado (Ejido 1° de Mayo) de acuerdo a los parámetros físicos y químicos, tuvo textura franco arcillosa, pH neutro, contenido medio y bajo de nitrógeno orgánico y fósforo, respectivamente. El sitio Cuyuxquihui, presentó textura franco arcillosa arenosa, con pH moderadamente alcalino, contenido medio de nitrógeno inorgánico y fósforo medio (Cuadro 4). (Benton, 2012; SEMARNAT, 2002; Casanova, 2005).

Los microagregados favorecen la capacidad de intercambio catiónico, en especial los iones de Ca, Mg y K (Cuadro 4) que estimulan el crecimiento de la vainilla, por encontrarse en suelos cercanos a la neutralidad (Casanova, 2005). El orden de nutrientes que pueden ser asimilados por la planta fue el siguiente:  $\text{Ca} > \text{K} > \text{Mg} > \text{N} > \text{P}$ , los dos primeros elementos son requeridos para mantener la selectividad e integrar la membrana celular de la raíz (Martínez, 2006). Con base a lo



anterior, Cuyuxquihui fue el sitio que tuvo mejor capacidad de retener los elementos involucrados en la nutrición de la planta [43.7 Cmol(+) Kg] en comparación del suelo del Ejido 1° de Mayo [42.6 Cmol(+) Kg]. Los valores de la conductividad eléctrica (CE) aceptables para el crecimiento de los cultivos es de entre 0 y 0.8 dSm<sup>-1</sup>; para este trabajo el tener una CE > 1 dSm<sup>-1</sup> podrían presentarse problemas sobre el crecimiento radical por la cantidad de sales (Casanova, 2005; Fitter y Hay, 2001).

**Cuadro 4. Resultados del análisis físico y químico de los suelos en los dos vainillales de Papantla, Veracruz**

Localidad	Textura del Suelo	Materia	pH	CE dSm <sup>-1</sup>	CIC C mol(+) Kg	P	N	K	Ca	Mg
		Orgánica %								
Ejido 1° de Mayo	Franco-Arcilloso	10.74	7.32	1.65	42.6	5.59	31.3	688	8486	632
Cuyuxquihui	Franco-Arcilloso- Arenoso	14.78	7.53	1.44	43.7	8.47	21.1	725	8956	660

#### **Aislamiento de bacterias, hongos y actinomicetos totales**

Para ambos acahuales (Fig. 6), la microbiota predominante a lo largo de la orquídea correspondió a las bacterias, seguidas por los actinomicetos y finalmente los hongos, lo que concuerda con lo mencionado por Gómez y Corlay (2010). En cuanto a la poblacional microbiana por órgano de la vainilla, en general mostró el siguiente comportamiento: rizoplano > rizósfera > caulósfera > filosfera (Fig. 6).

A nivel rizósfera (Fig. 6A) para el sitio Ejido 1° de Mayo mostró mayor cantidad de hongos (3.5) y actinomicetos (5.1) en comparación con Cuyuxquihui (3.1 y 4.4 respectivamente); en comparación con lo obtenido en nivel rizoplano. Lo anterior se puede explicar porque la raíz exuda diversos compuestos orgánicos, nitrogenados y fosfatados que atraen a los microorganismos (Fernandes *et*

*al.*, 2011; Vogel y Macedo, 2011; Chaparro *et al.*, 2012; Panwar *et al.*, 2012), lo que permite cierta interacción con la orquídea. De acuerdo con Bitton *et al.* (1974), el pH de ambos sitios, de neutro a moderadamente alcalino, contribuye al desarrollo microbiano.

Comparando la población de bacterias totales reportada por Foster (1986), la población obtenida en el presente trabajo fue relativamente baja en ambos sitios de muestreo.

La población de bacterias en la caulosfera fue significativamente mayor en las plantas del Ejido 1° de Mayo; mientras que para la filosfera, esta población fue mayor en las plantas de Cuyuxquihui; en el caso de los actinomicetos, su población fue similar en ambos sitios (Fig. 1C-D). El número de colonias bacterianas determinados en la filosfera 5 a 6 fue bajo en comparación a lo reportado por otros autores (Lindow y Leveau, 2002; Leveau, 2006; Griffin y Carson, 2015) cuyo valor va de 6 a 9 células cm<sup>-2</sup>. Esto probablemente ocurrió por la fenología de la planta, y la forma y la superficie de la hoja, la estación de crecimiento, la vegetación circundante o bien, por las mismas condiciones microclimáticas en la superficie de la hoja al momento de realizar el estudio (Meyer *et al.*, 2012; Whipps *et al.*, 2008).

El hecho de la nula cuantificación de colonias fúngicas totales a nivel de caulosfera y filosfera indica que los hongos son muy susceptibles a los cambios de las condiciones abióticas (p.e. temperatura del sitio, radiación solar, humedad, entre otros) (Last y Deighton, 1965; Redford *et al.*, 2010; Meyer y Leveau, 2012), al carecer de estructuras o sustancias que le permitan permanecer sobre las estructuras de la planta; en contraste, las bacterias (*Pseudomonas fluorescens* y *P. putida*) son capaces de modificar su microhábitat para crecer y sobrevivir en la filosfera (Whipps *et al.*, 2008).

### **Microorganismos con actividad enzimática específica**

Los microorganismos son importantes en la sustentabilidad de los ecosistemas por formar humus en el suelo y mejorar las propiedades del suelo. Los principales microorganismos encargados de degradar los residuos vegetales en un sistema e incorporarlos en el ciclo de los nutrientes más importantes (por ejemplo: carbono, nitrógeno y fósforo) son las bacterias y los hongos, cuya supervivencia depende de su capacidad enzimática para obtener sus nutrientes a partir de compuestos como celulosa, proteínas, almidón entre otros (Trasar-Cepeda *et al.* 2008).

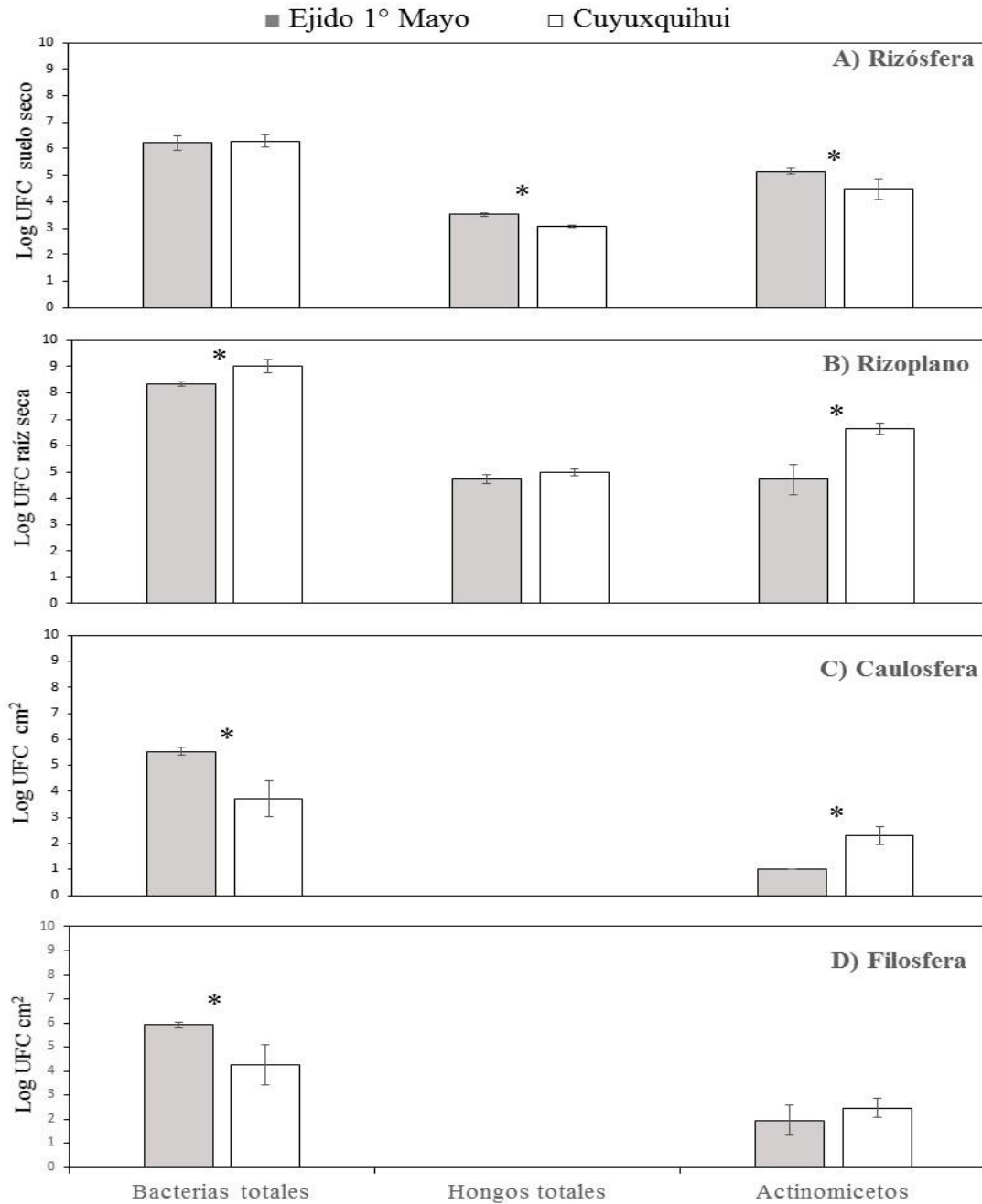


Figura 6. Población de bacterias, hongos y actinomicetos totales cultivables [unidades formadoras de colonias (UFC)] expresada en unidades logarítmicas, obtenida en tres micrositios A) rizósfera, B) rizoplano, C) caulosfera, y D) filofera, de *Vanilla planifolia* cultivada bajo sistema tradicional de acahual. El asterisco indica diferencias significativas entre los sitios muestreados, Ejido 1° de Mayo y Cuyuxquihui, (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).  $n = 3$ ; Medias  $\pm$  error estándar.

En un sistema agroforestal, como el de la vainilla, es importante conocer los grupos funcionales de microorganismos para entender los procesos e interacciones que llevan dentro del mismo. De manera general, la celulosa es un carbohidrato disponible en la biomasa vegetal terrestre, la cual es degradada para incorporarse al ciclo del carbono, se esperaban promedios poblacionales mayores a los amilolíticos. Sin embargo, las poblaciones de bacterias amilolíticas exhibieron los promedios poblacionales más altos (4-7 unidades logarítmicas) en relación con los celulolíticos (2-6 unidades logarítmicas) lo cual indicaría que el material vegetal presente en la zona, brinda sustratos amiláceos que son reserva energética de las plantas y que se descomponen más rápidamente que la celulosa (Fig. 7).

Aun así, se esperaban diferencias significativas a nivel rizósfera y rizoplano; pero no fue así, las diferencias se dieron a nivel de filosfera, aislándose una mayor cantidad en el Ejido 1° de Mayo. De acuerdo al número de colonias cuantificadas el orden de mayor a menor de los niveles de donde fueron aislados los microorganismos celulolíticos fue el siguiente: rizoplano > rizósfera > caulosfera > filosfera.

El ciclo del nitrógeno es importante en el suelo y en la rizosfera, así los microorganismos proteolíticos liberan el nitrógeno orgánico, mientras que las bacterias de vida libre fijadoras de N<sub>2</sub> (BFN) lo incorporan al suelo (Medina, 2012). En este trabajo, la población de bacterias proteolíticas en ambos sitios de muestreo, fue mayor en el ambiente terrestre con respecto a la cuantificada en la parte aérea, especialmente, en la caulosfera (Fig. 7 C). En cuanto a las BFN, su población fue significativamente mayor en la filosfera de las plantas recolectadas en el Ejido 1° de Mayo en comparación con las recolectadas en Cuyuxquihui (Fig. 7 D), mientras que en los tres micronichos restantes no se obtuvieron diferencias entre ambos sitios (Fig. 7 A-B).

Los microorganismos (hongos y bacterias) son importantes también para promover la disponibilidad y la movilización de P para las plantas, ya que este elemento es fundamental para la

productividad primaria del sistema (Reyes, 2011; Sinsabaugh *et al.*, 2002) debido a su papel en la división celular, fotosíntesis, desarrollo de raíces y utilización de carbohidratos (White y Hammond, 2008). En este estudio, la mayor cantidad de estos microorganismos se encontraron a nivel de rizoplano y rizosfera (Fig. 7 A-B), los cuales pueden favorecer el desarrollo de la vainilla; sin embargo la diferencia entre sitios fue a nivel caulosfera y filosfera (Fig. 7 C-D), siendo el sitio Ejido 1° de Mayo el que más organismos solubilizadores de fósforo presentó a nivel filosfera.

Los microorganismos lipolíticos tienen amplia adaptabilidad ambiental (Jaeger y Rosenau, 2004). Este grupo se encontró mejor representado en el sitio Ejido 1° de Mayo (Fig. 7). En Cuyuxquihui sólo fueron representativos a nivel rizoplano y caulosfera (Fig. 7 B y C).

La mayoría de los microorganismos con actividad enzimática específica son empleados en la industria alimenticia, farmacéutica, textil o de limpieza, además de emplearse para procesos de biorremediación de hidrocarburos; así como las cepas microbianas fijadoras de nitrógeno o aquellas solubilizadoras de fósforo presentan potencial para estimular el crecimiento vegetal (Corrales *et al.*, 2014), y por tanto pueden ser seleccionadas para ser utilizadas como biofertilizantes, después de un proceso de selección con base en su efectividad en la vainilla.

Los microorganismos que se aislaron (fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo, celulolíticos, etc) tienen una actividad fisiológica específica que son útiles para la nutrición para las plantas de vainilla, y probablemente, poder conferir algunas sustancias que pueden contribuir en su protección hacia fitopatógenos. Algunas de estas bacterias podrían ser de interés biotecnológico o industrial. No obstante, se recomienda realizar futuras investigaciones para complementar la información obtenida mediante métodos moleculares que permitan examinar la diversidad microbiana sin las limitaciones relacionadas con los métodos de cultivo tradicionales.

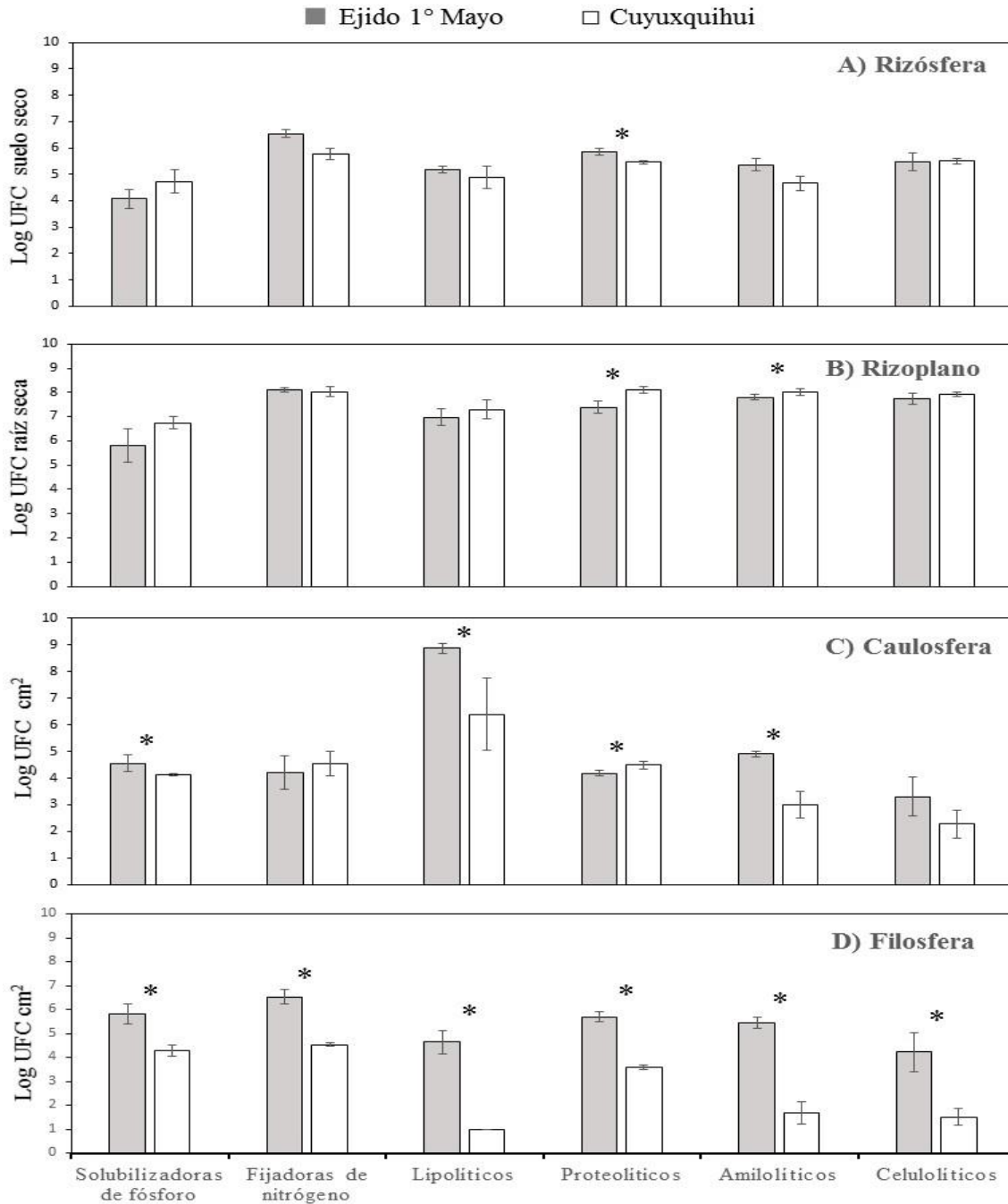


Figura 7. Población de microorganismos cultivables totales con actividad fisiológica específica [unidades formadoras de colonias (UFC)] expresada en unidades logarítmicas, obtenida en tres micrositios A) rizósfera, B) rizoplano, C) caulosfera, y D) filosfera, de *Vanilla planifolia* cultivada bajo sistema tradicional de acahual. El asterisco indica diferencias significativas entre los dos sitios muestreados (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ).  $n = 3$ ; Medias  $\pm$  error estándar.

## Hongos endófitos de raíz

Un mecanismo evolutivo importante desarrollado por las plantas es interactuar con microorganismos, sobre todo con los endófitos fúngicos (Santos y Varavallo, 2011). Los hongos protegen a las orquídeas de patógenos mediante la síntesis de metabolitos secundarios, o por el mejoramiento en su nutrición en sus primeras fases de desarrollo; además, favorecen la producción de biomasa aérea y radical de la vainilla (Ordoñez *et al.*, 2012). Sin embargo, en el presente estudio, de 18 cajas inoculadas con 9 pelotones (enrollamientos hifales) sólo se lograron aislar tres morfotipos fúngicos (Fig. 8). Uno de ellos (Fig. 8-3) perdió su capacidad de crecimiento activo en el medio de cultivo, después de su tercer re-aislamiento, por esta razón sólo se trabajó con dos de ellos. Sus características macro- y microscópicas se describirán en el siguiente capítulo.



Figura 8. Macrofotografías de tres colonias fúngicas aisladas a partir de los pelotones de *Vanilla planifolia*, después de 20 días de incubación a 28 °C en PDA.



## **CONCLUSIONES**

La detección de microorganismos cultivables en el presente trabajo permite inferir su importancia en la rizósfera y en el rizoplano, al participar en el ciclaje de nutrientes como N y P, pero además, en la mineralización de compuestos orgánicos ricos en celulosa, lípidos, o proteínas. Este trabajo, reporta por primera vez la presencia de microorganismos cultivables en tallos (caulosfera) y hojas (filosfera), con cierta contribución para la planta de vainilla.

## CAPÍTULO V

### Caracterización de cepas bacterianas y fúngicas aisladas de *Vanilla planifolia*, y evaluación de su potencial biotecnológico

#### RESUMEN

Los microorganismos son importantes en la vida de las plantas debido a los metabolitos que secretan. Por ello, es necesario diferenciar a cada microorganismo presente en los diferentes órganos de la vainilla, con base en sus características morfológicas y metabólicas, para seleccionar bacterias y hongos endófitos que puedan formar simbiosis con la vainilla o estimular su crecimiento. Las cepas bacterianas demostraron tener potencial biotecnológico al solubilizar fosfato ( $4.8 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y producir ácido indolacético ( $3.9 - 7.9 \mu\text{g L}^{-1}$ ). La identificación de las cepas bacterianas, mediante los métodos tradicionales y moleculares fue difícil debido a: 1) se tuvieron que realizar modificaciones en las técnicas de extracción de ADN genómico y pruebas con primers para realizar las PCR a diferentes condiciones para obtener un ADN útil para la secuenciación, y 2) no existían secuencias parecidas a las obtenidas en las bases de datos. Los aislamientos bacterianos correspondieron a *Achromobacter* sp., *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp. y *Pseudomonas* sp., con importancia industrial (producción de enzimas y antibióticos) y ecológica (degradación de materia orgánica). Los endófitos fúngicos cultivables pertenecieron a los géneros *Exophiala* y un consorcio; el primero es un hongo productor de giberelinas, hidroliza grasas, y favorece la resistencia a condiciones adversas. En el consorcio *Paecilomyces* sp.- *Verticillium* sp, el primer hongo es antagonista de nematodos e insectos, y el segundo es parásito; ambos hidrolizaron celulosa, almidón, grasas y proteínas. Las cepas fúngicas no endófitas pertenecieron a los géneros *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp.

**Palabras clave:** *Achromobacter*, *Bacillus*, *Exophiala*, indoles, solubilización de fósforo.

## CHAPTER V

### Characterization of bacterial and fungal strains isolated from *Vanilla planifolia*, and evaluation of their biotechnological potential

#### ABSTRACT

Microorganisms are critical for living plants due the releasing of microbial metabolites. Thus, the morphological or metabolic characterization of microorganisms cohabiting different organs of vanilla is necessary to select bacteria and fungi that may promote the growth of this plant species. The bacterial strains showed biotechnological potential since they contribute either on P-solubilization ( $4.8 \mu\text{g L}^{-1}$ ) or on producing indole acetic acid ( $3.9 - 7.9 \mu\text{g L}^{-1}$ ). The morphological and molecular identification of the bacterial strains showed certain difficulties since: 1) the ADN extraction was subjected to several modifications in order to select appropriate primers to perform the PCR at certain conditions, and before sequentiation, and 2) no similar sequences were obtained from databases. Bacterial isolates corresponded to *Achromobacter* sp., *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp. and *Pseudomonas* sp., that have either industrial (enzyme or antibiotic production) or ecological (organic matter degradation) significance. The culturable fungal endophytes belonged to *Exophiala* and a fungal consortium; the first fungus produces gibberalins, hydrolyzes lipids, and favors plant resistance under adverse conditions. In the case of the fungal consortium *Paecilomyces* sp.-*Verticillium* sp., the first fungus is an antagonist to nematodes and insects, and the second fungus is a parasite; both fungi degrade cellulose, starch, lipids, and poteins. The non-endophytic fungi belonged to the genera *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp. and *Trichoderma* sp.

**Key words:** *Achromobacter*, *Bacillus*, *Exophiala*, indol acetic acid, phosphate solubilization.

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son importantes para promover la disponibilidad y movilización de nutrientes fundamentales para la productividad primaria del vainillal. Para tratar de inferir los mecanismos de su funcionamiento en el sitio en donde se encuentran desarrollándose, se deben identificar a sus integrantes (López-García y Moreira, 2008) y así discernir el papel evolutivo de la microbiota en el acahual, los cambios en la diversidad microbiana de acuerdo a su resiliencia para los impactos ambientales, y la correlación entre microorganismos-plantas-animales (insectos). En conjunto se pueden interpretar los patrones biogeográficos y de distribución de los microorganismos, tanto patógenos como benéficos (Horner-Devine *et al.*, 2004). En tal bioprospección, algunos microorganismos pueden tener un valor comercial significativo en los sectores industrial, alimentario, cosmético, farmacéutico, entre otros, ya sea por sus compuestos químicos, genes, proteínas u otros productos (Noguez *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2006; Hernández y Lubinsky, 2011; Capdevielle *et al.*, 2011).

