

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, MORFOLÓGICA  
Y MOLECULAR DE MICROORGANISMOS CULTIVABLES ASOCIADOS A  
LA RIZOSFERA Y AL SUSTRATO DE PLANTAS DE VAINILLA**

**CLAUDIA LUCÍA ÁLVAREZ LÓPEZ**

**Tesis de Maestría presentada para optar al título de  
Magíster en Ciencias-Geomorfología y Suelos**

**Director**

**MAURICIO MARÍN MONTOYA, Ph.D.**

**Codirector**

**WALTER OSORIO VEGA, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE MEDELLÍN  
FACULTAD DE CIENCIAS  
2012**

Los abajo firmantes certificamos que hemos leído este documento y que, en nuestra opinión, es satisfactoria en calidad, profundidad y competencia como Tesis para el grado de Magister en Ciencias - Geomorfología y Suelos.

Comité de evaluadores:



---

Jurado 1



---

Jurado 2



---

Director



---

Codirector

## **DEDICATORIA**

A mis hijitas Sofía y Susana que son lo más lindo de mi vida, por toda la paciencia, amor y comprensión que tuvieron durante estos años de estudio.

A mi esposo Walter a quien amo, respeto y admiro. Gracias por tus enseñanzas, y por ser un ejemplo a seguir.

A mis padres por todo el amor, apoyo y acompañamiento que recibí durante este proceso.

## **RECONOCIMIENTO**

Esta investigación fue financiada por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia a través del proyecto “Cultivo e Industrialización de la Vainilla en Colombia” Contrato No. 082-2008V6151-3701 de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín en convenio con CORANTIOQUIA y la empresa BIOANDES Ltda.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a Mauricio Marín, mi profesor, no sólo por haber sido un excelente guía en este trabajo, sino por su apoyo, sus enseñanzas, su dedicación y amistad. Gracias por todo lo que pude aprender, no sólo en aspectos académicos sino de calidad humana.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación del proyecto “Cultivo e industrialización de la vainilla en Colombia” del cual hace parte este trabajo. Y a las entidades que de una u otra manera participaron para que este proyecto fuera una realidad.

A la profesora María Claudia Díez por su liderazgo y apoyo en la ejecución del proyecto.

A la profesora Olga Montoya y su equipo del laboratorio de Microbiología por el apoyo en apartes de esta investigación.

A Carolina Santa y demás compañeros del laboratorio de Biología Celular y Molecular por su ayuda en diferentes fases de la investigación.

A mis compañeros de la maestría por su apoyo moral y su amistad.

A Walter, por su paciencia, por sus valiosos aportes para enriquecer este proyecto y por su dedicación a las niñas mientras yo adelantaba mis estudios.

## RESUMEN

El cultivo de la vainilla (*Vanilla planifolia*) es altamente promisorio en Colombia; sin embargo, poco se conoce acerca de su manejo nutricional y mucho menos sobre el uso de microorganismos benéficos con potencial biofertilizante. Este estudio se planteó con el objetivo de evaluar la actividad *in vitro* de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla, en procesos de transformación de nutrientes tales como amonificación, solubilización de fosfatos orgánicos e inorgánicos, degradación de celulosa y fijación biológica de nitrógeno. Los microorganismos se aislaron en medios de cultivo selectivos y se clasificaron en los siguientes grupos funcionales a partir de pruebas *in vitro*: celulolíticos (CEL), proteolíticos/amonificantes (PROT), fijadores de nitrógeno atmosférico (FBN) y solubilizadores de fosfato orgánico (FIT) e inorgánico (PSM). De los aislamientos originalmente obtenidos, se seleccionó para la identificación molecular, al menos una cepa de cada tipo morfológico diferenciable en cada medio, siendo evaluadas 44 cepas bacteriales y 8 micóticas. La identificación taxonómica de los aislamientos de hongos se realizó con base en la amplificación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr. Para el caso de las bacterias se amplificó la subunidad pequeña (16S) del ADNr. Los CEL más eficientes fueron los hongos *Penicillium griseofulvum* y *Aspergillus fumigatus*, los PROT fueron identificados como bacterias del complejo *Bacillus cereus* y *Serratia* sp. Los FBN fueron tres cepas de *Pseudomonas koreensis*, en los cual se confirmó la presencia del gen *nifH*. El más sobresaliente FIT fue un hongo de la especie *Plectosphaerella cucumerina*. Los PSM más efectivos correspondieron a dos bacterias, una filogenéticamente relacionada con el género *Serratia* y la otra identificada como *Pseudomonas koreensis*. Se realizó una confirmación fenotípica de la identidad de aquellos microorganismos que resultaron más eficientes en las diferentes pruebas *in vitro*, mediante series bioquímicas, para el caso de las bacterias, y observaciones morfológicas para los hongos. Los resultados de esta investigación sugieren que existe un alto potencial para desarrollar biofertilizantes a partir de los microorganismos rizosféricos de vainilla, que redunden en el mejoramiento de la nutrición, el crecimiento y la sanidad vegetal de los cultivos comerciales de esta especie en Colombia.

**Palabras clave:** celulolíticos, proteolíticos, -amonificantes, microorganismos