Para el presente trabajo, se consideraron como microorganismos más relevantes aquellos que pudieran tener una interrelación íntima con la vainilla, para favorecer su crecimiento y/o nutrición o bien conferirle un potencial adaptativo frente al estrés biótico y abiótico; para así contribuir a su cultivo orgánico (Satyanarayana, 2005; Binga *et al.*, 2008). Tal es el caso de los microorganismos rizosféricos, los cuales además de ser los más estudiados debido a que se habitan en ambientes con mejores condiciones (humedad poco variable y alta concentración de nutrientes) para su desarrollo (Fierer *et al.*, 2007).

Para tener un buen conocimiento sobre los posibles inóculos (consorcios microbianos), primero se debe realizar la identificación de la microbiota, misma que consiste en asignarle un taxón según una clasificación tradicional establecida mediante características fenotípicas y/o genotípicas del

microorganismo, y comparando éstas con las diferentes categorías de la clasificación considerada (Guerrero y Berlanga, 2005).

Partiendo de cultivos puros (axénicos) del microorganismo que se desea usar, se utilizan medios selectivos en placa o diferenciales, así como su observación en microscópio (empleando algunos colorantes para una mejor caracterización), o pruebas bioquímicas para determinar la actividad enzimática y de metabolitos. Sin embargo, algunos microorganismos no pueden ser observados bajo microscopio y otros no crecen en los medios de cultivo, por lo que hay que recurrir a otro tipo de pruebas como las moleculares (Nogales, 2005). Pero para tener mejores resultados se deben combinar los métodos ecológicos, fisiológicos y moleculares para identificar a los microorganismos de interés, como en el presente trabajo (Watanabe y Baker, 2000).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Caracterización de microorganismos**

Los primeros pasos para la identificación de los microorganismos son la observación macro y microscópica de los microorganismos, además de las pruebas bioquímicas que engloban tres tipos de estudios: i) enzimas del metabolismo del microorganismo, ii) requerimientos nutricionales, y iii) pruebas de resistencia antibiótica.

#### *Caracterización bacteriana*

Se seleccionaron las colonias más frecuentes presentes en las placas en los diferentes medios de cultivo (AN; CEL; LIP; PROT; AM) para proceder a su purificación mediante el método de estriado o de dilución con Tween 20 en placas de agar nutritivo. Su caracterización macroscópica consistió en la morfología de la colonia: borde, elevación, textura y color; y para la microscópica se empleó la tinción de Gram, la cual consistió en realizar un frotis en una gota de agua estéril con una asada de la colonia, se dejó secar para su posterior tinción con: cristal violeta por 1 minuto, se enjuagó con

agua, se agregó lugol por 1 minuto se lavó con agua tres veces y una cuarta con etanol, por último se agregó safranina al 1% por 30 s, se lavó con agua y se dejó secar. La observación con el microscopio y una gota de aceite de inmersión a 100X y 1000X ayudó a determinar el color de la colonia, el tipo de células y la forma de acomodo.

### *Caracterización fúngica*

La caracterización macroscópica consistió en describir sus características superficiales (aspecto, consistencia, desarrollo, color y pigmento) y del micelio profundo (desarrollo y color) (Ramírez-Gama *et al.*, 2006), para el análisis microscópico se empleó un microscopio Leica con aumentos de 60, 200, 400 y 1000X de las laminillas obtenidas de la técnica modificada de Ridell (1950) a diferentes días; su identificación se basó en la estructura, composición y estructura de las células conidiales, conidióforos y clamidosporas auxiliándose del “Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species” (Watanabe, 2010).

### **Caracterización enzimática**

Las pruebas bioquímicas expresan la presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o vía metabólica, crecimiento a una temperatura dada, etc. Algunas de las pruebas primarias que se realizaron para las bacterias fueron:

*Prueba de KOH al 3%* para corroborar grupos Gram positivos y Gram negativos. Para ello se tomó una asada de la colonia bacteriana a las 24 h de crecimiento y se mezcló por 10 s con 10  $\mu$ L de KOH en portaobjetos. Si formaba un hilo lechoso indicaba una bacteria Gram negativa sino lo formaba era una Gram positiva (Powers, 1995).

*Prueba de Catalasa.* Se depositó la colonia sobre un portaobjetos y se agregó peróxido de hidrógeno al 30%. Esta prueba sirvió para diferenciar algunos integrantes de la familia

Micrococcaceae que poseen la proteína hemo denominada citocromo; el resultado es positivo si en la colonia hay efervescencia (MacFaddin, 2003).

*Producción de ácido o base.* Cada uno de los aislados se cultivó en medio LMA (pH 6.8) con indicador azul de bromotimol (0.5% en NaOH 0.016N) y en LMA (pH 5.5) con púrpura de bromocresol a igual concentración, incubados a 28° C, durante diez días, según la tasa de crecimiento de cada una de las cepas. Una vez concluido el crecimiento se observó cambio de coloración en el medio (Sosa *et al.*, 2004).

*Producción de ácido indol acético (AIA).* Se realizó la cuantificación con espectrofotómetro, a una longitud de onda de 595 nm, empleando el método de Salkowski. Las cepas se cultivaron en medio Luria-Bertani con y sin triptófano, por 48 h (Wani *et al.*, 2007; Gaimster *et al.*, 2014).

*Prueba de óxido-fermentación Hugh-Leifson.* Permitió diferenciar el metabolismo oxidativo o fermentativo de los carbohidratos. Para ello se utilizaron 9 mL del medio base Hugh-Leifson que contenía triptona 10 g, extracto de levadura 1 g, púrpura de bromocresol 0.04 g, 2 g de agar y 10% de glucosa en 1 L de agua destilada, y pH ajustado a 7.2 (MacFaddin, 2003).

*Solubilización de fósforo.* A partir de bacterias cultivadas previamente en agar nutritivo por 48 h, se tomó una asada y se incubó en 3mL en medio Picovskaya por siete días bajo agitación (150 rpm) a 28° C (Sharma *et al.* 2011). Concluida la incubación, el medio se centrifugó a 10 000 rpm por 12 min (separación de la biomasa); el sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de fósforo soluble por el método de ácido vanadomolibdofosfórico descrito por Aguilera-Gracia y Pérez-Guerra (2016).

La caracterización enzimática fúngica se realizó sólo en aquellos endófitos que pudieran formar simbiosis con la vainilla. Esta caracterización consistió en sembrar un disco de 0.5 mm en placas con medio LMA (Sosa *et al.*, 2004); Picovskaya (Sharma *et al.* 2011); agar gelatina (Saksirirat y

Hoppe, 1991); agar almidón (Pochon y Tardieux; 1965; Rodríguez *et al.*, 2006); agar petona de carne Tween (Sierra, 1956; Ivonilde *et al.*, 2006); y agar Carboximetilcelulosa (Suyama *et al.*, 1993).

## **Identificación molecular**

### *Cepas bacterianas*

Los ácidos nucleicos se extrajeron con el método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) (Murray y Thompson, 1980; Wagner *et al.*, 1987). El cual consistió en agregar 1000 µL de CTAB (50 mM EDTA, pH 8.0; 200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 2.0 M NaCl, 2% (w/v); bromuro de cetil-trimetil amonio, 0.5% (w/v); PVP, Polyvinilpyrrolidona) a las muestras y se incubaron durante 60 min a 96 °C. Seguido de dos extracciones de proteínas con igual volumen de y cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) con sus respectivas centrifugaciones a 11500 g durante 10 min a 4 °C. El ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5,3; durante 60 min a – 20 °C. El precipitado de ADN genómico que se obtuvo por centrifugación a 11 500 g durante 5 min se lavó con etanol 70 % y se secó a temperatura ambiente, para después ser resuspendido en 50 µL de agua grado HPLC. Las extracciones de ADN total, de cada una de las muestras, se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 2000.

Debido a que en algunos casos el ADNtotal utilizado en las PCR no daba los resultados deseados, se optó por extraer el ADN bacteriano disminuyendo el tiempo de agitación para el lisado celular del protocolo del Kit Power Soil Isolation de MoBio.

Para la amplificación de la región 16S se emplearon los iniciadores univerales para microorganismos no fotobiontes 1391R (5´- GACGGGCGGTGTGTRCA – 3´) - 27F; 1492R (5´- TACGGYTACCTTGTTACGACTT - 3´) y 27F (5´- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG – 3´) (Lane *et al.*, 1991; Turner *et al.*, 1999). La reacción se realizó en tubos Eppendorf de 0.5 mL, en un volumen de reacción de 50 µL conteniendo: 4 µL de ADN total, la mezcla PCR Master Mix (2X) un par de primers. La reacción se colocó en un termociclador con los siguientes parámetros:



desnaturalización inicial de 1 minuto a 95 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por minuto, anillamiento a 53 - 55 °C por 1 minuto y extensión a 72 °C por un minuto, más una extensión final a 72 °C por 7 minutos. Al tenerse la buena amplificación a partir del ADN de las bacterias productoras de ácido idolácetico y solubilizadoras de fósforo, se procedió a la purificación con el Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), para enviar a secuenciar a los amplicones obtenidos, además se calculó la cantidad de pares de bases a través del programa de densitometría del Software Quany One del equipo de fotodocumentación Gel-Doc (Bio-Rad).

### *Endófitos fúngicos*

Debido a que los hongos endófitos son los que presentan una relación estrecha con la vainilla, éstos fueron analizados molecularmente. Para ello, la biomasa fúngica fue separada del medio de cultivo (PDA) mediante calentamiento, filtrada sobre rectángulos de tela organza (que por su tamaño de poro permite retener a la biomasa), se lavó 4 veces con 25 mL de solución fisiológica (NaCl al 0.9%) y un último enjuague con una solución buffer a pH 8 compuesta por: EDTA a 100 mM, NaCl al 150 mM y Tris HCl al 50 mM. Finalmente fue secada, sobre papel filtro. El procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones estériles. La biomasa se colocó en tubos eppendorf para su liofilización durante tres días a - 55 °C en un equipo para liofilización (Operon Freeze Dryer).

La obtención de ADN se realizó mediante el protocolo DNAzol Reagent; las extracciones de ADN total, se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, en donde se observó que el ADN estaba degradado, sin embargo contenía la calidad y tamaño suficientes para proceder con la amplificación de las regiones de los espaciadores intergénicos transcritos (ITS).

Para la amplificación de los espaciadores intergénicos transcritos se emplearon los iniciadores universales para hongos ITS1 (5´ - ATT ACG TCC CTG CCC TTT GTA CA - 3´) e ITS4 (5´ - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3´). La reacción se realizó en tubos Eppendorf de 0.5 mL, en un volumen de reacción de 50 µL conteniendo: 4 µL de ADN total, la mezcla PCR Master Mix (2X)

con los ITS1 y 4. La reacción se colocó en un termociclador con los siguientes parámetros: desnaturalización inicial de 1 minuto a 95 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por minuto, anillamiento a 55 °C por 1 minuto y extensión a 72 °C por un minuto, más una extensión final a 72 °C por 7 minutos. Al tenerse la buena amplificación de los hongos endófitos, se procedió a la purificación con el Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), para enviar a secuenciar a los amplicones obtenidos. Además, se calculó la cantidad de pares de bases a través del programa de densitometría del Software Quany One del equipo de fotodocumentación Gel-Doc (Bio-Rad).

Una vez obtenidas las secuencias, de las cepas fúngicas endófitas y bacterianas, por diferentes métodos descritos, fueron cotejadas y alineadas con los programas BioEdit y Blast del NCBI Network Service (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para identificarlas a nivel de género.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

De las poblaciones bacterianas estudiadas de los órganos aéreos y terrestres de *Vanilla planifolia*, se aislaron un total de 216 bacterias, de las cuales sólo 203 fueron viables después de la tercera resiembra, a las que se realizaron las pruebas enzimáticas para conocer su potencial en la producción de ácido indolacético y solubilización de fósforo, para después realizar su identificación molecular.

Las cepas fúngicas endófitas presentaron problemas para su conservación y viabilidad, por lo cual se aislaron otros hongos a partir de otras dos especies de orquídeas epífitas (*Prostecchia trulla* y *Brassovola cochleata*) de cultivo de invernadero.

## Caracterización de microorganismos

### Caracterización bacteriana

Los aislados bacterianos en general, fueron bacilos Gram positivos seguidos de los cocos (Fig. 9). Dichas bacterias fueron sometidas a las pruebas enzimáticas para determinar de manera cuantitativa la producción de ácido indolacético y su capacidad de solubilizar fósforo.

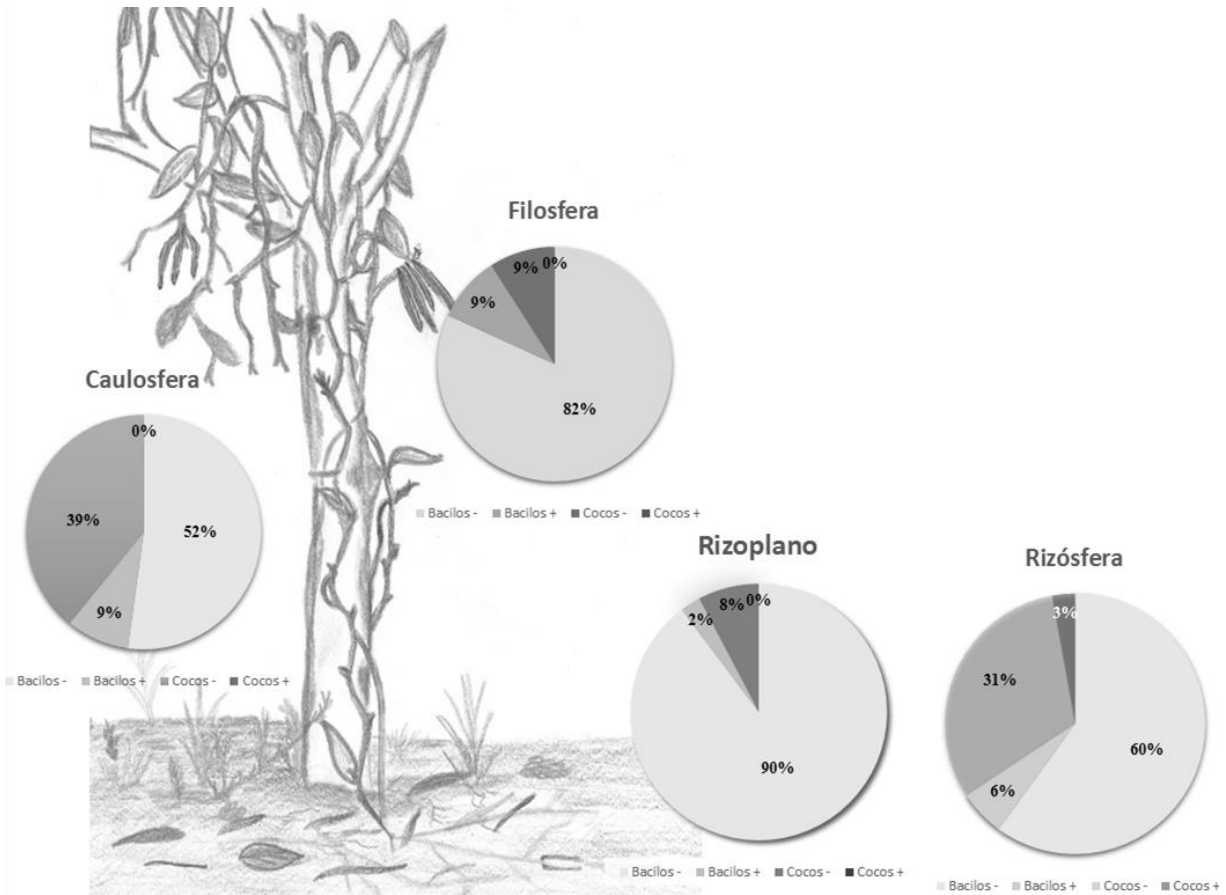


Figura 9. Distribución de bacterias Gram en una planta de *Vanilla planifolia*

Se detectó un microorganismo fotosintético (color verde), pero por no ser parte de los objetivos del presente trabajo se descartó su seguimiento, dado que también no produjo ácido indolacético ni solubilizó fósforo, aun cuando se presentó en hojas y en tallos; inicialmente se creyó que era una colonia contaminante que requería ser repurificada, porque el organismo de color verde crecía

encima de la colonia (Fig. 10A). Al observarse bajo estereoscopio a 200X se observó una colonia con diversas ramificaciones en su circunferencia (Fig. 10B). Al tomarse una muestra y observarse bajo microscopio, se observó a una bacteria de tipo Gram positiva (Fig. 10C-D) acompañada de espículas de color verde (Fig. 10E). Se sugiere continuar con su estudio en trabajos posteriores, por haberse aislado del medio Rennie (1981), específico para fijadores de nitrógeno de vida libre, y de acuerdo con Tsavkelova *et al.* (2003a-b), este tipo de organismos se encuentra en raíces adventicias de otras orquídeas epífitas y sirven de sustrato para hongos endófitos de esas raíces, además de ser auxiliares en la fijación de nitrógeno.

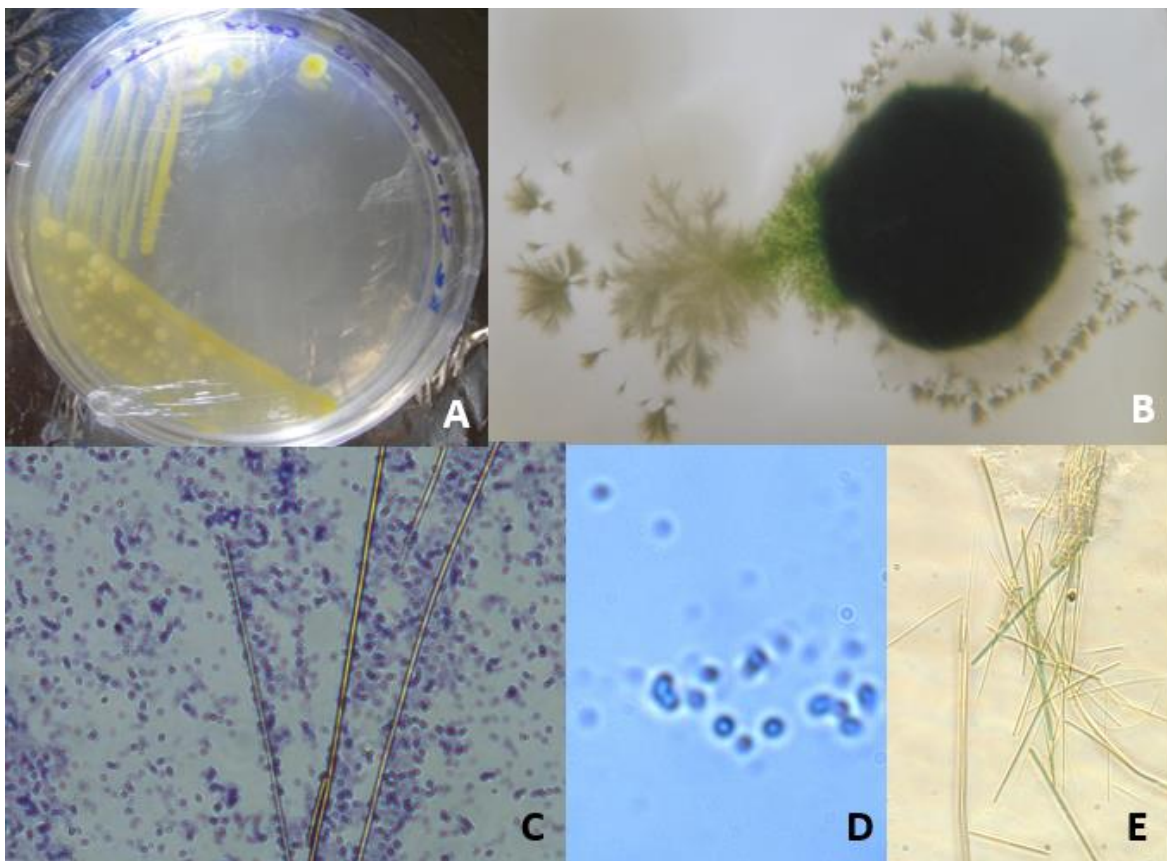


Figura 10. Cepa fotosintética aislada de la filosfera y caulosfera en medio Rennie (1981), A: macrofotografía de la colonia; microfotografías de la colonia “bacteriana”, se observan estructuras en forma de plumas en toda la circunferencia de la colonia (B, 200X), su asociación con la bacteria Gram positiva (C, 400X) cuya forma fue cocos (D, 1000X) y espículas de color verde (E, 600X).

### *Caracterización fúngica*

La cepa fúngica H1 (Fig. 11A), fue *Exophiala* sp., un ascomiceto de la familia Herpotrichiellaceae con colonia de color negro, aterciopelada con borde micelial; al microscopio tiene hifas septadas dematéaceas, con células conidiógenas periformes terminales, con presencia de melanina o pigmentos similares en la pared de color gris (Fig. 11B). Este género fúngico se asocia a la madera en descomposición y en suelo enriquecido con residuos orgánicos (Piontelli, 2013; Watanabe, 2010; Ainsworth, 2008).

La cepa H2 (Fig. 11C) fue un consorcio de dos géneros fúngicos: *Paecilomyces* - *Verticillium*, ambos ascomicetos, presentaron la formación de una colonia blanca con aspecto seco, de color amarillo marrón a rojo en el envés; microscópicamente mostraron dos tipos de hifas hialinas septadas, conidias hialinas de forma ovoide, pared lisa que forman cadena con sucesión basipétala (Watanabe, 2010; Ainsworth, 2008, Barnett y Hunter, 1998)

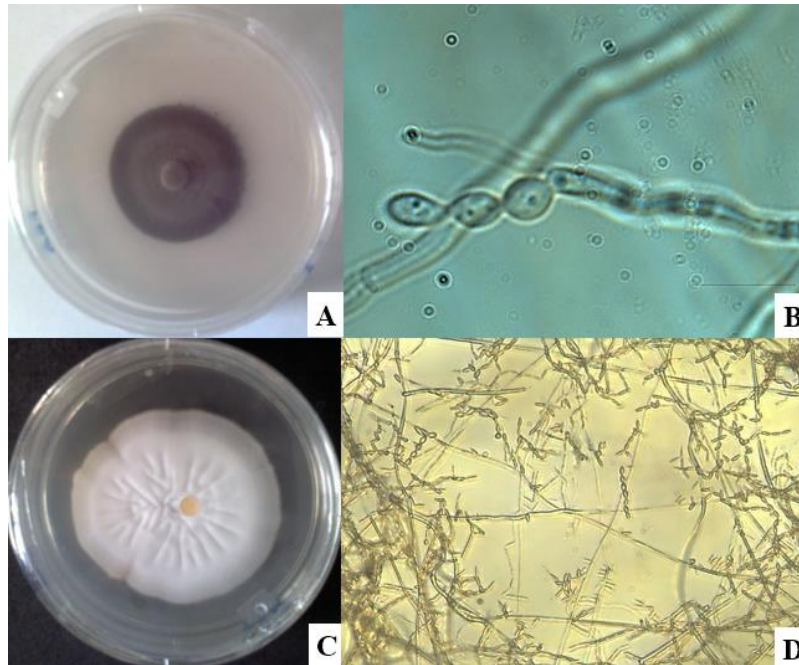


Figura 11. Macro (A y C) y microfotografías (B: 100X y D: 60X) de dos colonias fúngicas aisladas a partir de los pelotones de *Vanilla planifolia*, después de 30 días de incubación a 28 °C en PDA. La barra representa 10 μm. (A-B) Género *Exophiala* (H1) y (B-C) consorcio fúngico de los géneros *Paecilomyces* y *Verticillium*.

### Caracterización enzimática

La población bacteriana, de acuerdo a su actividad enzimática, varía en relación con los diferentes órganos de la vainilla (Fig. 12). Aquellas asociadas a la raíz de la planta y su zona circundante (Fig. 12 A-B) mostraron mejor potencial enzimático debido a que se encuentran las mejores condiciones para su desarrollo. Sin embargo, algunos estudios resaltan la competencia que existe por los recursos nutrimentales y de oxígeno. Se seleccionaron 20 bacterias que produjeron ácido indolacético y solubilizaron fosfato, y cuyas características se muestran en el Cuadro 5. El criterio de selección fue con base en las pruebas realizadas *in vitro*, que demostraron la habilidad que tienen para producir pequeñas cantidades de ácido indolacético (1 a 28 μg mL<sup>-1</sup>) en ausencia de un precursor fisiológico. Sin embargo, en presencia de triptófano, generalmente, puede producir gran cantidad de ácido indolacético (18 a 60 μg mL<sup>-1</sup>). Tales concentraciones fueron reportadas Tsavkelova (2005) como

concentraciones adecuadas para un efecto positivo en el crecimiento de orquídeas. En el presente estudio solo dos cepas bacterianas fueron excepciones a la aseveración de que el triptofano adicionado al medio de cultivo puede favorecer la producción de ácido indolacético por parte de las bacterias, éstas correspondieron a las cepas 12 y 24 (Cuadro 5).

La actividad enzimática de amilasas, proteasas y lipasas, para las cepas fúngicas endófitas aisladas (Cuadro 6) concuerdan con lo mencionado por la literatura. Además, para los hongos entomopatógenos como *Beauveria*, *Cordycep* y *Paecilomyces* se menciona la secreción de quitinasas (Peteira *et al.*, 2011; Téllez-Jurado *et al.*, 2009), y en aquellos hongos que causan problemas en la dermis en animales, como es el caso de los representantes del género *Exophiala*.

Sin embargo, no hay reportes bibliográficos que mencionen que las cepas H1 y H2 sean endófitos de la vainilla ni para *Cordyceps* sp. y *Beauveria* sp., o para las orquídeas epífitas *Prostecchia trulla* (Rchb.f.) W.E.Higgins y *Brassovola cochleata*, respectivamente. Las funciones de dichos géneros fúngicos en las orquídeas mencionadas aún son desconocidas.

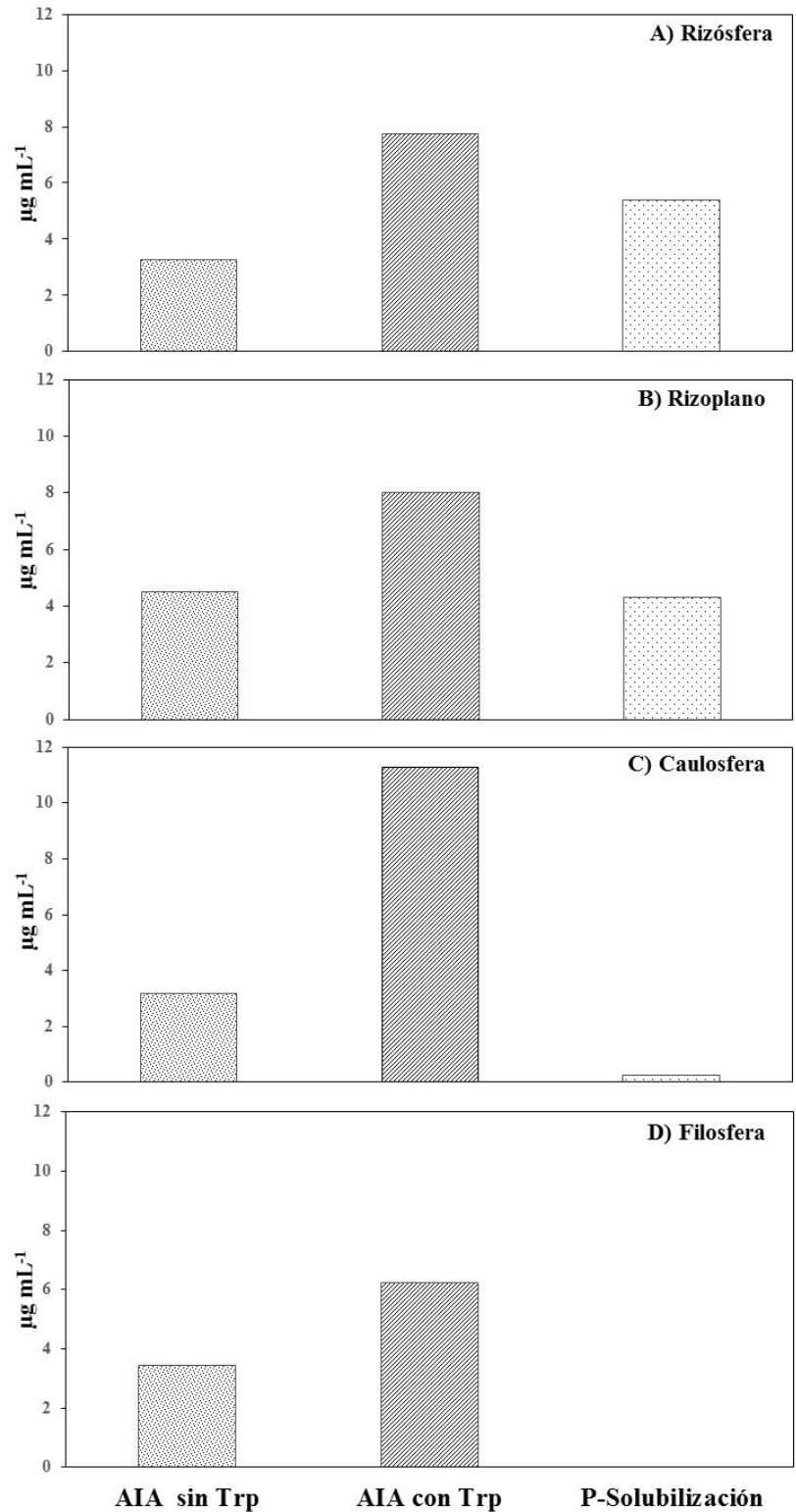


Figura 12. Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de la producción de ácido indolacético (AIA) con y sin triptófano (Trp), y solubilización de fosfato (P-solubilización) por bacterias aisladas de: A) rizósfera, B) rizoplano, C) caulosfera y D) filósfera de plantas de *Vanilla planifolia*.



**Cuadro 5. Actividad enzimática, pH al que trabaja y morfología bacteriana.**

Cepa	Pruebas					Hidrólisis				Tolerancia a la salinidad	pH	Tinción Gram
	Ácido indol acético µg mL <sup>-1</sup>		Solubilizadoras de fosfato µg mL <sup>-1</sup>	Catalasa	KOH	Celulíticos	Amilolíticos	Proteolíticos	Lipolíticos			
	Sin triptófano	Con triptófano										
2 RzVpV	1.7	1.5	4.8	+	-	-	+	-	+	+	Acido	B +
12 RzVpV	22.3	7.8	8.8	+	+	-	-	-	-	+	Acido	B -
14 RzVpV	4.1	9.6	8.9	+	+	-	-	-	-	+	Acido	B -
15 RzVpV	5.9	6.2	4.8	+	+	-	-	-	-	+	Alcalino	B -
23 RzVpV	10.3	9.6	4.8	+	+	+	-	-	-	+	Alcalino	B -
24 RzVpV	23.5	19.5	55.2	+	+	-	-	-	-	+	Alcalino	B -
25 RzVpV	3.8	8.4	42.1	+	+	-	+	-	-	+	Neutro	B -
32 RzsVpV	2.4	3.0	59.5	-	+	-	+	-	-	+	Alcalino	B -
34 RzsVpV	5.6	7.4	11.0	+	+	-	-	-	-	+	Neutro	B -
38 RzsVpV	3.3	8.8	1.3	+	-	-	-	-	-	+	Alcalino	B +
40 RzsVpV	3.2	3.1	6.8	+	+	-	-	-	-	+	Acido	B -
41 RzsVpV	4.0	2.9	26.1	+	+	-	-	-	-	+	Acido	B -
46 RzsVpV	3.9	3.9	0.6	+	-	-	-	-	-	+	Alcalino	C +
58 RzsVpV	3.8	3.2	6.0	+	+	-	-	-	-	+	Neutra	B -
92 RzVpV	2.3	5.8	8.8	+	+	-	-	-	-	+	Acido	B -
100 RzVpV	2.8	4.6	3.1	+	+	-	-	-	-	+	Alcalino	B -
101 RzVpV	3.6	4.0	46.4	+	+	-	-	-	-	+	Alcalino	B -
102 RzVpV	3.4	6.7	34.4	+	+	-	-	-	-	+	Alcalino	B +
110 RzVpV	3.4	37.4	95.4	+	-	-	-	-	-	+	Alcalino	B -
114 RzVpV	8.4	15.1	4.6	+	-	-	-	-	-	+	Ácido	B +
157 RzsVpV	1.5	1.3	3.4	+	+	-	-	-	-	+	Alcalino	B -

B = bacilos

C = cocos

RZ= rizoplano

RZs= rizósfera

Vp= *Vanilla planifolia*

V=Veracruz

**Cuadro 6. Actividad enzimática, pH al que trabaja las cepas endófitas fúngicas aisladas.**

Cepa	Género	pH	Hidrólisis			
			Celulolítica	Lipolítica	Amilolítica	Proteolítica
H1	<i>Exophiala</i>	Básico	-	+	-	Indeterminado
H2	<i>Paecilomyces/Verticillium</i>	Ácido	+	+	+	+
H3	<i>Cordyceps</i>	Ácido	+	-	+	Indeterminado
H4	<i>Beauveria</i>	Ácido	+	+	+	+

En los últimos años se resalta el interés de microorganismos con capacidad de hidrolizar celulosa para la formulación de compuestos limpiadores, en los procesos industriales de producción textil, de conservas y jugos frutales, así como en la industria papelera (Mikán y Suárez, 2004).

### **Identificación molecular**

#### *Cepas bacterianas*

Con las pruebas primarias de caracterización y pruebas bioquímicas (Gram, morfología, catalasa, producción de esporas) se conocieron las características generales para clasificarlas a nivel de género. Sin embargo, su identificación se realizó por el análisis molecular 16S, siguiendo los procedimientos previamente descritos. A continuación se muestran los geles de agarosa al 1.2% de donde se extrajo el ADN producto del PCR (Figs. 13 -15) y enviárló conjuntamente con las muestras al laboratorio BioGenetix para su secuenciación.

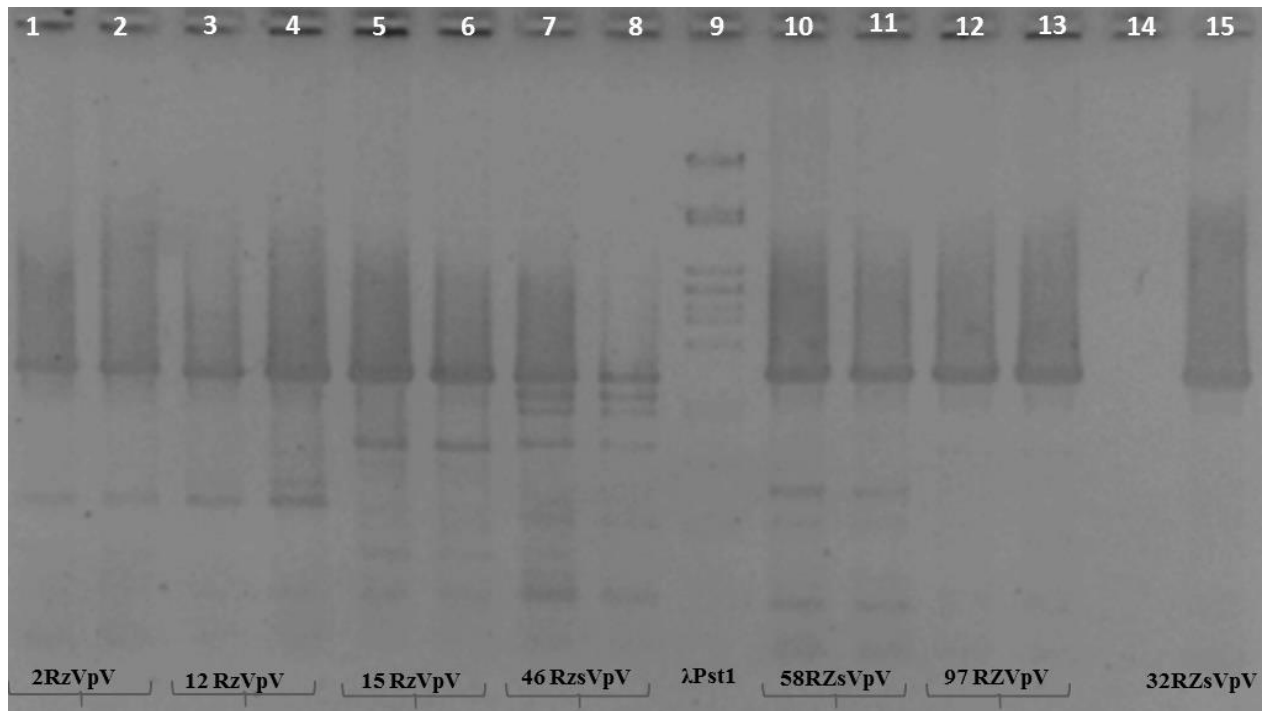


Figura 13. Gel de agarosa al 1.2%, que muestra el perfil de tamaños en pb, de los amplicones obtenidos de la región 16S de ADN de las rizobacterias (carril 1-8, 10-13, 15) por PCR utilizando el marcador de peso molecular  $\lambda$ Pst1 (carril 9).

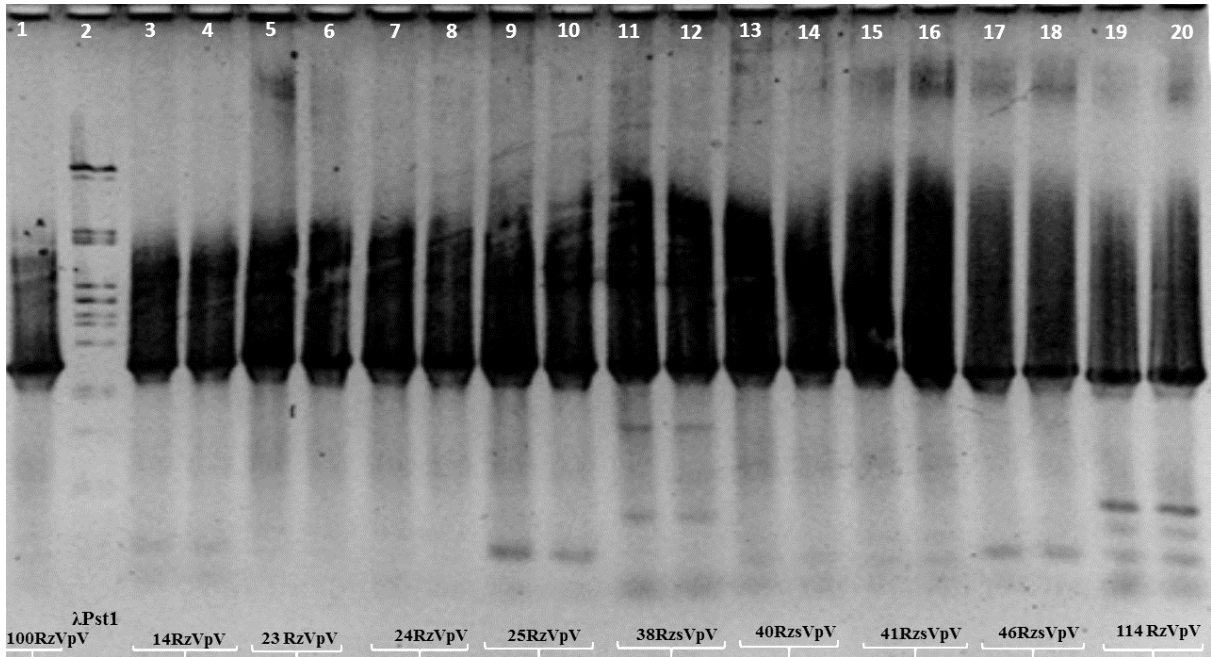


Figura 14. Gel de agarosa al 1.2%, que muestra el perfil de tamaños en pb, de los amplicones obtenidos de la región 16S de ADN de las rizobacterias (carril 1, 3-20) por PCR utilizando el marcador de peso molecular  $\lambda$ Pst1 (carril 2).

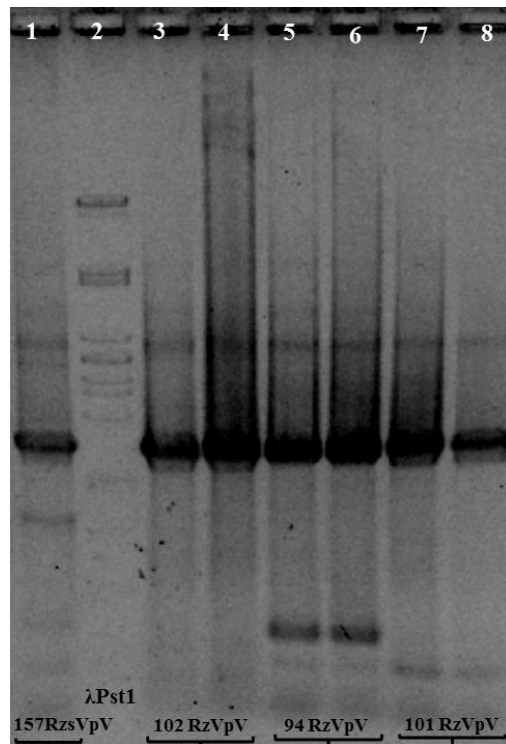


Figura 15. Gel de agarosa al 1.2%, que muestra el perfil de tamaños en pb, de los amplicones obtenidos de la región 16S de ADN de las rizobacterias (carril 1, 3-8) por PCR utilizando el marcador de peso molecular  $\lambda$ Pst1 (carril 2).

Una desventaja de las secuenciaciones para el presente trabajo, fue que no existían cepas dentro del GenBank para poder realizar la comparación, o que por las condiciones técnicas o de equipo en donde se desarrollan las secuenciaciones no hubo amplicones. Lo anterior sugiere que esta fase de investigación debe tener continuidad para poder realizar una publicación, y sustentar el ingreso de la secuencia al banco de información. En otros casos aunque se enviaron los iniciadores (primers) utilizados en las PCR y las condiciones de anillamiento, el laboratorio en donde se realizó la secuenciación marcó en los resultados que no se pudieron obtener las secuencias, lo cual queda aún pendiente, los técnicos dan la opción de enviar la cepa en un medio y condiciones específicas para que realicen el procedimiento y entreguen la secuencia del microorganismo.

La mayoría de las bacterias son Gram positivas formadoras de endosporas y pertenecieron a los géneros de *Bacillus* y *Paenibacillus*, las cuales son de suma importancia a nivel industrial (por la producción de enzimas y antibióticos) y ecológica (por la degradación de materia orgánica en condiciones de aerobiosis). Otras bacterias correspondieron a los géneros *Achromobacter* y *Pseudomonas*, con un 97 a 99 % de confiabilidad (Cuadro 7). A continuación se da una breve descripción de los géneros identificados:

El género *Achromobacter* algunos estudios sugieren que este género confiere resistencia a la planta en zonas contaminadas con hidrocarburos (Ho *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2016). A nivel de semillero, esta rizobacteria estimula el crecimiento en número y longitud de pelos radicales en plantas oleaginosas así como la absorción de nutrientes (nitratos y fosfatos) (Bertrand *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2005). En micropropagación, algunas especies pertenecientes a este género en combinación de ácido indolbutírico, han promovido el crecimiento de brotes, longitud de la raíz, número de raíces, contenido de clorofila, el contenido de nitrógeno, enzimas antioxidantes y la tolerancia al estrés en las etapas de aclimatación y postaclimatación (Benson *et al.*, 2014).

**Cuadro 7. Resultados del Blast realizado en el GenBank de la región 16S de las muestras de bacterias.**

Muestra	Secuenciación		
	Género	Pb	% similitud
2	<i>Paenibacillus</i>	372	97
12	-----	344	-----
14	-----	149	-----
15	-----	171	-----
23	-----	N	-----
24	-----	N	-----
25	-----	N	-----
32	-----	N	-----
38	-----	96	-----
40	<i>Bacillus</i>	270	98
41	-----	83	-----
46	-----	208	-----
58	-----	128	-----
92	-----	73	-----
100	-----	78	-----
101	<i>Achromobacter</i>	378	99
102	-----	79	-----
110	-----	N	-----
114	<i>Pseudomonas</i>	434	99
157	-----	N	-----

N = no se obtuvieron amplicones para la secuenciación  
 ----- = no se encontró secuencia de comparación en GenBank

*Bacillus* es un género positivo a catalasa, reportado comúnmente en la rizósfera de diversos cultivos por su capacidad de sobrevivir ante condiciones físicas desfavorables, teniendo un papel importante en los ciclos de carbono y nitrógeno (Calvo y Zuñiga, 2010; Rincón y Gutiérrez, 2012). Además de que algunos representantes del género solubilizan el fósforo y controlan algunos hongos patógenos del sistema de cultivo (Lara *et al.*, 2011; Sosa *et al.*, 2011).

*Paenibacillus* es un género que originalmente estaba incluido en *Bacillus* (Ash, 1993). Es un género anaerobio facultativo que forma endosporas, y ha sido detectado en diversos ambientes

(húmedos y áridos); tiene diversas aplicaciones (médica, industrial, hortícola y agronómica) por su rápido crecimiento. Tiene múltiples capacidades enzimáticas como son la producción de ácido indolacético, solubilización de fósforo y secreción de sustancias antimicrobianas que afectan un amplio espectro de microorganismos, además de tener miembros promisorios como agentes biológicos (Ghazalibiglar *et al.*, 2016). Otro género identificado fue *Pseudomonas* que se caracteriza por tener una amplia diversidad y presentarse ampliamente en el ambiente, tienen la capacidad de adaptarse a varias condiciones y de degradar diferentes sustratos. El grupo fluorescente ha demostrado ser controlador de fitopatógenos (Glickmann *et al.*, 1995; Santoyo *et al.*, 2010).

#### *Endófitos fúngicos*

Los amplicones obtenidos a partir de la PCR (Fig.8) oscilaron entre 756 a 681 pb. Este tamaño coincide con el reportado para la región ITS de algunas especies de hongos filamentosos, por lo que fueron seleccionados para la fase de secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos de la NCBI y se identificaron los géneros *Exophiala* (cepa H1), y *Paecilomyces-Verticillium* (consorcio fúngico, cepa H2).

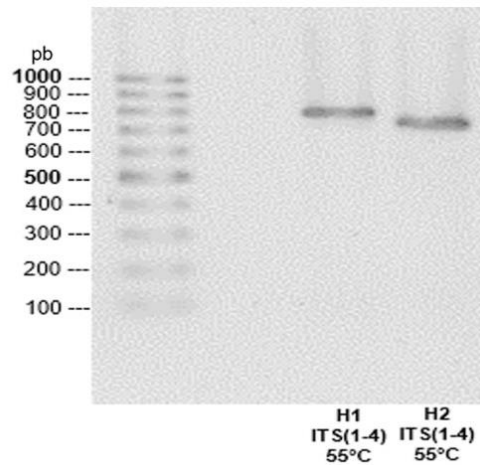


Figura 16. Gel de agarosa al 1.2% que muestra el perfil de tamaños en pb, de los amplicones obtenidos de la región ITS a partir de ADN de los hongos endófitos orquidoides por PCR utilizando el marcador de peso molecular  $\lambda$ Pst1.

Los hongos endófitos además ayudan a la incorporación de algunos nutrientes como el fósforo (Gamboa-Gaitán, 2014) y pueden tener importancia en la estimulación del crecimiento por algunos metabolitos generados por el hongo, o por favorecer su síntesis en la planta, como es el caso de los hongos endófitos identificados en el presente trabajo. El hongo H1 perteneció al género *Exophiala* (Cuadro 8) que son considerados como patógenos oportunistas y hongos endófitos asociados a las hojas de orquídeas como *Cattleya percivaliana* y *C. trianaei* (Lizarazo-Medina *et al.*, 2015) o a la raíz (hongos septados oscuros; DSE). Asociado con *Cucumis sativus* L., estimula su crecimiento por la producción de giberelinas, favorece su resistencia al estrés hídrico y a la salinidad (Khan *et al.*, 2011). Además, favorece la tolerancia de *Zea mays* L., a altas concentraciones de plomo, zinc, y cadmio (Li *et al.*, 2011; Diao *et al.*, 2013). Otros hongos septados oscuros (*Phomopsis* sp.) se han reportado en otras orquídeas mexicanas (*Cypripedium irapeanum* Lex) (Valdés *et al.*, 2011); sin embargo, la relación simbiótica de los DSE con las plantas es ambigua, debido a que puede ser un débil patógeno, un saprobio en tejidos de la raíz senescente, o un mutualista (Jumponnen 2001;



Urcelay *et al.*, 2005; Knapp *et al.*, 2015), o bien, tener actividad antibacteriana, y se presnetan durante el compostaje (Ryckeboer *et al.*, 2003).

El hongo H2 (Cuadro 8) correspondió a un consorcio formado por dos géneros *Paecilomyces* y *Verticillium*. El primer hongo se considera un género cosmopolita de suelo y plantas; algunas especies son aprovechadas por su antagonismo hacia nematodos o insectos (Dávila y Clímaco, 2005; Chan *et al.*, 2010) y/o para descontaminar ambientes acuáticos (Cardenas y Acosta, 2011). Mientras que *Verticillium* incluye especies saprófitas y parásitas de plantas superiores (Gil *et al.*, 2014), es uno de los géneros representantes de la marchitez vascular, y se reporta como endófito de *Dendrobium* (Riveros, 2010), pero no para vainilla.

Porras y Bayman (2007) y Ordoñez *et al.* (2012) mencionan que los representantes endófitos fúngicos más sobresalientes de vainilla pertenecen a los representantes del grupo *Ceratobasidium* de la forma-género *Rhizoctonia*, así como los géneros *Phomopsis*, *Hypohylon*, *Phoma*, *Trichoderma* y *Bipolaris*. Por lo tanto, este trabajo reporta por primera vez que *Exophiala*, *Paecilomyces* y *Verticillium* están presentes como endófitos para vainilla.

Las cepas H3 y H4 se utilizaron en una fase posterior en donde se determinar si existente o no compatibilidad entre las rizobacterias con potencial biotecnológico y hongos endófitos aislados de la vainilla. Debido a que el tiempo requerido para llevar a cabo los análisis moleculares para identificación es enorme, pero es recomendable generar y utilizar kits que faciliten el trabajo de extracción y purificación de ADN para la identificación de los microorganismos; o bien, recurrir a cooperaciones interdisciplinarias para la agilizar tal procedimiento. Lo anterior debido a que existen microorganismos que pueden resultar con un potencial biotecnológico para otras áreas del conocimiento.

**Cuadro 8. Resultados de la identificación molecular de muestras de hongos endófitos orquidioides mediante la comparación de secuencias ITS.**

Muestra	ITS	pb	SECUENCIACIÓN	
			Género	Similitud (%)
H1	1-4	756	<i>Exophiala</i>	98
H2	1-4	681	<i>Paecilomyces/Verticillium</i>	99 / 98
H3	1-4	442	<i>Cordyceps</i>	99
H4	1-4	417	<i>Beauveria</i>	99

## CONCLUSIONES

El conocimiento de los microorganismos autóctonos con diversos potenciales enzimáticos, pueden ser evaluados y utilizados a futuro como biofertilizantes. Sin embargo, recordemos que existe un gran número de microorganismos que aún no han sido estudiados debido a que no consideramos que tengan importancia económica, ecológica, farmacéutica o de aprovechamiento para el ser humano y que en diversas ocasiones, los investigadores los ignoran por estar fuera de su línea de investigación.

El aislamiento y conservación de los hongos endófitos de raíz es difícil; sin embargo, este trabajo reporta tres géneros fúngicos (*Exophiala* y el consorcio fúngico *Paecilomyces-Verticillium*) que son endófitos de la raíz de vainilla.

## CAPÍTULO VI

### **Interacción de rizobacterias (productoras de ácido indolacético y solubilizadoras de fósforo) y hongos endófitos aislados de *Vanilla planifolia***

#### **RESUMEN**

La interacción planta-microorganismo es de importancia en la biología de plantas; sin embargo, la información es incipiente para *Vanilla planifolia*, debido a que los trabajos se han dirigido más para el control biológico de plagas o enfermedades, con respecto a la nutrición de la planta. Recientemente se han explorado algunos endófitos de vainilla silvestre, con fines de uso como bioinoculantes, y garantizar una producción más orgánica con alta demanda comercial. El presente trabajo determinó la compatibilidad de cepas bacterianas promotoras del crecimiento con hongos endófitos al inocularse de manera combinada en dos medios de cultivo (Melin-Norkrans y PDA). Las únicas cepas que estimularon el crecimiento de los hongos endófitos de raíz fueron la rizobacteria 34 para *Exophiala* sp., y las rizobacterias 41 y 102 para el consorcio fúngico. De manera general, se observó inhibición del crecimiento hifal (hasta 70%.) de las cepas (H2, consorcio *Paecilomyces-Verticillium*; H3, *Cordyceps* sp.; y H4 *Beauveria* sp.) por efecto de las rizobacterias 12, 15, 23, 24, 25, y 114, con respecto al testigo. La cepa 114 (*Pseudomonas*) inhibió el crecimiento de las cuatro cepas fúngicas evaluadas; para las bacterias restantes se recomienda realizar pruebas de antibiosis para hongos patógenos de vainilla.

**Palabras clave:** compatibilidad microbiana, antibiosis, crecimiento fúngico, inhibición fúngica

## CHAPTER VI

### **Interaction between rhizobacteria (índole acetic acid producing and P-solubilizers) and endophyte fungi isolated from *Vanilla planifolia***

#### **ABSTRACT**

The plant-microorganism interaction is an important issue in biology; however, there is scarce information for *Vanilla planifolia* since most of the research has been directed to biological control of pest and diseases when compared to plant nutrition. Recently, some endophytes of vanilla have been studied as inoculants directed to the organic production of vanilla. The present study determined the compatibility of plant growth promoting bacteria with fungal endophytes under two culture media (Melin-Norkrans and PDA). The bacterial strain 34 stimulated the fungal growth of *Exophiala* sp., and the strains 41 and 102 stimulated the growth of the fungal consortium. Overall, the bacterial strains 12, 15, 23, 24, 25, and 114 resulted in 70 % inhibition of the fungal strains (H2, consortium *Paecilomyces-Verticillium*; H3, *Cordyceps* sp.; and H4 *Beauveria* sp.) when compared to the corresponding fungal control. The bacterial strain 114 (*Pseudomonas*) inhibited the growth of the four fungal strains; the remaining bacteria need further evaluation for antibiosis against fungal pathogens for vanilla.

**Key words:** microbial compatibility, antibiosis, fungal growth, fungal inhibition

## INTRODUCCIÓN

La interacción entre los componentes de una comunidad microbiana puede manifestarse de diferentes modos. Al respecto, hace algunos años se hicieron intentos aislados para evaluar los sinergismos entre algunas asociaciones de microorganismos del suelo, para el control biológico de agentes causales de enfermedades en las plantas (Alfonso y Galán, 2006; Jaizme-Vega y Rodríguez-Romero, 2008; Jiménez-Quesada *et al.*, 2015). Dichas interrelaciones son continuas dentro de una planta, los microorganismos existentes en la planta se encuentran en competencia por un nicho ecológico o nutrimento, manifestando sus efectos en el crecimiento y desarrollo de la planta de manera sinérgica, antagónica o simplemente neutra (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013). Tal manifestación depende de la capacidad de cada microorganismo para mantenerse y soportar el grado de defensa de acuerdo a la etapa de desarrollo de la planta. Las bacterias *Pseudomonas fluorescens* y *Azospirillum* se ha recomendado para el control de enfermedades causadas por *Fusarium*, mientras que las bacterias solubilizadoras de fósforo promueven el crecimiento vegetal (Anilkumar, 2004).

Dentro del grupo de bacterias resaltan las promotoras del crecimiento (PGPR; por sus siglas en inglés), las cuales al interactuar con hongos micorrízicos tienen funciones beneficiosas (Artursson *et al.*, 2006), aunque sus mecanismos no están muy bien comprendidos. Algunos mecanismos parecen ser más indirectos como la influencia de las bacterias sobre los hongos micorrízicos (Tarkka y Frey-Klett, 2008) o bien, tener influencia en la fisiología de las plantas. Otros efectos son directos (sinergismo), donde las bacterias proporcionan a la planta ciertos compuestos (compuestos ricos de nitrógeno, fitohormonas, hierro, o fósforo), produciendo un beneficio a la planta (Barea *et al.*, 2002; Sarabia *et al.*, 2010).

Las comunidades fúngicas endófitas por su parte, protegen a las orquídeas de patógenos mediante la síntesis de metabolitos secundarios o por el mejoramiento en su nutrición; además, favorecen la

producción de biomasa aérea, longitud de raíces y altura de la planta (Ordóñez *et al.*, 2012). Sin embargo, existe escasa información sobre la interacción entre las rizobacterias y los hongos endófitos en orquídeas epífitas. Por ello y partiendo en que la mayor parte de los microorganismos que forman relaciones benéficas o neutras con las orquídeas han sido poco estudiadas, los estudios moleculares han demostrado una gran variedad de especies y géneros (Ávila-Díaz *et al.*, 2013).

Con base en lo anterior y con la finalidad de conocer qué rizobacterias eran compatibles con las cepas fúngicas endófitas aisladas de raíz, se propuso confrontar las cepas bacterianas con los hongos endófitos en dos medios de cultivo, al inocularlos de manera combinada (cultivos duales).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivos duales hongo *versus* bacterias

Las cuatro colonias fúngicas aisladas de las orquídeas epífitas, *Vanilla planifolia* (cepas H1- H2), *Prostechea trulla* (cepas H3), y *Brassovola cochleata* (cepa H4) obtenidas a partir de pelotones, fueron crecidas en agar papa dextrosa (PDA), y se dejaron crecer a 28°C durante tres semanas. Posteriormente, se colocaron discos de micelio de cada hongo, de 0.5 mm de diámetro en 20 mL de los medios de Melin y Norkrans (1948) y de PDA, en cajas de Petri de 10 cm de diámetro. Las bacterias fueron inoculadas al trazar una línea de cultivo bacteriano de 4 cm, a una distancia de 3 cm del margen de la caja (Fig. 17).

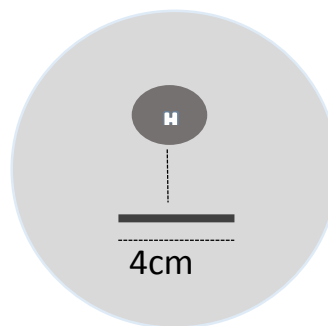


Figura 17. Esquema para realizar los cultivos duales en cajas de Petri.

Para cada prueba se realizaron cuatro repeticiones, al mismo tiempo se estableció un control del crecimiento fúngico de los diferentes géneros ensayados sin bacterias. Las cajas fueron incubadas a temperatura ambiente en oscuridad. En cada caja de Petri se midió el crecimiento fúngico a los 6, 9, 12 y 15 días después de la inoculación bacteriana. Los datos se utilizaron para determinar si existía compatibilidad entre la rizobacteria y la cepa fúngica, y se consideró como compatibles si el crecimiento micelial no era limitado o ainhibido por la bacteria. Además, de corroborarla mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Crecimiento} = \left( \frac{(\text{Muestra} * 100)}{\text{Testigo}} * 100 \right) - 100$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Cultivos duales hongo *versus* bacterias

El comportamiento de las cepas fúngicas en los cultivos duales mostró variaciones en su respuesta (Figs. 18-21). La cepa H1 *Exophiala* sp., al estar con la rizobacteria *Pseudomonas* sp. (Bacteria 114) presentó inhibición en su crecimiento, conforme transcurría el tiempo, en ambos medios de cultivo (Melin-Norkrans y PDA) con 54% y 70%, respectivamente. Efecto similar sucedió con el consorcio de *Paecilomyces-Verticillium* cepas H2 (Fig. 18 C y D). Este efecto concuerda con lo reportado por Santoyo *et al.* (2010) y Cano (2011) quienes mencionan la capacidad del género *Pseudomonas* como controlador biológico por excelencia, contra patógenos en otros cultivos (Paredes-Escalante, 2009; Trujillo *et al.*, 2007).

La cepa *Exophiala* sp. mostró estimulación en su crecimiento con las bacterias 14, 34 y 157, las cuales corresponden a las rizobacterias de valores bajos en cuanto a la capacidad de producción de ácido indolacético y solubilización de fosfato (Cuadro 5), cuyos valores oscilan de 1 a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  y de 3 a 11  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente. Para el consorcio fúngico *Paecilomyces-Verticillium* (H2) la mayoría de las cepas bacterianas inhibieron su crecimiento durante el transcurso de los 15 días de

incubación, y sólo tres rizobacterias fueron las que estimularon su crecimiento: 2 (*Paenibacillus* sp.), 41 y 102, con un intervalo del 40 hasta un 67%, en ambos medios de cultivo (Fig. 19).

*Cordyceps* sp. (cepa H3) no presentó una inhibición tan marcada ante *Pseudomonas* en comparación con las dos cepas fúngicas anteriores. Para este hongo, las bacterias que mayor efecto inhibitorio tuvieron, en ambos medios, fueron las cepas 24 y 41 con porcentajes de inhibición del 11 al 20 %. La bacteria que más redujo el crecimiento hifal de *Cordyceps* sp. fue la cepa 41, misma que presentó menor producción de enzimas hidrolíticas (Fig. 20). Este hongo presentó una muy baja actividad en su comportamiento con las rizobacterias. Las rizobacterias que inhibieron el crecimiento de *Beauveria* sp. (cepa H4) en un intervalo de 15 a 45 % fueron las cepas bacterianas 12, 24, 40, y 114, está última correspondiente al género *Pseudomonas*. El mayor crecimiento hifal fue en PDA fue obtenido con la bacteria 2 (*Paenibacillus* sp.) y con a cepa 102. Las bacterias restantes no presentaron inhibición o estimulación en el crecimiento hifal (Fig. 21).

Debido a que los hongos crecen lento, se observaron a los 15 días algunos cambios en la morfología o coloración de los medios de cultivo, por lo que se decidió dejarlos hasta los 20 días después de la siembra combinada (hongo-bacteria) para observar si se mantenían dichos cambios (Fig. 22). De manera general, las confrontaciones en donde hubo compatibilidad no mostraron cambios significativos en el crecimiento hifal (Fig. 22 E-H), algunas zonas del micelio se veían brillosas debido a que la bacteria estaba creciendo conjuntamente con el hongo (Fig. 22E) con respecto a los testigos (sin inoculación de bacteria) (Fig. 22A-B). Las bacterias que inhibieron el crecimiento hifal cambiaron la morfología de la colonia o indujeron cambios en el medio de cultivo como formación de halos (Fig. 22K) u oxidación (Fig. 22L). Por estas observaciones, se sugiere realizar estudios para observar cambios en la estructura morfológica del hongo a nivel microscópico, y determinar cuáles son las sustancias secretadas por las bacterias que hacen cambiar la pigmentación del hongo y del medio.



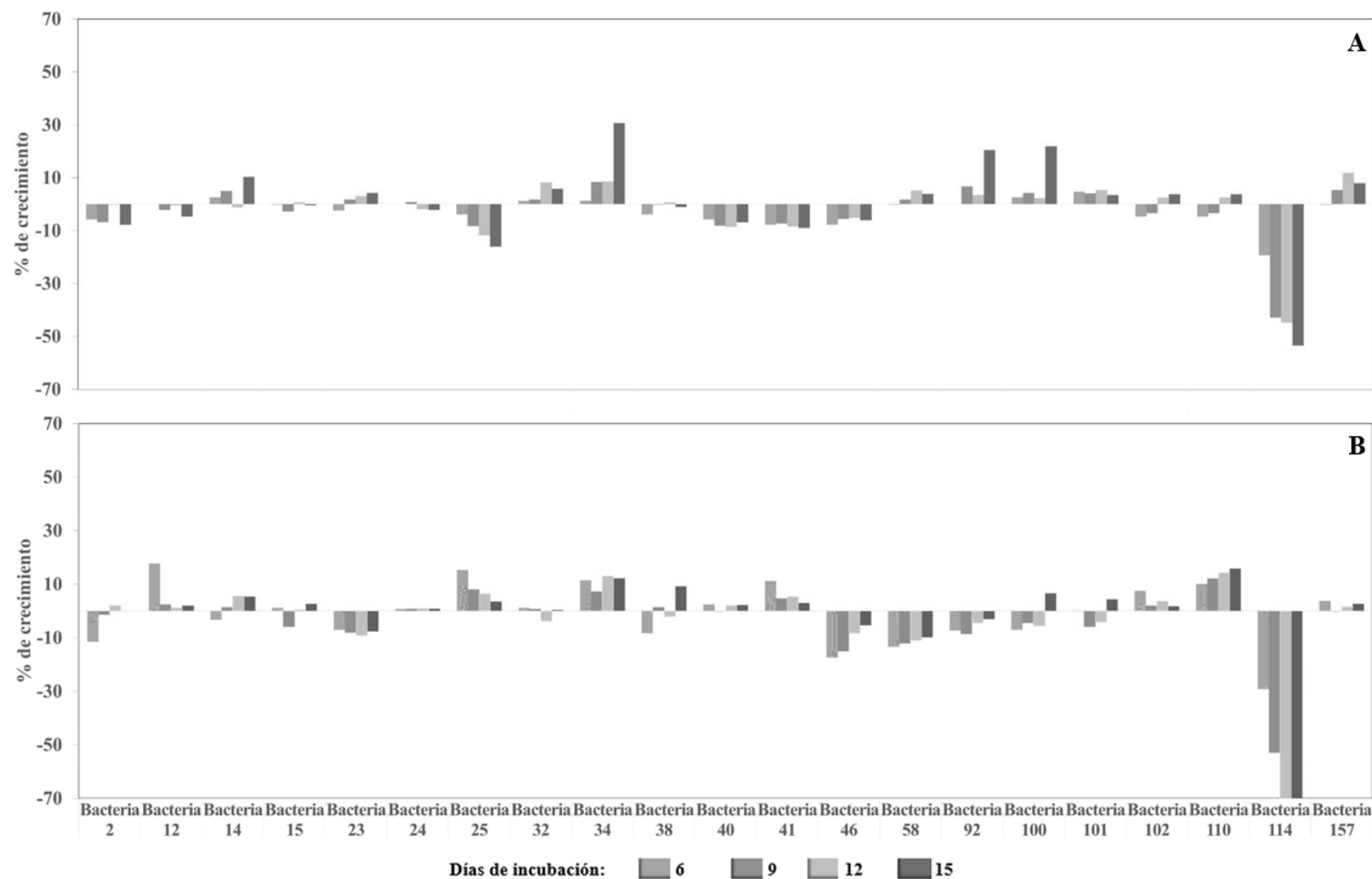


Figura 18. Efecto de las rizobacterias en el crecimiento del género fúngico *Exophiala* sp. durante quince días de incubación a 28 °C a oscuridad y sembrados en los medios de cultivo Melin-Norkrans (A), o PDA (B).

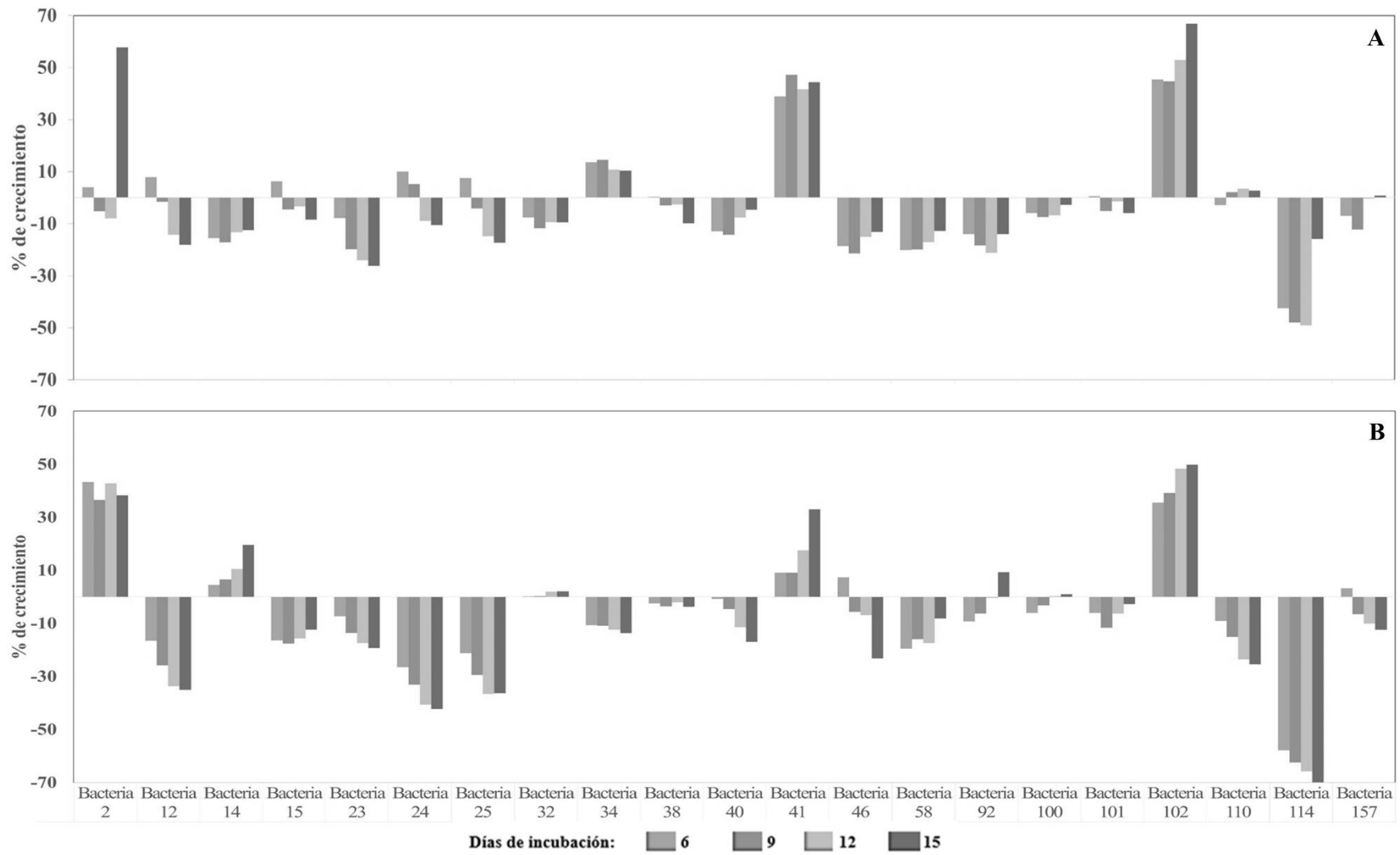


Figura 19. Efecto de las rizobacterias en el crecimiento del consorcio fúngico *Paecilomyces - Verticillium* sp. durante quince días de incubación, con dos medios de cultivo: Melin-Norkrans (A), o PDA (B).

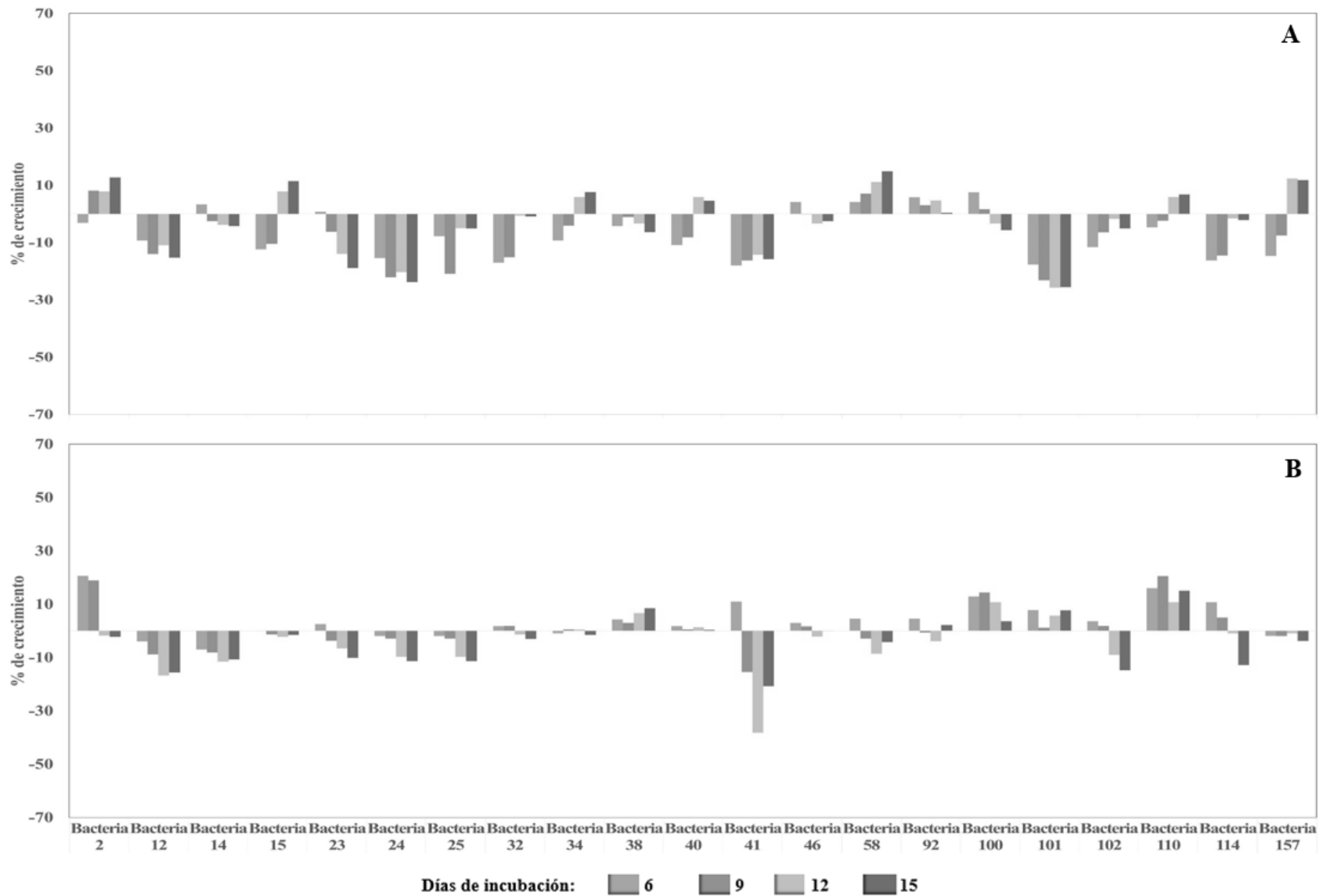


Figura 20. Efecto de las rizobacterias en el crecimiento del género fúngico *Cordyceps* sp. durante quince días de incubación a 28 °C a oscuridad, en los medios Melin-Norkrans (A) y PDA (B).

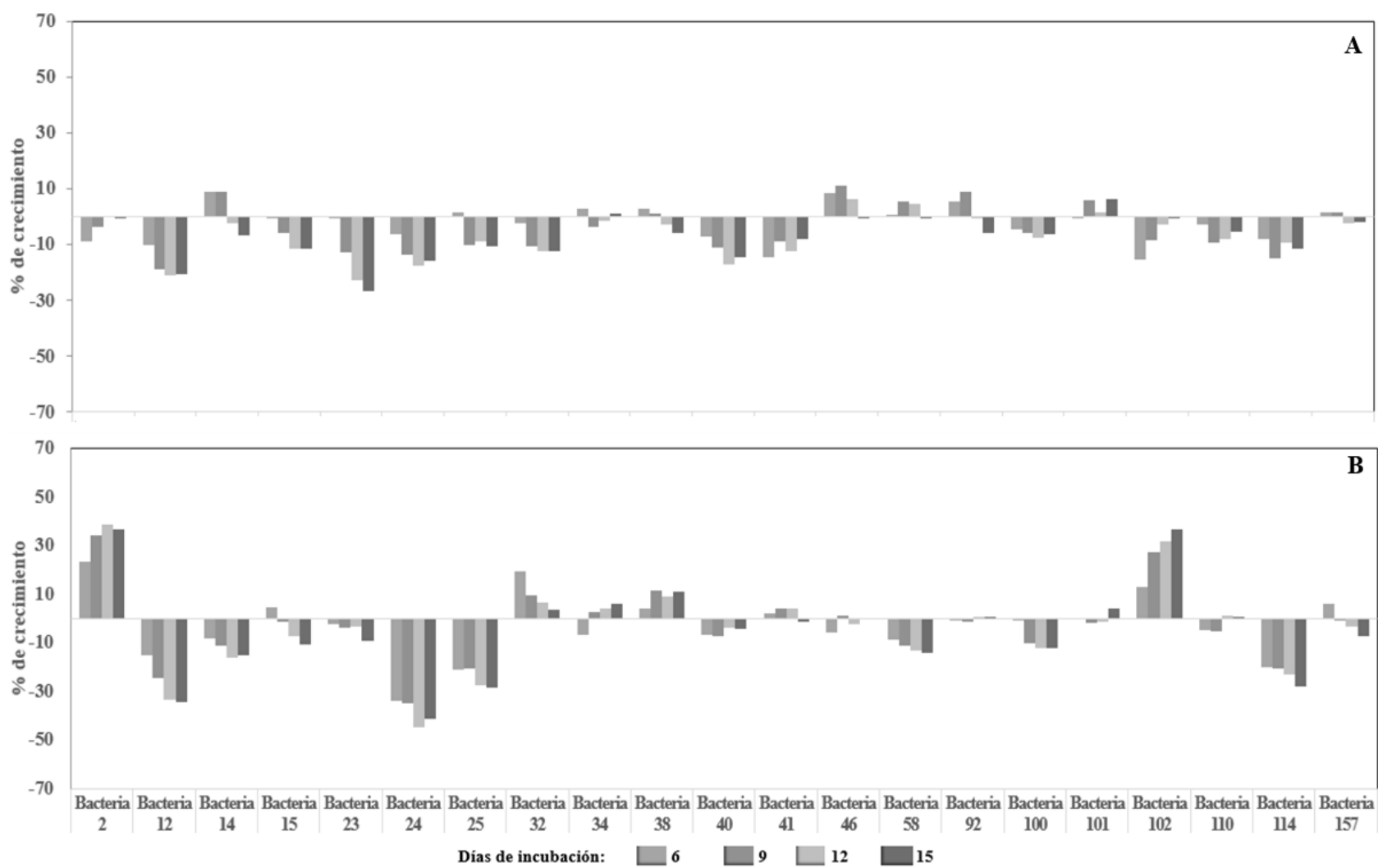


Figura 21. Efecto de las rizobacterias en el crecimiento del género fúngico *Beauveria* sp. durante quince días de incubación, con dos medios de cultivo: Melin-Norkrans (A y C), o PDA (B y D).

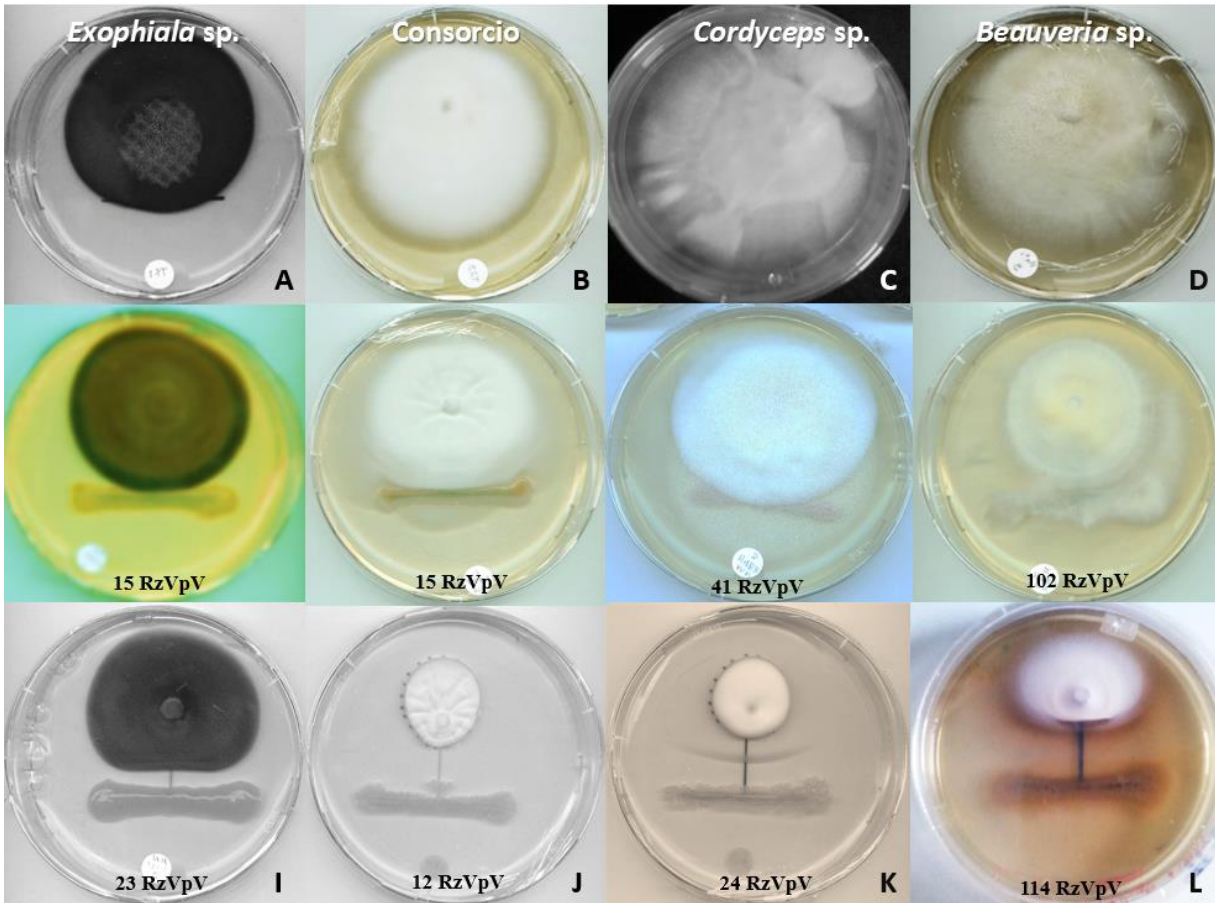


Figura 22. Cultivos duales incubados a 28 °C durante 20 días. (Hongo endófito versus rizobacterias productoras de ácido indolacético y solubilizadoras de fósforo) A – D: testigos fúngicos, E – G: hifas en contacto con las bacterias sin observarse cambios en la morfología e; I – L: inhibición del crecimiento hifal donde se observan modificaciones en la forma de la colonia en comparación al testigo, producción de metabolitos que forman un tipo de halo (K) o cambian la coloración del medio de cultivo (L).

Con base en lo mencionado por Fakhrunnisa y Ghaffar (2006), las bacterias que se entremezclan con el crecimiento fúngico endófito son consideradas como mutualistas, como ocurrió con las cepas bacterianas 15 y 41; mientras que la interacción en donde el crecimiento del hongo ha cesado en presencia de bacterias representa una inhibición (Fig. 22 H-L). La Fig. 22 I representa un ejemplo de inhibición debida a la cercanía del hongo con la bacteria (4 mm), la cual genera una línea demarcada de inhibición. Este fenómeno se observó en las cepas bacterianas 12, 24 y 114, cuya inhibición fue mayor a los 4mm, resultando en crecimiento hifal, prácticamente nulo.

La inhibición del crecimiento radial fúngico pudo deberse a tres razones: 1) a la producción de metabolitos (antibióticos) difusibles en el medio (Leifert *et al.*, 1994), como se observó en las cepas 12, 24 y 114 (Fig. 22), en la que no hay contacto entre el hongo y la bacteria. 2) A la producción de enzimas hidrolíticas (como quitinasas y  $\beta$ -1-3-glucanasas) (Prapagdee *et al.*, 2008), mismas que no se estudiaron en el presente trabajo, y que podría realizarse para las rizobacterias aisladas; o bien 3) a la composición del medio, como lo mencionado por Kumar *et al.* (2009), que observaron una máxima producción de antifúngicos de *Bacillus subtilis* en medio de caldo de soya tripticasa y una pobre producción en caldo nutritivo.

En la literatura se ha descrito que los metabolitos secundarios fúngicos tienen una acción de protección de una planta hacia los insectos herbívoros, y un buen número de estos metabolitos tienen potencial antimicrobiano (Sánchez-Fernández *et al.*, 2013).

## CONCLUSIONES

El crecimiento de los hongos endófitos aislados de raíz fue inhibido por la mayoría de las rizobacterias. Sólo la cepa 34 favoreció el crecimiento de *Exophiala* sp.; mientras que las cepas 41 y 102 favorecieron el crecimiento del consorcio formado por *Paecilomyces-Verticillium*. Lo anterior sugiere que las rizobacterias ejercen control en las interacciones fúngicas con la vainilla. Aquellas rizobacterias con marcada actividad antagónica podrían ser utilizadas en investigaciones futuras para el control de hongos patógenos para este cultivo.

## CAPÍTULO VII

### Comportamiento de la asociación o establecimiento de hongos endófitos aislados de raíz en plántulas de *Vanilla planifolia* en condiciones *in vitro*

#### RESUMEN

En los últimos años se han dedicado esfuerzos a estudiar la interacción planta-microorganismo, en particular en aquellos microorganismos que forman simbiosis, con los que producen antibiosis hacia depredadores o aquellos usados para el biocontrol de plagas. Las rizobacterias han comprobado tener efectos positivos sobre el crecimiento y desarrollo de estructuras vegetales, debido a las sustancias fisiológicamente activas producto de sus interacciones. Por tal motivo este trabajo muestra bioensayos *in vitro* con plántulas de *Vanilla planifolia* y los hongos endófitos para determinar si existía una asociación o estímulo del crecimiento vegetal. Las plantas de vainilla no mostraron efectos benéficos de los hongos endófitos de la raíz en la longitud ni en el peso de las plantas (fresco y seco); además, no se observó evidencia microscópica de que se haya establecido una simbiosis entre los hongos y la vainilla. Con el fin de evaluar potenciales efectos negativos de los hongos endófitos en plantas diferentes a la vainilla, se realizó un bioensayo con semillas de rábano (*Raphanus sativus* L.) inoculadas con 12 rizobacterias (2 RzVpV, 12 RzVpV, 14 RzVpV, 24 RzVpV, 25 RzVpV, 32 RzsVpV, 34 RzsVpV, 40 RzsVpV, 41 RzsVpV, 46 RzsVpV, 102 RzVpV, 110 RzVpV) y los hongos endófitos. En dicho bioensayos se observó que los microorganismos no afectaron la germinación de las semillas de rábano, pero sí el desarrollo vegetativo. Sólo la cepa 32 favoreció el crecimiento del rábano, pero la cepa 2 (*Paenibacillus* sp.) lo inhibió. *Exophiala* sp. fue el único endófito fúngico que favoreció el crecimiento del rábano mientras el consorcio *Paecilomyces-Veticillium* y la cepa de *Beauveria* inhibieron su desarrollo.

**Palabras clave:** inhibición, crecimiento vegetativo, desarrollo de estructuras, efectos negativos

## CHAPTER VII

### **Behavior of the association or establishment of fungal endophytes in seedlings of *Vanilla planifolia* under *in vitro* conditions**

#### **ABSTRACT**

In recent years, research efforts have been directed to study plant-microorganism interactions, particularly those that establish symbiosis, produce antibiosis, or exert the biocontrol of pests. The rhizobacteria have positive effects on growth and development of plants due to the release of physiologically active substances as a product of their interactions. Thus, this study shows *in vitro* bioassays with seedlings of *Vanilla planifolia* to determine the potential benefits of fungal endophytes on plant growth. The total length and biomass (fresh or dry) of vanilla plants did not show benefits by fungal endophytes; moreover, no microscopic evidence was observed for stating that the fungal symbiosis was established in vanilla roots. In order to evaluate the potent negative effects of the fungal endophytes on different plants species than vanilla, another bioassay was performed with seeds of radish (*Raphanus sativus* L.), either inoculated with 12 rhizobacteria (2 RzVpV, 12 RzVpV, 14 RzVpV, 24 RzVpV, 25 RzVpV, 32 RzsVpV, 34 RzsVpV, 40 RzsVpV, 41 RzsVpV, 46 RzsVpV, 102 RzVpV, 110 RzVpV) or with the fungal endophytes. This bioassay demonstrated that microorganisms did not affect seed germination, but reduced the vegetative growth. Only the bacterial strain 32 stimulated the growth of radish, but the strain 2 (*Paenibacillus* sp.) resulted in growth inhibition. *Exophiala* sp. was the only fungal endophyte that favored the growth of radish, whereas the consortium *Paecilomyces-Veticillium* and *Beauveria* inhibited the plant growth.

**Key words:** growth inhibition, vegetative growth, development of structures, negative effects



## INTRODUCCIÓN

La productividad de la vainilla está directamente relacionada con el desarrollo de su sistema radical, el cual crece sobre la capa de materia orgánica del suelo. Ante esta situación, los microorganismos rizosféricos tienen un papel importante en la nutrición y establecimiento de la vainilla al dejar disponibles o movilizar los nutrimentos existentes en el sitio de cultivo (Álvarez *et al.*, 2013). Sin embargo, la información sobre los requerimientos de nutrición son escasos; por ejemplo, Osorio *et al.* (2014) mencionan que el sustrato combinado con fibra de coco, trozos de madera u hojarasca y la fertilización química (27-11-11 aplicada en 20 g por planta) tienen efecto en el incremento en longitud del tallo de las vainilla. Sin embargo, generalmente estos beneficios se infieren con base en estudios realizados con otras especies de la familia Orchidaceae. Otros estudios han enfatizado, que la vainilla al ser una planta de tejidos suculentos requieren 192 mm de agua en su etapa de establecimiento (Kelso-Bucio *et al.*, 2012), 0.27 mm para la etapa de desarrollo y 0.19 mm para la etapa de mediados de temporada, con una densidad de plantación de seis plantas por metro cuadrado (Bucio *et al.*, 2012).

En relación a los procesos de germinación de semillas de *Vanilla*, los estudios son escasos. Knudson (1950) y Withner (1955) desarrollaron medios asimbióticos (sin hongos endófitos simbiotes) con algunos fitoreguladores (citoquininas y auxinas), cuyos porcentajes de germinación en semillas de *V. planifolia*, fue cercano al 30%, y además caracterizaron etapas avanzadas de germinación. Por otra parte, las plantas al ser transferidas al suelo lograron una sobrevivencia del 80% (Divakaran *et al.*, 1997). Porrás-Alfaro y Bayman (2007) lograron promover tan solo 7 % de germinación en una especie de vainilla utilizando un aislado fúngico de *Ceratobasidium* obtenido a partir de plantas adultas; sin embargo, sólo lograron la apertura de la testa sin desarrollo evidente del embrión. Otros estudios se basaron en inocular el sustrato con los hongos endófitos de raíces,

resultando en aumentos en el crecimiento de la biomasa aérea, en la longitud de raíces, y en la altura de la planta (Ordoñez, 2013).

Con base en lo anterior, el presente trabajo llevaron a cabo bioensayos *in vitro* con plántulas de *Vanilla planifolia* inoculadas con rizobacterias y con hongos endófitos aislados de la raíz de esta especie, y de otras dos orquideas (*Prostechea trulla* y *Brassovola cochleata*) para determinar si existe una asociación o estímulo de los hongos en el crecimiento vegetal de vainilla y en una especie hortícola.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La propagación *in vitro* de la vainilla requiere nueve semanas para obtener plántulas con una raíz de buen tamaño. Tomando en cuenta las sugerencias de bioseguridad recomendadas por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OECD) y el Convenio de Diversidad Biológica (CDO) sobre la evaluación de los posibles riesgos y efectos para el ecosistema en donde se pretende usar los microorganismos, se incluyó también un ensayo con semillas de rábano (*Raphanus sativus* L.) para observar el efecto de los hongos endófitos y rizobacterias en plantas hortícolas que se cultivan en las mismas plantaciones de vainilla en Papantla, Veracruz, y con ello evaluar su posible patogenicidad.

Los valores de la longitud total de la planta y el peso total de la planta (fresco y seco) se analizaron mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) utilizando el programa estadístico PAST (Paleontological Statistics) (Hammer *et al.*, 2001), con la finalidad de conocer cuáles de los microorganismos produjeron un efecto en el crecimiento en longitud o biomasa con respecto al testigo.

### **Ensayo con plántulas de *Vanilla planifolia***

En esta fase experimental, la prueba se realizó en frascos de vidrio de 250 mL y tubos de ensayo de 20 cm de longitud con 2.5 cm de diámetro, con medio de cultivo *in vitro* para vainilla (formulación empleada por el Dr. Villegas del área de Fruticultura del CP) que contiene por cada litro de cultivo: 15 mL de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 19 mL de  $\text{KNO}_3$  al 1M; 1.5 mL de  $\text{MgSO}_4$ , 1.2 mL  $\text{KH}_2\text{PO}_7$  y 15 mL de  $\text{Ca}(\text{NO}_2)_3$  al 0.1 M; 10 mL de quelatos; 10 mL de microelementos y mioinositol, se eliminó la sacarosa debido a que el hongo creció abundantemente en ese medio (datos no presentados).

En los frascos con 25 mL del medio de cultivo, se colocó en el centro un pelet de 4 mm de diámetro, cinco repeticiones por cada cepa endófito fúngica (H1: *Exophiala* sp., H2: *Paecilomyces-Verticillium*; H3: *Corcyceps* sp.; H4: *Beauveria* sp.), y dos plantas a su alrededor. En los tubos se inoculó cada cepa endófito fúngica aislada de raíz en 2 mL de medio PDA inclinado, y posteriormente se agregaron 8 mL del medio de cultivo para vainilla, después de tres días se colocó una planta por tubo; siete repeticiones por tratamiento.

### **Ensayo preliminares en plantas de interés hortícola**

Las rizobacterias productoras de ácido indolacético y solubilizadoras de fósforo (Cuadro 9); así como los hongos endófitos aislados de raíces de las orquídeas *Vanilla planifolia* (H1: *Exophiala* sp. y H2: consorcio *Paecilomyces-Verticillium*), *Prostechea cochleata* (H3: *Cordyceps* sp.) y *Brassovola trulla* (H4: *Beauveria* sp.), fueron utilizadas en el ensayo con las semillas de rábano (*R. sativus* L.), una planta modelo por presentar un rápido crecimiento (Hewitson y Price, 1994).

Cuadro 9. Claves de las rizobacterias empleadas en las inoculaciones en semillas de rábano

Clave	Cepa	Género
Bacteria 2	2 RzVpV	<i>Paenibacillus</i>
Bacteria 12	12 RzVpV	
Bacteria 14	14 RzVpV	
Bacteria 24	24 RzVpV	
Bacteria 25	25 RzVpV	
Bacteria 32	32 RzsVpV	
Bacteria 34	34 RzsVpV	
Bacteria 40	40 RzsVpV	<i>Bacillus</i>
Bacteria 41	41 RzsVpV	
Bacteria 46	46 RzsVpV	
Bacteria 102	102 RzVpV	
Bacteria 110	110 RzVpV	

Para ello se colocaron 10 semillas por cada tratamiento (un testigo, cuatro hongos endófitos, y 12 rizobacterias) con tres repeticiones, en cajas de Petrie de catorce centímetros de diámetro con medio inclinado de PDA al 6% (Fig. 23). A los 15 días de su inoculación, se fotografiaron las raíces para posteriormente cosechar las plantas, pesarlas y secarlas a 70 °C, por dos días, para calcular su peso seco.

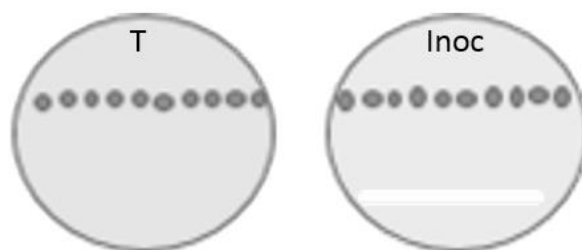


Figura 23. Esquema de los establecimiento de los tratamientos entre las semillas de rábano y los microorganismos inoculantes (hongos endófitos de raíz, o rizobacterias solubilizadoras de fósforo y productoras de ácido indolacético).

Los valores de la longitud total de la planta y el peso total en fresco y seco, se analizaron mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) utilizando el programa estadístico PAST (Paleontological Statistics) (Hammer *et al.*, 2001).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ensayos con plántulas y semillas de *Vanilla planifolia*

Los microcosmos empleados en los ensayos de interacción hongo endófito y plántula de vainilla no fueron los más idóneos, debido a que el hongo al estar en contacto con el medio de cultivo empleado encontró los nutrimentos necesarios para su crecimiento y se desarrolló mucho más rápido que la plántula; aún sin la fuente de carbohidratos (Fig. 24).

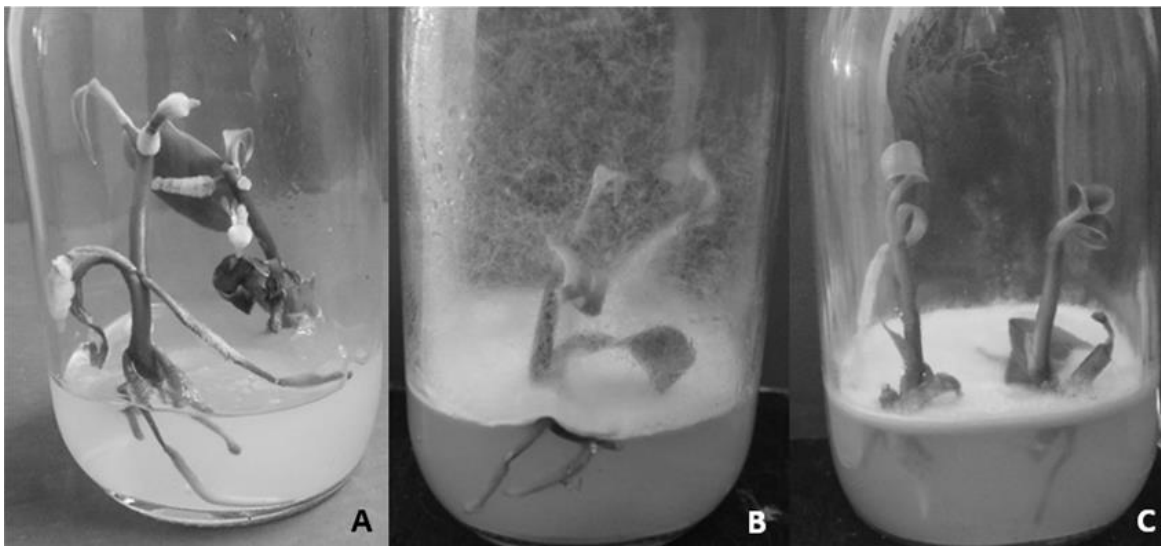


Figura 24. Microcosmos que muestran la interacción vainilla-endófito fúngico establecidos en frascos de 250 mL, después de ocho días de incubación ( $25\pm 2$  °C). A: Testigo, B: *Cordyceps* sp., C: Consorcio (*Paecilomyces-Verticillium*).

Sin embargo, se tomó el peso seco total de las plantas inoculadas con los hongos para tratar de delucidar si había algún cambio en cuanto a su biomasa. Además, las raíces que tuvieron contacto

con el hongo se disectaron para observar si existía o no simbiosis; el hongo fue agresivo y cambió la consistencia de la planta, tal parecía que la estaba degradando. Por lo cual se recomienda en trabajos posteriores, realizar la inoculación con alguno de los sustratos mencionados en el trabajo de Osorio *et al.* (2014), a fin de proporcionar material que puedan degradar los hongos y sean menos agresivos al interactuar con la vainilla.

Las raíces adventicias de los tratamientos se cortaron, clarearon con hidróxido de potasio y cloro, enguajaron tres veces con agua destilada, y tiñeron con azul de tripano. Las muestras teñidas se fotografiaron y compararon con las raíces colonizadas de campo (Fig. 25 A), en donde se observa la forma de los pelotones dentro de las células corticales; y que no fueron observados en las células corticales del testigo (Fig. 25 B). En general, sólo se observó un incremento en el núcleo en las células corticales de las raíces de plantas inoculadas con los hongos endófitos *Exophiala* sp. (Fig. 25 C), y con el consorcio *Paecilomyces-Verticillium* (Fig. 25 D). Los datos obtenidos de las plantas inoculadas con los hongos endófitos no mostraron incrementos en su crecimiento y desarrollo en comparación con el testigo sin inocular (Fig. 26)

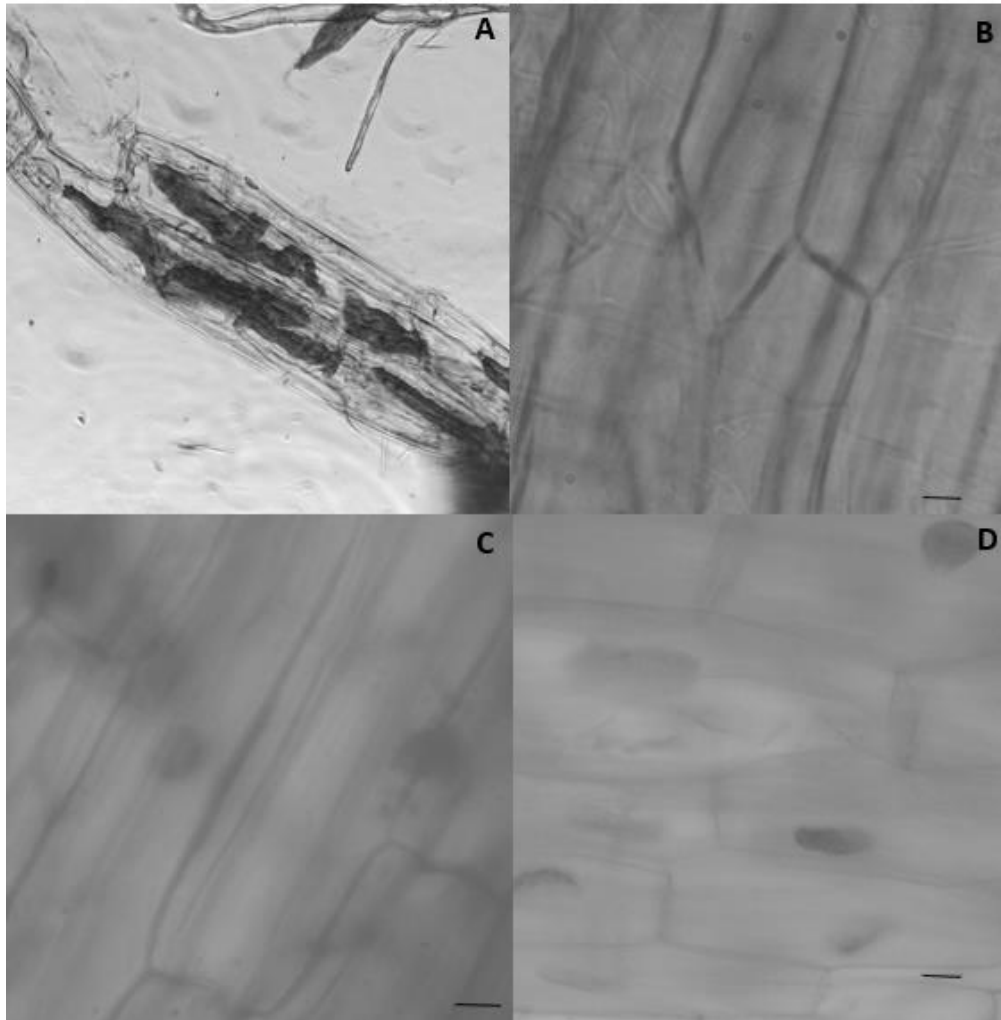


Figura 25. Raíces de *Vanilla planifolia*. A: Vista a 100 X proveniente de campo. Microfotografía de las raíces provenientes de los cultivos *in vitro* con el testigo (no inoculado), y con las cepas fúngicas endófitas aisladas de vainilla: *Exophiala* sp. (C) y consorcio (*Phaeoconium-Verticillium*) (D). B: 400X, C y D: 600X. La barra indica 10  $\mu$ m.

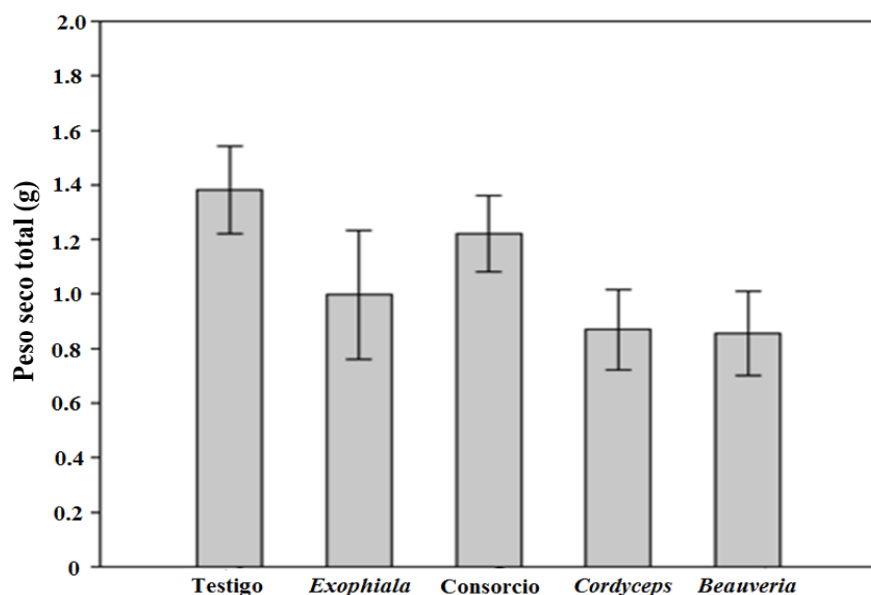


Figura 26. Efecto de los endófitos fúngicos de raíz, en el peso seco total de plantas de vainilla, en comparación a un testigo (sin inocular), después de 15 días de la inoculación.  $n = 7$ . Medias  $\pm$  error estándar.

### Ensayos preliminares en plantas de interés hortícola

En esta fase se determinó el efecto de la cepa fúngica o bacteriana empleada en la longitud de la planta y la biomasa de plantas de rábano.

La Fig. 27 demuestra que el consorcio fúngico *Paecilomyces-Verticillium*, y *Beauveria* inhibieron el crecimiento del rábano en comparación con *Exophiala* quien promovió su crecimiento con respecto al testigo (sin inoculación de bacteria). En cuanto a las rizobacterias (Fig. 28) se denotó que la cepa bacteriana 34 fue la que mayor longitud de planta produjo en comparación a las cepas 2, 12, 14, 34, 40 y 41. En breve, la cepa 34 promovió el crecimiento del rábano, mientras que la cepa 2 inhibió su crecimiento con respecto al testigo.

La cepa fúngica endófito que favoreció el peso fresco de rábano fue *Beauveria* sp. seguida de *Exophiala* sp., mientras que las cepas que menor efecto tuvieron fueron *Cordyceps* sp. y el consorcio formado por *Paecilomyces-Verticillium* (Fig. 29).



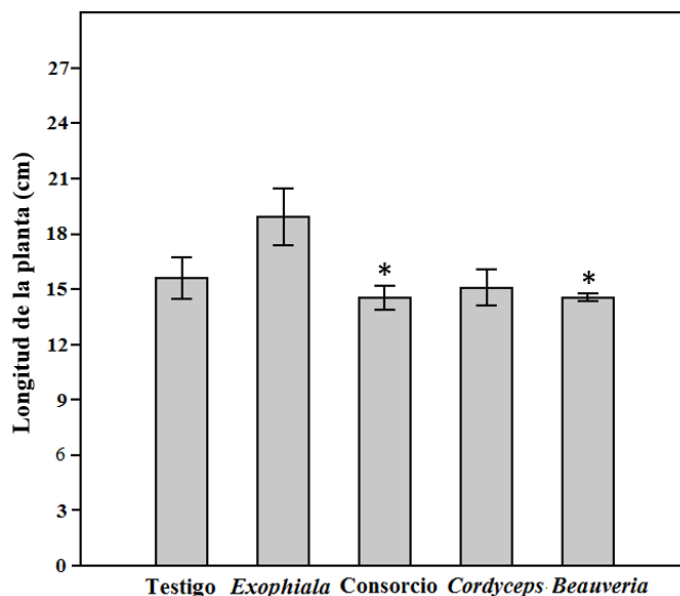


Figura 27. Efecto de los endófitos fúngicos de raíz, en la longitud total de plantas de vainilla, en comparación a un testigo (sin inocular), después de 15 días de la inoculación. El \* en las barras denota diferencias significativas entre tratamientos (Tukey,  $\alpha=0.05$ ); n = 10. Medias  $\pm$  error estándar.

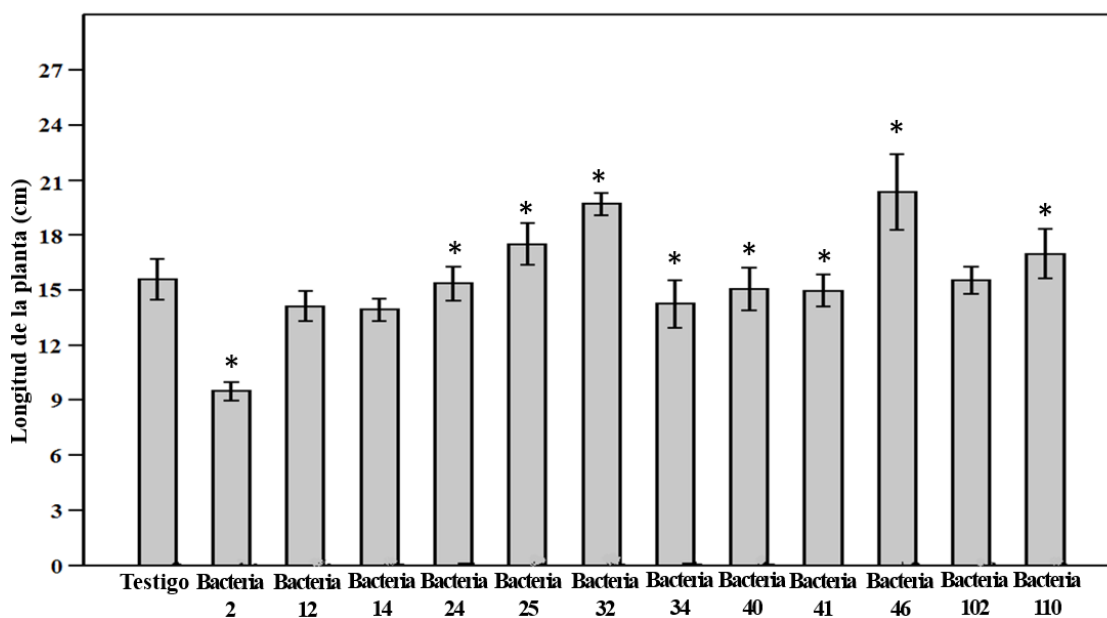


Figura 28. Efecto de las rizobacterias en la longitud del rábano (*Raphanus sativus* L.), a 15 días de su inoculación bajo temperatura ambiente en comparación a un testigo (sin inocular). El asterisco (\*) sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey,  $\alpha=0.05$ ); n=10. Medias  $\pm$  error estándar.

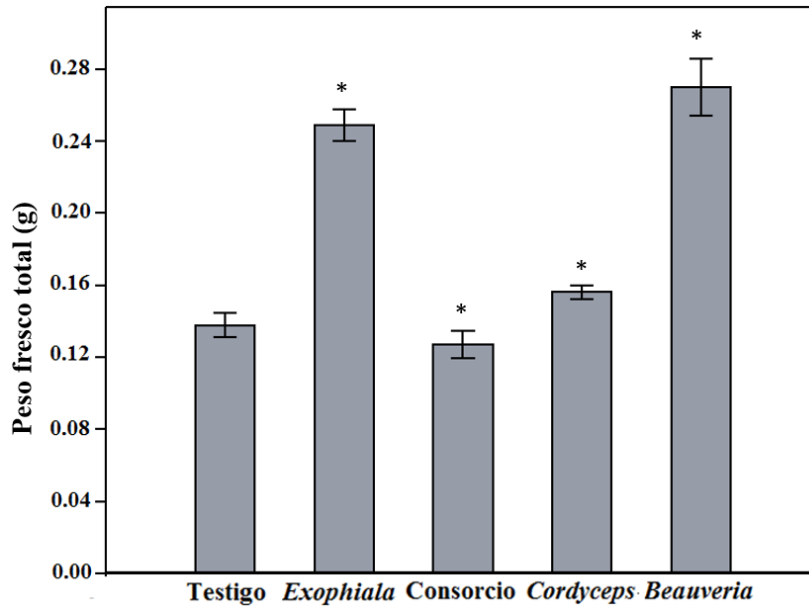


Figura 29. Efecto de los endófitos fúngicos de raíz, en el peso fresco total de plantas de vainilla, en comparación a un testigo (sin inocular), después de 15 días de la inoculación. El asterisco (\*) sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey,  $\alpha=0.05$ );  $n = 10$ . Medias  $\pm$  error estándar.

Los tratamientos inoculados con las bacterias 25, 40, 46, 102 mostraron mayor peso fresco total, en comparación con el testigo y con otras cepas bacterianas; *Paenibacillus* sp. fue la cepa que menor peso produjo con respecto al testigo (Fig. 30). En el caso de hongos, *Exophiala* sp. incrementó la biomasa seca del rábano (Fig. 31) en comparación con el testigo, seguido por *Beauveria* sp., mientras que las dos cepas restantes produjeron menor cantidad de biomasa seca.

En la Fig. 32 se observa que las cepas bacterianas 2, 14 y 40 inhibieron el desarrollo del rábano, mientras que las cepas 102 y 110 promovieron el peso seco de las plantas. Las raíces del rábano inoculadas con las bacterias (Fig. 33) mostraron cambios morfológicos con respecto al testigo (Fig. 33, A). Por ejemplo, en algunos casos se observó un cambio en el desarrollo de la planta, en la coloración en la calíptra, y en la abundancia de los pelos radicales (Fig. 33, C-F). Otras raíces evitaban el contacto con la línea de crecimiento bacteriano (Fig. 33, G-H) o bien, los pelos radicales eran cortos con aspecto algodonoso.

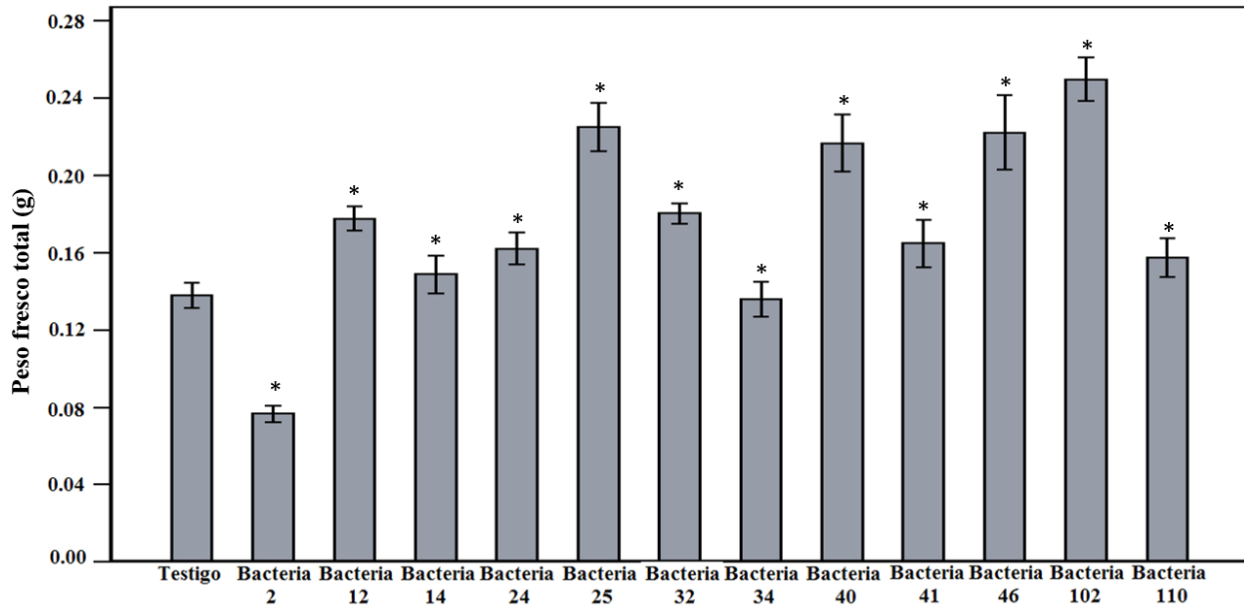


Figura 30. Efecto de las rizobacterias en el peso fresco de rábano (*Raphanus sativus* L.), a 15 días de su inoculación bajo temperatura ambiente en comparación a un testigo (sin inocular). El asterisco (\*) sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey,  $\alpha=0.05$ );  $n=10$ . Medias  $\pm$  error estándar.

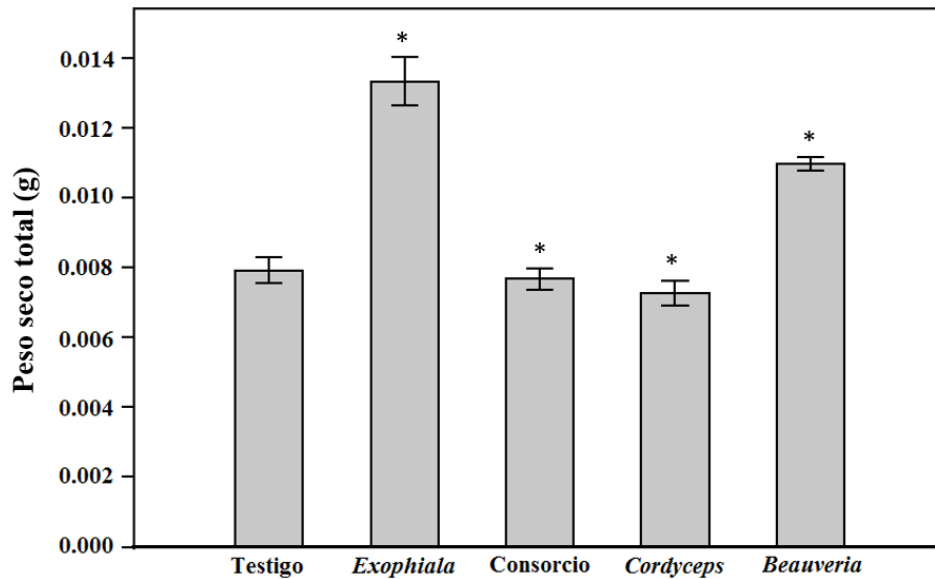


Figura 31. Efecto de los endófitos fúngicos de raíz, en el peso seco total de plantas de vainilla, en comparación a un testigo (sin inocular), después de 15 días de la inoculación. El asterisco (\*) sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey,  $\alpha=0.05$ );  $n=10$ . Medias  $\pm$  error estándar.

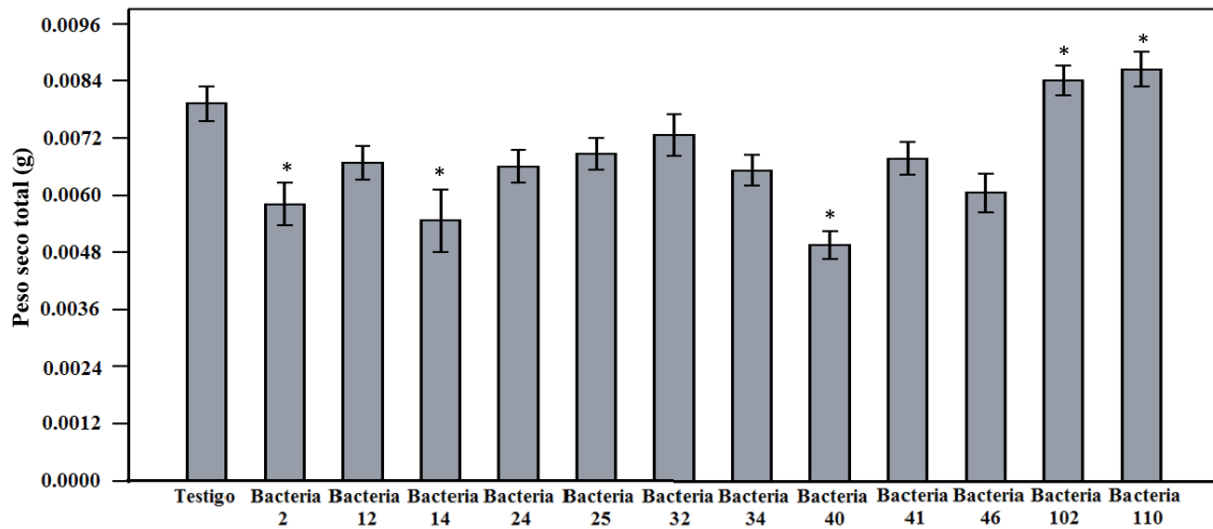


Figura 32. Efecto de las rizobacterias en el peso seco total de rábano (*Raphanus sativus* L.), a 15 días de su inoculación bajo temperatura ambiente en comparación a un testigo (sin inocular). El asterisco (\*) sobre las barras denotan diferencias significativas entre tratamientos (Tukey,  $\alpha=0.05$ );  $n=10$ . Medias  $\pm$  error estándar.

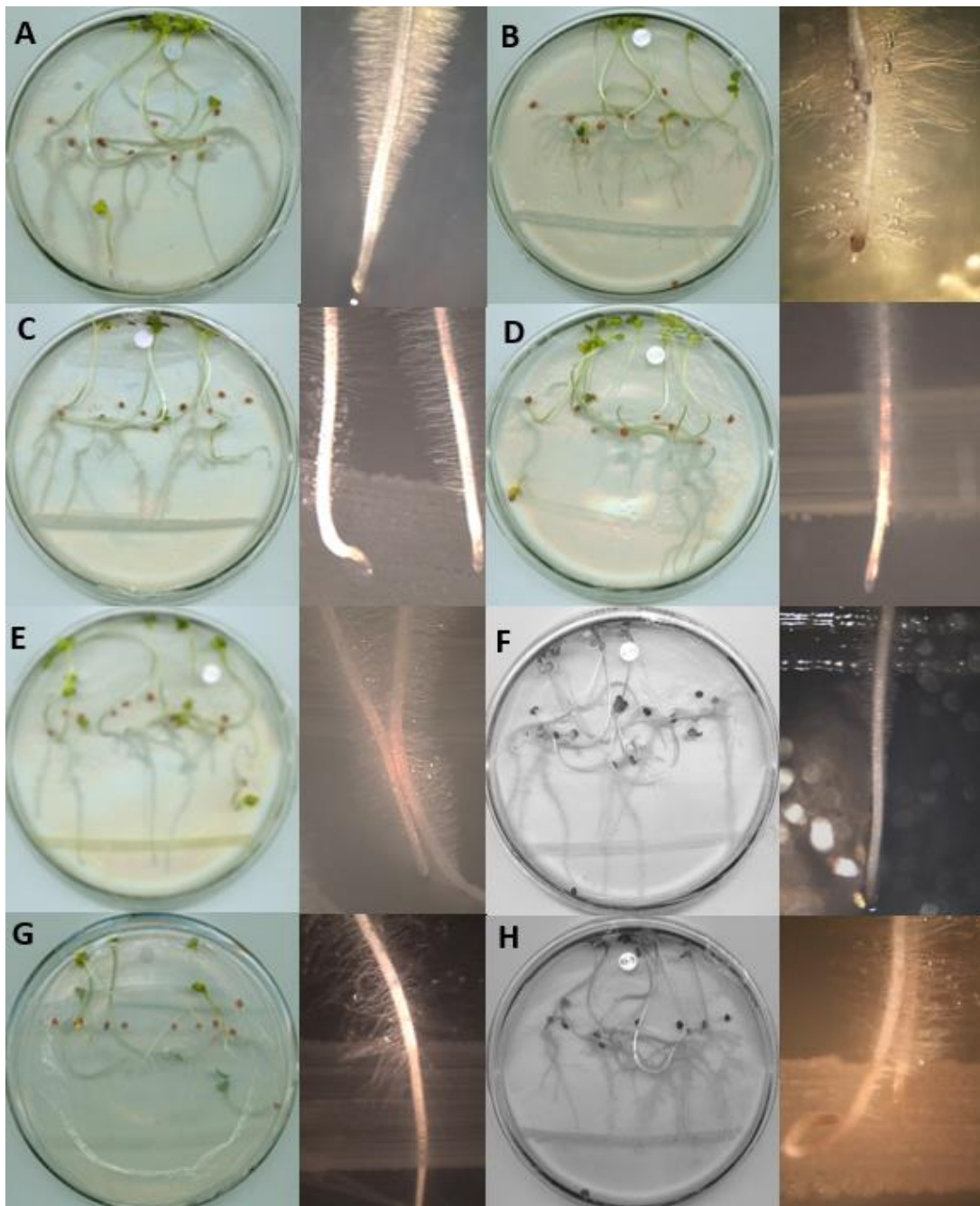


Figura 33. Ensayos en microcosmos con semillas de rábano y las capas bacterianas. Izquierda: observación macroscópica después de 15 días, a la derecha: observación microscópica a 120 X. A: Testigo, B – H: efecto de las cepas bacterianas en el desarrollo de las plántulas. B: 2 RzVpV; C: 40 RzsVpV; D: 14 RzVpV; E: 24 RzVpV; F: 32 RzsVpV; G: 34 RzsVpV; H: H110 RzVpV.

## CONCLUSIONES

Los hongos endófitos aislados de raíz y las rizobacterias presentaron potencial enzimático para poder favorecer el crecimiento vegetal; sin embargo, en los ensayos *in vitro* con *Vanilla planifolia*, no existió evidencia de una asociación o simbiosis. Se sugiere realizar los ensayos con vainilla en sustratos, con la finalidad que los hongos endófitos (por los hábitos de saprobios y de degradadores de celulosa) primero comiencen a degradar al sustrato y se evite la invasión (como en los cultivos *in vitro*) de los hongos hacia a la planta de vainilla.

Debido a que las plantas que soportan a las vainillas son leguminosa arbóreas y los cultivos alternados (pimienta, pimientos, etc), sería importante conocer si los microorganismos aislados tienen un efecto sobre su desarrollo o crecimiento.

En general, los microorganismos aislados y probados en esta fase favorecieron el crecimiento vegetal.

## **CAPÍTULO VIII**

### **DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES**

Los microorganismos endófitos y rizosféricos han demostrado tener un efecto positivo en el desarrollo vegetal, floración temprana y una mejor adaptación al estrés abiótico en orquídeas. Los resultados de la presente investigación sugieren que existe una amplia gama de microorganismos con potencial biotecnológico encontrados a lo largo de la planta (parte aérea y terrestre). Sin embargo, se debe tener precaución con las cepas que aún faltan por identificarse, debido a como es reportado en otros estudios, la vainilla requiere de abundante materia orgánica la cual es degradada por microorganismos saprobios o fitopatógenos que pudieran causar daños a la salud vegetal. Por tal motivo, es importante estar seguros de que los organismos aislados no generen problemas de bioseguridad hacia otros cultivos o hacia quienes manipulen los microorganismos al momento de realizar las inoculaciones en los materiales vegetales.

En el presente trabajo se seleccionaron bacterias que produjeran efectos benéficos de interés agronómico (producción de ácido indolacético y solubilización de fósforo). Llama la atención los resultados de compatibilidad, ya que se esperaban más cepas compatibles entre las rizobacterias y las cepas endófitas fúngicas, pero la mayoría de las cepas bacterianas inhibieron el crecimiento hifal de los endófitos. Lo anterior permite inferir que las cepas bacterianas juegan un papel importante en la regulación de las cepas fúngicas en vainilla. No obstante, aún se desconoce la actividad que estas bacterias tienen en conjunto con las cepas fúngicas. Por lo anterior, se recomienda realizar estudios más detallados a nivel microscópico para conocer los mecanismos de acción de las rizobacterias para inhibir el crecimiento fúngico; por ejemplo, aquellos cambios en la morfología de las estructuras fúngicas, y saber cuáles son los metabolitos difusibles en el medio de cultivo.

La cepa identificada como *Pseudomonas* sp., reportada como controlador biológico por excelencia, expresó su efecto inhibitorio en los hongos endófitos fúngicos que se aislaron tanto de vainilla como de otras orquideas. Esto se puede explicar ya que este género bacteriano suele producir diversos metabolitos antibióticos. Sin embargo, se esperaba que *Paenibacillus* sp. y *Bacillus* sp. presentaran cierta compatibilidad con los hongos endófitos, por ser las bacterias reportadas en la literatura que favorecen la estimulación del desarrollo y crecimiento vegetal en orquideas. Este efecto no se observó en el presente estudio, lo que deja como antecedente que las rizobacterias tienen un papel importante en el control o regulación de la microbiota fúngica que rodea a la vainilla, por lo cual se requerirá de mayor estudio para tratar de delucidar si es por efecto de comensalismo o antibiosis.

No existió evidencia alguna de formación de simbiosis entre los hongos endófitos fúngicos provenientes de raíz con la vainilla a nivel microscópico, ni de una estimulación vegetal, debido a que los sistemas diseñados no fueron los adecuados, aún cuando se eliminó la fuente de carbono. Por lo anterior, y con base en la literatura, se propone realizar una investigación en donde las plantas sean inoculadas con los hongos endófitos pero en sustratos ricos en azúcares de acuerdo con lo observado, en el sentido que los hongos crecen más rápido en medios con azúcares.

Los estudios hasta ahora realizados no son concluyentes con respecto a si los hongos endófitos aislados de raíces de vainilla, sean o no simbiosiontes de la misma, debido a que los microsistemas no fueron los más idóneos o bien, porque el tiempo de incubación fue corto.

En general, los microorganismos aislados mostraron tener potencial para la estimulación en el desarrollo y crecimiento vegetal. Sin embargo, se debe concluir el análisis para su identificación molecular para conocer si existe información sobre su mecanismo de acción o actividad metabólica en las plantas de vainilla.



## LITERATURA CITADA

- Adame-García J, Trigos-Landa AR, Iglesias-Andreu LG, Flores-Estevez N, Luna-Rodríguez M. 2011. Variaciones isoenzimáticas y patogénica de *Fusarium* spp. asociadas con la pudrición de tallo y raíz de vainilla. Trop. Subtrop. Agroecosyst, 13: 299 – 306
- Adame-García J, Rodríguez-Guerra R, Iglesias-Andreu LG, Ramos-Prado JM, Luna-Rodríguez M. 2015. Identificación molecular y variación patogénica de especies de *Fusarium* aisladas de *Vanilla planifolia* en Papantla México. Bot. Sci. 93 (3): 669 – 678
- Aguilera-Rodríguez I, Pérez-Silva CRM. 2016. Adecuación de un micrométodo colorimétrico para la cuantificación de fósforo soluble en cultivos microbianos. Rev Cub Quím. 25 (1): 3 – 8
- Agustini V, Sufaati S, Suharno. 2009. Mycorrhizal association of terrestrial orchids of Cycloops Nature Reserve, Japura. Biodiversitas. 10 (4): 175 – 180
- Ahemad M, Saghir KM. 2011. Functional aspect of plant growth promoting rhizobacteria: recent advancements. Insight Microbiology. 1(3): 39 – 54
- Ainsworth GC. 2008. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. Cabi.
- Alegría JMI. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Investigación agraria. Span. J. Agric. Res. 16 (1): 5 – 24
- Alfonso ET, Galán AL. 2006. Evaluación agrobiológica de la coinoculación micorrizas-rizobacterias en tomate. Agronomía costarricense. 30(1): 65 – 73
- Álvarez CL, Osorio NW, Marín MM. 2013. Molecular identification of microorganisms associated to the rhizosphere of vanilla plants in Colombia. Acta Biol.Colomb. 18(2): 293 – 306
- Amarapurkar SV, Duke M. 2011. Studies on enzymatic activity of micro-organisms symbiotically associated with orchid roots (*Dendrobium noble*). Adv Powder Technol. 1 (4): 117 – 125
- Anandan A. 2004. Vanilla: The green golden. Sura Books. India.

- Andreote FD, Gumiere T, Durrer A. 2014. Exploring interactions of plant microbiomes. *Sci. agric.* (Piracicaba, Braz.) Piracicaba. 71 (6): 528 – 539
- Anilkumar AS. 2004. Vanilla cultivation, a profitable agri-based enterprise. *Kerala Calling*: 26 – 30
- Arzani IED, González AAV. 2007. Manual de producción de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews): El uso de buenas prácticas agrícolas en el Estado de Veracruz. SAGARPA.
- Ávila-Díaz I, Garivay-Orijel R, Magana-Lemus RE, Oyama K. 2013. Molecular evidence reveals fungi associated within the epiphytic orchid *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. *Bot. sci.* 91(4): 523 - 529
- Barea JM, Pozo MJ, Azcón R, Azcón-Aguilar C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot* 56 (417): 1761 – 1778
- Barnett H, Hunter B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 3ª edición. Minesota.
- Batty AL, Dixon KW, Brundrett MC, Sivasithamparam K. 2002. Orchid conservation and mycorrhizal associations. 195 - 226. *En*: K Sivasithamparam, KW Dixon, RL Barret (eds). *Microorganisms in plant conservation and biodiversity*. Klumer Academic Publishers.
- Bayman P, Lebrón LL, Tremblay RI, Lodge DJ. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytol.* 135:143 – 149
- Beltrán-Nambo MA, Ortega LP, Salgado GR, Tupac OJO, Martínez TM, Carreón-Abud Y. 2012. Distribution and abundance of terrestrial orchids of the genus *Bletia* in sites with different degrees of disturbance, in the Cupatitzio Natural Reserve, México. *Int. J Biodiv. Conserv.* 4 (8): 316 – 325
- Benton JJJr. 2012. Plant nutrition and soil fertility manual. 2a ed. Taylor & Francis Group. CRC Press. USA.

- Benson A, Joe MM, Karthikeyan B, Sa T, Rajasekaran C. 2014. Role of *Achromobacter xylosoxidans* AUM54 in micropropagation of endangered medicinal plant *Naravelia zeylanica* (L.) DC. *J Plant Growth Regul.* 33(2): 202 – 213
- Berg G, Zachow C, Cardinale M, Müller H. 2011. Ecology and human pathogenicity of plant-associated bacteria. *In: Regulation of Biological Control Agents.* Ehler RU (ed.) Springer Science Business Media BV. 175 – 189
- Bertrand H, Plassard C, Pinochet X, Touraine B, Normand P, Cleyet-Marel J C. 2000. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Can J Microbiol.* 46(3): 229 – 236
- Binga EK, Lasken RS, Neufeld JD. 2008. Something from (almost) nothing: the impact of multiple displacement amplification on microbial ecology. *ISME Journal.* 2 (3): 233 – 241
- Boldrini RF, Santos WO, Cruz ZMA, Ramos AC 2010 Bases da associação micorrízica orquídeide. *Natureza on line* 8 (3): 140 – 145
- Bogino PC, de las Mercedes Oliva M, Sorroche FG, Giordano W. 2013. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (8): 15838 - 15859
- Bonfil SC. 1988. Vainilla. *Ciencias.* 13: 51
- Bougoure J, Ludwig M, Brundrett M, Grierson P. 2009. Identity and specificity of the fungi forming mycorrhizas with the rare mycoheterotrophic orchid *Rhizanthella gardneri*. *Mycol. Res.* 113: 1097 – 1106
- Bouyoucos GJ. 1962. Hydrometer improved method for making particle size analysis of soil. *Agron. J.* 54: 464 - 465
- Brundrett MC. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.* 154: 275 – 304

- Brundett MC. 2006. Role of symbiotic relationships in Australian terrestrial orchid conservation. *Australas Plant Path.* 15 (2): 2 – 7
- Bonnardeaux Y, Brundrett M, Batty AL, Dixon KW, Koch J, Sivasithamparam K. 2007. Diversity of mycorrhizal fungi of Western Australian terrestrial orchids: compatibility webs, brief encounters, lasting relationships, and alien invasions. *Mycol. Res.* 111: 51 – 61
- Bucio HAK, Bâ KM, Morales SS, López DR. 2012. Estudio experimental para la determinación de los coeficientes de cultivo de la vainilla (*Vanilla* spp.). *Rev. mex. de cienc agrícolas.* 4: 659 – 663
- Caesar-Ton That TC, Caesar AJ, Gaskin UMS, Busscher WJ. 2007. Taxonomic diversity of predominant culturable bacteria associated with microaggregates from two different agroecosystems and their ability to aggregate soil *in vitro*. *Appl. Soil Ecol.* 36 (1): 10 – 21
- Calvo P, Zúñiga D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecol. Aplic.* 9 (1): 31 – 39
- Cameron DD, Leake JR, Read DJ. 2006. Mutualistic mycorrhiza in orchids: evidence from plant-fungus carbon and nitrogen transfers in the green-leaved terrestrial orchid *Goodyera repens*. *New Phytol.* 171: 405 – 416
- Cano MA. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 14(2): 15 – 31
- Capdevielle F, Ottati C, Loretto M. 2011. Bioinfo\_eXtrema: un enfoque bioinformático para integrar información ambiental, bioquímica y genómica, enfocado en bioprospección y selección de consorcios de microorganismos con aplicaciones en biorremediación. *INNOTEC.* (5): 43 – 47
- Cardona CS, Marín MM, Díez MC. 2012. Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia. *Rev. Mex. Micol.* 35: 23 – 34

- Castillo MR, Engleman EM. 1993. Caracterización de dos tipos de *Vanilla planifolia*. Acta Bot. Mex. 25: 49 – 59
- Chutima R, Lumuyong S. 2012. Production of indole-3-acetic acid by Tahai native orchid-associated fungi. Symbiosis. 56 (1): 35 – 44
- Chang DCN, Chou LC. 2007. Growth responses, enzyme activities, and component changes as influenced by *Rhizoctonia* orchid mycorrhiza on *Anoectochilus formosanus* Hayata. Bot. Stud. 48: 445 – 451
- Chang WC. 2007. *In vitro* morphogenesis and micropropagation of orchid. 45 - 65. En: Chen WH, Chen HH (eds). Orchid Biotechnology. World Scientific Publishing. Singapore.
- Danhorn T, Fuqua C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria Annu. Rev. Microbiol. 61: 401 – 22
- Dearnaley JDW, Le Brocque AF. 2006. Endophytic fungi associated with Australian orchids. Australas. Plant Pathol: Bulletin of the Australian network for plant conservation 15 (2): 7 – 9
- Dearnaley JDW. 2007. Futher advances in orchid mycorrhizal research. Mycorrhiza 17: 475 – 486
- Divakaran M, Sajina A, Nirmal BK, Ravindran PN. 1997 Ovule culture of vanilla and its potential in crop improvement. Edison S. Ramana KV Sasikumar B. Nirmal Babu K. Santhosh JE (eds) Biotechnology of spices, medicinal and aromatic plants. Indian Society for Spices, India, 112-118.
- Ek M, Ljungquist PO, Stenström E. 1983. Indole-3-acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrometry. New Phytol. 94: 401 – 407
- Fakhrunnisa H, Ghaffar A. 2006. *In vitro* interaction of *Fusarium* spp., with other fungi. Pak J Bot. 38(4): 1317 – 1322

- Fernandes JRG, Pedrinho EAN, Castellane TCL, Lemos EGM. 2011. Bactérias produtoras de auxinas isoladas de raízes de *Cattleya walkeriana*, orquídea Brasileira ameaçada de extinção, e sua função na aclimatização. *Rev. Bras. Ciênc.* 35 (3): 729 – 737
- Fernández LA, Zalba P, Gómez MA, Sagardoy MA. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Cienc. Suelo.* 23(1): 31 – 37
- Fierer N, Breitbart M, Nulton J, Salamon P, Lozupone C, Jones R, Robeson M, Edwards RA, Felts B, Rayhawk S, Knight R, Rohwer F, Jackson RB. 2007. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (21): 7059 – 7066
- Finlay RD. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J. Exp. Bot.* 59 (5): 1115 – 1126
- Gaimster H, Cama J, Hernández-Ainsa S, Keyser UF, Summers DK. 2014. The indole pulse: a new perspective on indole signalling in *Escherichia coli*. *PloS one.* 9 (4): e93168
- García-Cruz J, Sosa V. 1998. Flora de Veracruz. Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, México. Fascículo 106
- Gehring H, Faist K, Kluge M. 1998. Identification of phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in leaf, stem and roots of the obligate CAM plant *Vanilla planifolia* Salib. (Orchidaceae): a physiological and molecular approach. *Plant Mol Biol.* 38: 1215 – 1223
- Ghazalibiglar H, Hampton JG, de Jong EVZ, Holyoake A. 2016. Is induced systemic resistance the mechanism for control of black rot in *Brassica oleracea* by a *Paenibacillus* sp.? *Biol Control,* 92: 195 – 201

- Glickmann E, Dessaux YA. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 61:793 – 796
- González HE, Raventós J, Mújica BE, Bonet A. 2007. Estructura y ecología de la población del endemismo cubano *Broughtonia cubensis* (Orchidaceae), en cabo San Antonio, península de Guanahacabibes, provincia de Pinar del Río, Cuba. *Lankesteriana* 7 (3): 469 – 478
- Gray EJ, Smith DL. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37: 395 – 412
- Griffiin EA, Carson WP. 2015. The Ecology and Natural History of Foliar Bacteria with a Focus on Tropical Forests and Agroecosystems. *Bot Rev.* 81:105 – 149
- Griffiths BS, Christensen S, Bonkowski M. 2007. Macrofaunal interactions in the rhizosphere, how nematodes and protozoa link above- and belowground processes. 57 – 71. *En: ZG Cardon, JL Whitbeck. The rhizosphere: an ecological perspective. Elsevier. United States of America.*
- Guerrero R, Berlanga M. 2005. Microbios en la niebla: descubriendo el papel de los microbios en la biosfera. *Rev. Ecosistemas.* 14 (2): 3 – 10
- Hallman J, Berg G. 2006. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. *En: Microbial Root Endophytes, B. J. E. Schulz, C. J. C. Boyle, and T. N. Sieber, Eds., pp. 15–31, Springer, New York, NY, USA*
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9 pp. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)
- Hashimoto Y, Fukukawa S, Kunishi A, Suga H, Richard F, Suave M, Selosse M-A. 2012. Mycoheterotrophic germination of *Pyrola asarifolia* dust seeds reveals convergences with germination in orchids. *New Phytol.* 195: 620 – 630

- Hawksworth DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 15 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105 (12): 1422 – 1432
- Hernández J, Lubinsky P. 2011. Cultivation Systems, p. 75-95. En: E. Odoux y M. Grisoni, eds. *Vanilla. Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles*. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Hernández-Rodríguez A, Heydrich-Pérez M, Velázquez-del Valle MG, Hernández-Lauzardo AN. 2006. Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Rev. Mex. Fitopatol.* 24 (1): 42 – 49
- Hewitson J, Price R. 1994. Plant mineral nutrition in the classroom: the radish, *Raphanus sativus* L is a good plant for such studies. *Sch. Sci. Rev.* 76(274): 45 – 55
- Ho YN, Hsieh JL, Huang CC. 2013. Construction of a plant–microbe phytoremediation system: Combination of vetiver grass with a functional endophytic bacterium, *Achromobacter xylosoxidans* F3B, for aromatic pollutants removal. *Bioresource technol.* 145: 43 – 47
- Honrubia M. 2009. Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales Jard. Bot. Madrid.* 66S1: 133 – 144
- Horner-Devine MC, Lage M, Hughes JB, Bohannon BJ. 2004. A taxa–area relationship for bacteria. *Nature.* 432 (7018): 750 – 753
- Hossain MM, Kant R, Thanh VP, Winarto B, Zeng S, Teixeira SAJ. 2013. The application of biotechnology to orchids. *Cr. Rev. Plant Sci.* 32 (2): 69 – 139
- Ivonilde A, Barbosa C, Gonçalves JD. 2006. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham (Carobinha –do-campo). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49 (3): 353 – 359
- Jacquemyn H, Brys R, Cammue BPA, Honnay O, Lievens B. 2011. Mycorrhizal associations and reproductive isolation in three closely related *Orchis* species. *Ann. Bot.* 107: 347 – 356



- Jaizme-Vega MC, Rodríguez-Romero AS. 2008. Integración de microorganismos benéficos (hongos micorrícicos y bacterias rizosféricas) en agrosistemas de las Islas Canarias. *Agroecología* 3: 33 – 39
- Jaramillo JL. 2012. Competitividad de sistemas de beneficiado de vainilla (*Vanilla planifolia* J.) en la región del Totonacapan, México. *Panor. Socioec.* (45): 80 – 93
- Jaramillo VJL, Escobedo GJS, Barrera RA, Herrera CBE. 2013. Eficiencia económica en el beneficiado de vainilla (*Vanilla planifolia* J.) en la región del Totonacapan, México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 4(3): 477 – 483
- Jericó JJ, Bello-Bello JJ, Spinoso-Castillo J, Iglesias-Andreu LG. 2014. Establecimiento de un sistema de biorreactores para la micropropagación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *Agroproductividad.* 7 (3): 63 – 68
- Jersáková J, Malinová. 2007. Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. *New Phytol.* 176 (2): 237 – 241
- Jiang JH, Lee YI, Cubeta MA, Chen LC. 2015. Characterization and colonization of endomycorrhizal *Rhizoctonia* fungi in the medicinal herb *Anoectochilus formosanus* (Orchidaceae). *Mycorrhiza.* 25(6): 431 – 445
- Jiménez-Quesada K, Schmidt-Durán A, Quesada-Montero K, Moreira-González I. 2015. Aislamiento de una bacteria endófitas de vainilla (*Vanilla planifolia*) con actividad biocontroladora in vitro contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Tecnol. Marcha.* 28 (2): 116 – 125
- Jones DL. 2006. A complete guide to native orchids of Australia including the Island Territories. Reed New Holland, Sydney
- Kalimuthu K, Senthilkumar R, Murugalatha N. 2006. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr. – a tropical orchid. *Current Sci.* 91 (10): 1401 – 1403

- Karupiah P, Rajaram S. 2011. Exploring the potential of chromium reducing *Bacillus* sp. And there plant growth promoting activities. J. Microbiol. Res. 1 (1): 17 – 23
- Kelso-Bucio HA, Bâ KM, Sánchez-Morales S, Reyes-López D. 2012. Estimación *in situ* del K<sub>Cini</sub> de la vainilla (*Vanilla planifolia* A). Agrociencia. 46 (5): 499 – 506
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Ahemad M, Oves M. 2009. Functional diversity among plant growth-promoting rhizobacteria: current status. In: MS Khan *et al.* (eds.) Microbial strategies for crop improvement. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Kumar A, Kumar A, Devi S, Patil S, Payal C, Negi S. 2012. Isolation, screening and characterization of bacteria from rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an *in vitro* study. Recent Res. Sci. Technol. 4 (1): 1 – 5
- Kumar A, Saini P, Shrivastava JN. 2009. Production of peptide antifungal antibiotic and biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. Indian J Exp Biol.47: 57 – 62
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. En: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY.
- Lange A, Moreira FMS. 2002. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de orchidaceae e de outras famílias vegetais Rev. Bras. Cienc. Solo 26 (2): 529 – 533
- Lara C, Esquivel AM, Peñata N. 2011. Native phosphate solubilizing bacteria to increase the crops in the department of Cordova-Colombia. Rev. Bio. Agro. 9 (2): 114 – 120
- Lee SS. 2002. A review of orchid mycorrhizae in Korea. Plant Pathol. J. 18: 169 – 178
- Lindow SE, Brandl MT. 2003. Microbiology of the phyllosphere. Appl. Environ. Microbiol. 69 (4): 1875 – 1883
- Lindow SE, Leveau JH. 2002. Phyllosphere microbiology. Curr. Opin. Biotech. 13 (3): 238 – 243

- Leifert C, Morris CE, Waites WM. 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems in vitro. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 13(2): 139 – 183
- Lizarazo-Medina PX, Mendoza-Salazar MM, Gutiérrez-Gallo AI. 2015. Diversity of endophytic mycobiota in *Cattleya percivaliana* and *Cattleya trianaei* growing under greenhouse conditions. *Actu Biol.* 37(102): 307 – 318
- López-García P, Moreira D. 2008. Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Res. Microbiol.* 159 (1): 67 – 73
- Luyando-Moreno LS, Pedraza-Santos ME, López-Medina J, Morales-García JL, Carrillo-Castañeda GM, Lindig-Cisneros R. 2011. Adaptación de *Laelia autumnalis* Lindl. a un bosque de pino-encino. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 3: 509 – 524
- Ma Y, Zhang C, Oliveira RS, Freitas H, Luo Y. 2016. Bioaugmentation with endophytic bacterium E6S homologous to *Achromobacter piechaudii* enhances metal rhizoaccumulation in host *Sedum plumbizincicola*. *Front Plant Sci.* 7: 75
- MacFaddin JF. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3a ed. Ed. Médica Panamericana. España
- Marín MM, Díez MC, Santa CC. 2012. Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia. *Rev. Mex. Mic.* 35: 23 – 34
- Marschner P. 2012. Rhizosphere biology. *En: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants.* 3ª ed. Elsevier. United States of America
- McCormick MK, Whigham DF, Sloan D, O'Malley K, Hodkinson B. 2006. Orchid-fungus fidelity: a marriage meant to last? *Ecology* 87 (4): 903 – 911
- Medina SM. 2012. Caracterización bioquímica y microbiológica de un suelo de pradera de *Dactylis glomerata* y *Medicago sativa* bajo diferentes proporciones de siembra. Ediciones Universidad

- de Salamanca. 364 pp Mosqueira-Espinosa AT, Bayman P, Tupac OJ. 2010. *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agronóm.* 59 (3): 316 - 326
- Melotto M, Underwood W, Yang He S. 2008. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 101 – 122
- Mikán JF, Suárez DEC. 2004. Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 6(1): 58 – 71 Moffett MW. 2000. What's "Up"? A Critical Look at the Basic Terms of Canopy Biology. *Biotropica*, 32: 569 – 596
- Munguía-Lino G, Vázquez-García LM, López-Sandoval JA. 2010. Plantas silvestres ornamentales comercializadas en los mercados de la flor de Tenancingo y Jamaica, México. *Polibotánica* 29: 281 – 308
- Muthukumar T, Uma E, Karthikeyan A, Sathiyadash K, Jaison S, Priyadharsini P, Chongtham I, Muniappan V. 2011. Morphology, anatomy and mycorrhizae in subterranean parts of *Zeuxine gracilis* (Orchidaceae). *An Biol* 33: 127 – 134
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M, Landi L, Pietramellara G, Renella G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J Soil Sci.* 54 (4): 655 – 670
- Noguez AM, Arita HT, Escalante AE, Forney LJ, García-Oliva F, Souza V. 2005. Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. *Global Ecol. Biogeogr.* 14 (3): 241 – 248
- Nurse RE, Cavers PB. 2008. The germination characteristics of *Scrophularia marilandica* L. (Scrophulariaceae) seeds. *Plant Ecol.* 196 (2): 185 – 196
- Olsen SR, Sommers LE. 1982. Phosphorus. *En. Methods of soil analysis, part 2*, 85 - 114. Eds. AL Page, RH Miller, DR Keney. *Chemical and Microbiological Properties*. Madison. Wisconsin. USA

- Ordóñez CFN, Tupac OJ, Díez GMC. 2012. Hongos endófitos de orquídeas y su efecto sobre el crecimiento en *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta Agronómica*. 61(3): 282 – 290
- Ordoñez C, Fiorela N, Otero JT, Díez MC. 2013. Orchid endophytes fungi and their effect on growth in *Vanilla planifolia* Andrews. *Acta Agronómica*. 61(3): 282 – 290
- Osorio-Gil EM, Forero-Montaña J, Tupac OJ. 2008. Variation in mycorrhizal infection of the epiphytic orchid *Ionopsis utricularioides* (Orchidiaceae) on different substrata. *Caribb. J. Sc.* 44 (1): 130 – 132
- Osorio AI, Osorio VNW, Díez MC, Moreno FH. 2014. Nutrient status and vegetative growth of *Vanilla planifolia* Jacks plants as affected by fertilization and organic substrate composition. *Acta Agronómica*. 63(4): 326
- Palama TL, Khatib A, Choi YH, Payet B, Fock I, Verpoorte R, Kodja H. 2009. Metabolic changes in different developmental stages of *Vanilla planifolia* pods. *J Agr. Food Chem.* 57 (17): 7651 - 7658
- Palama LT, Menard P, Fock I, Choi HY, Bourdon E, Govinden-Soulange J, Bahut M, Payet B, Verpoorte R, Kodja H. 2010. Research article Shoot differentiation from protocorm callus cultures of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae): proteomic and metabolic responses at early stage. *Plant Biol.* 10: 82
- Paredes-Escalante JE, Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Allende-Molar R, Sañudo-Barajas J A, Valdez-Torres JB. 2009. Microorganismos antagonistas para el control del complejo de hongos causantes de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 27(1): 27 – 35
- Pelegriño G, Bellusci F. 2009. Molecular identification of mycorrhizal fungi in *Dactylorhiza sambucina* (Orchidaceae). *Versita*. 64 (5): 893 – 897

- Pérez E, Fernández F, Fernández R, Márquez R. 2002. Efecto de un biopreparado micorrízico en el cultivo de orquídeas ya establecidas en diferentes localidades. *Cultivos tropicales*. 23 (3): 53 – 55
- Pérez CA, Rojas SJ, Helson V. 2009. Biología y perspectiva de microorganismos endófitos asociados a plantas. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.* 1 (2): 286 – 301
- Peteira B, González I, Arias Y, Fernández TA, Miranda I, Martínez B. 2011. Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Revista de Protección Vegetal*. 26(1): 16 – 22
- Philip VJ, Nainar SAZ. 1988. Structural changes during the in vitro germination of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae). *Ann. Bot.* 61 (2): 139 – 145
- Pinaria AG; Liew EC; Burgess IW. 2010. Fusarium species associated with vanilla stem rot in Indonesia. *Australas. Plant Path.* 39: 176 – 183
- Piontelli E. 2013. Diversidad y polimorfismo en el género *Exophiala*: manejo de las especies comunes en el laboratorio de baja complejidad. *Bol. Micol.* 28(1): 2 – 15
- Ploetz RC. 2007. Diseases of tropical perennial crops: Challenging problems in diverse environments. *Plant dis.* 91 (6):644 – 663
- Pochon J, Tardieux P. 1965. Técnicas de análisis de microbiología del suelo. Burgos, España.
- Porras-Alfaro A, Bayman P. 2007. Mycorrhizal fungi of *Vanilla*: diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycol.* 99 (4): 510 – 525
- Powers EM. 1995. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining Gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Appl Environ Microbiol.* 61 (10): 3756 – 3758

- Prapagdee B, Kuekulvong C, Mongkolsuk S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygrosopicus* against phytopathogenic fungi. *Int J Biol Sci.* 4(5): 330 – 337
- Ramírez-Gama, RM, Luna MB, Velásquez MO, Vierna GL, Mejía CA, Tsuzuki RG, Hernández GL, Müggenburg L, Camacho CA, Urzúa HMC. 2006. Manual de Prácticas de Microbiología General. 5ª edición. Facultad de Química. UNAM. México.
- Ramos ZE, Jiménez ST, Tapia HA. 2007. Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (Orchidaceae). *Lankesteriana.* 7 (1-2): 322 – 325
- Rangel-Villafranco M, Ortega-Larrocea MP. 2007. Efforts to conserve endangered terrestrial orchids *in situ* and *ex situ* at two natural reserves within central Mexico. *Lankesteriana* 7 (1-2): 326 – 333
- Rasmussen HN. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. *Plant and Soil.* 244: 149 – 163
- Rasmussen HN, Rasmussen FN. 2007. Trophic relationships in orchid mycorrhiza – diversity and implications for conservation. *Lankesteriana* 7: 334 – 341
- Rasmussen HN, Rasmussen FN. 2009. Orchid mycorrhiza: implications of a mycophagous life style. *Oikos* 118: 334 – 345
- Riddell RW. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia.* 42 (2): 265 – 270
- Rincón LEC, Gutiérrez FAA. 2012. Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Rev Colomb Biotecnol.* 14 (1): 285 – 295
- Rivas M, Warner J; Bermúdez M. 1998. Presencia de micorrizas en orquídeas de un jardín botánico neotropical. *Rev. Biol. Trop.* 46 (2): 211 – 216

- Rodríguez KF. 1994. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. Mycol. 86 (3): 376 – 385
- Rodríguez Z, Boucourt R, Rodríguez J, Albelo N, Núñez O, Herrera FR. 2006. Aislamiento y selección de microorganismos con capacidad de degradar almidón. Cuban. J Agr. Sci. 40 (3): 349 – 354
- Ryckeboer J, Mergaert J, Vaes K, Klammer S, De Clercq D, Coosemans J, Insam H, Swings J. 2003. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. Ann. Microbiol. 53: 349 – 410
- Saksirirat, W, Hoppe, H H. 1991. Secretion of Extracellular Enzymes by *Verticillium psalliotae* Treschow and *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas During Growth on Uredospores of the Soybean Rust Fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in Liquid Cultures. J Phytopathol. 131: 161 – 173
- Sánchez-Fernández RE, Sánchez-Ortiz BL, Sandoval-Espinosa YKM, Ulloa-Benítez Á, Armendáriz-Guillén B, García-Méndez MC, Macías-Rubalcava ML. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas. 16(2): 132 – 146
- Santoyo G, Valencia-Cantero E, Orozco-Mosqueda MC, Peña-Cabriales JJ, Farías-Rodríguez R. 2010. Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. Terra Latinoamericana. 28 (1): 53 – 60
- Sarabia-Ochoa M, Madrigal P R, Martínez TM, Carreón AY. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. Biológicas. 12 (1): 65 – 71
- Sato T, Moriwaki J, Uzuhashi S, Degawa Y, Ono T, Nishimura K. 2012. Molecular phylogenetic analyses and morphological re-examination of strains belonging to three rare *Colletotrichum* species in Japan. Microbiol. Cult. Collect. 28 (2): 121 – 134



- Saunders GC, Owens SJ. 1998. RAPD and ITS Analysis of Orchid Mycorrhizal Fungi. *En: Mycorrhiza Manual*. Ajit Varma. Springer-Verlag Berlin
- Schenk PM, Carvalhais LC, Kazan K. 2012. Unraveling plant-microbe interactions: can multi-species transcriptomics help? *Trends Biotechnol.* 30 (3): 177 – 184
- Schotz B, Geoffroy A, Dainat B, Bessière JM, Boutois B, Hassaert-Mckey M, Selosse MA. 2010. A case study of modified interactions with symbionts in a hybrid Mediterranean orchid. *American J Bot.* 97 (8): 1278 – 1288
- Schulz B, Boyle C. 2005. The endophytic continuum. *Mycol. Res.* 109 (6): 661 – 686
- Selosse M-A, Martos F, Perry BA, Padamsee M, Roy M, Pailler T. 2010. Saprotrophic fungal mycorrhizal symbionts in achlorophyllous orchids. Finding treasures among the ‘molecular scraps’? *Plant Signal. Behav.* 5 (4): 1 – 5
- Selosse M-A, Boullard B, Richardson. 2011. Noël Bernard (1874-1911): orchids to symbiosis in a dozen years, one century ago. *Symbiosis* 54: 61 – 68
- SEMARNAT 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. *Diario Oficial*.
- SEMARNAT 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres: Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio de la lista de especies en riesgo. *Diario Oficial*.
- Servicio Meteorológico Nacional. Servicio Meteorológico Nacional Valores normales de 2012 para Papantla de Olarte, Veracruz. Consultado el 2012 12 14
- Serrano S, Arregui L, Calvo P, Salvadó H, Zornoza A, Fernández N, Rodríguez E, Pérez-Uz B. 2008. Comunidades de protistas asociados a plantas con eliminación de nitrógeno.V Jornadas

- Técnicas de Transferencia de Tecnología sobre Microbiología del Fango Activo. Sevilla (España). 30 – 31
- Shan XC, Liew ECY, Weatherhead MA, Hodgkiss IJ. 2002. Characterization and taxonomic placement of Rhizoctonia-like endophytes from orchid roots. *Mycologia*. 94 (2): 230 – 239
- Sharma S, Kumar V, Tripathi RB. 2011. Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *J Microbiol. Biotechnol. Res.* 1 (2): 90 – 95
- Sierra GA. 1956. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*. 23: 15 – 22
- Sosa LAI, Pazos Álvarez-Rivera V, Torres CD, Casadesús RL. 2011. Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*. 15 (1): 39 – 44
- Soto-Arenas MA, Cribb P. 2010. A new infrageneric classification and synopsis of the genus *Vanilla* Plum. ex Mil. (Orchidaceae: Vanillinae). *Lankesteriana* 9: 355 – 398
- Soto-Arenas MA, Dressler RL. 2010. A revision of the Mexican and Central American species of *Vanilla* plumier ex Miller with a characterization of their ITS region of the nuclear ribosomal DNA. *Lankesteriana* 9: 285 – 354
- Suyama K, Yamamoto H, Naganawa T, Iwata T y Komada H. 1993. A plate count method for aerobic cellulose decomposers in soil by Congo red staining. *Soil Sci. Plant Nutr.* 39 (2): 361 – 365
- Swarts NP, Dixon KW. 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Ann Bot.* 104: 543 – 556
- Talubnak C, Soyong K. 2010. Biological control of vanilla anthracnose using *Emericella nidulans*. *J. Agr. Sci. Tech.* 6 (1): 47 – 55

- Tao G, Liu Z, Sun B, Zhu Y, Cai L, Liu X. 2012. Occurrence and diversity of endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae) in Guizhou, China. *Afric J Microb Res.* 6 (12): 2859 – 2868
- Tarkka MT, Frey-Klett P. 2008. Mycorrhiza Helper Bacteria. *En: A. Varma (ed.) Mycorrhiza.* Springer-Verlag Berlin
- Tejera-Hernández B, Heydrich-Pérez M, Rojas-Badía MM. 2013. Aislamiento de *bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agron. Mesoam.* 24 (2): 357 – 364
- Téllez-Jurado A, Cruz RMG, Mercado FY, Asaff TA, Arana-Cuenca A. 2009. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista Mex Micol.* 30: 73 – 80
- Thomas J, Bhai RS. 2000. *Sclerotium* rot-a new disease of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in India. *J. Spices Aromat. Crops.* 9 (2): 175 – 176
- Trujillo I, Díaz A, Hernández A, Heydrich M. 2007. Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. *Rev. Protección Veg.* 22(1): 41 – 46
- Tsavkelova E. 2011. Bacteria associated with orchid roots. 221-258. *En: Bacteria in agrobiology: plant growth responses.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG, Netrusov AI. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol Res.* 162: 69 – 76
- Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Lobakova ES, Kolomeitseva GL, Netrusov AI. 2001. Microbiota of the orchid rhizoplane. *Microbiol.* 70 (4): 492 – 497
- Tsavkelova E, Cherdyntseva T, Netrusov A. 2004. Bacteria associated with the roots of epiphytic orchids. *Microbiol* 73: 710 – 715
- Tsavkelova E, Cherdyntseva T, Netrusov A. 2005. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiol* 74: 46 – 53

- Tsavkelova E, Lobakova E, Kolomeitseva G, Cherdyntseva T, Netrusov A. 2003. Localization of associative cyanobacteria on the roots of epiphytic orchids. *Mikrobiologiya*. 72: 86 – 91
- Tsavkelova E, Lobakova E, Kolomeitseva G, Cherdyntseva T, Netrusov A. 2003. Associative cyanobacteria, isolated from the roots of epiphytic orchids. *Mikrobiologiya*. 72: 92 – 97
- Tsavkelova E, Oeser B, Oren-Young L, Israeli M, Sasson Y, Tudzynski B, Sharon A. 2012. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. *Fungal Genet Biol*. 49: 48 – 57
- Turner S, Pryer KM, Miao VPW, Palmer JD. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Euk Microbiol*. 46: 327 – 338
- Walkley A; Black IA. 1934. An examination of method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci*. 37: 29 – 38
- Wani P, Khan M, Zaidi A. 2007. Co-inoculation of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria to promote growth, yield and nutrient uptake in chickpea. *Acta Agron. Hung*. 55 (3): 315 – 323
- Watanabe K, Baker PW. 2000. Environmentally relevant microorganisms. *J Biosci. Bioeng*. 89 (1): 1 – 11
- Watanabe T. 2010. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. CRC press.
- Whigham DF, McCormick MK, O'Neill JP. 2008. Specialized seedling strategies II: orchids, bromeliads, carnivorous, plants and parasites. 79 - 91. *En: Allessio LM, Thomas PV, Simpson RL (eds.) Seedling ecology and evolution*. Cambridge University Press. New York, United States of America

- Wilkinson KG, Dixon KW, Sivasithamparam K. 1989. Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids, *New Phytol.* 112: 429 – 435
- Wilkinson KG, Dixon KW, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL. 1994. Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant and Soil.* 159 (2): 291 – 295
- Xing Y-M, Chen J, Cui J-L, Chen X-M, Gou S-X. 2011. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietman. *Curr Microbiol.* 62: 1218 – 1224
- Xiong W, Zhao Q, Xue C, Xun W, Zhao J, Wu H, Li R, Shen Q. 2016. Comparison of fungal community in black pepper-vanilla and vanilla monoculture systems associated with vanilla *Fusarium* wilt disease. *Front. Microbiol.* 7: 117
- Yadav RKP, Kakamanoli K, Vokou D. 2010. Estimating bacterial population on the phyllosphere by serial dilution plating and leaf imprint methods. *Ecoprint: An International Journal of Ecology.* 17: 47 – 52
- Yoder JA, Zettler LW, Stewart SL. 2000. Water requirements of terrestrial and epiphytic orchid seeds and seedlings, and evidence for water uptake by means of mycotrophy. *Plant Sci.* 156: 145 – 150
- Yoder JA, Imfeld SM, Heydinger DJ, Hart CE, Collier MH, Gribbins KM, Zettler LW. 2010. Comparative water balance profiles of Orchidaceae seeds for epiphytic and terrestrial taxa endemic to North America. *Plant Ecol.* 211: 7 – 17
- Yuan L, Yang ZL, Li S-Y, Hu H, Huang J-L. 2010. Mycorrhizal specificity, preference, and plasticity of six slipper orchids from South Western China. *Mycorrhiza.* 20: 559 – 568
- Zambrano ER, Jiménez ST, Tapia H. 2007. Estudio de bacterias asociadas a orquídeas (Orchidaceae). *Lankesteriana* 7 (1-2): 322 – 325

Zhi-Lin Y, Yi-Cun C, Yung Y. 2009. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting on epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. World J Microb Biot. 25 (2): 295 – 303



**ANEXO 1. Medios de cultivo y diluciones para el aislamiento de los microorganismos.**

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Dilución</b>	<b>10<sup>2</sup></b>	<b>10<sup>3</sup></b>	<b>10<sup>4</sup></b>	<b>10<sup>5</sup></b>	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>10<sup>7</sup></b>	<b>Días de incubación</b>
Agar Nutritivo/bacterias totales (AN)					■	■	■	4
Agar Papa Dextrosa /hongos totales (PDA)		■	■	■				4
PDA con Rosa de Bengala/hongos (PDA+RB)		■	■	■				4
Solubilizadores de fósforo* Picovskaya (PVK)			■	■	■			7
Czapeck/actinomicetos (Cz)			■	■	■			7
Fijadores de Nitrógeno Rennie (RN)			■	■	■			7
Amilolíticos (am)*		■	■	■				7
Celulolíticos(cel)*		■	■	■				7
Protolíticos (prot)*		■	■	■				7
Lipolíticos (lip)*		■	■	■				7

\* Microorganismos totales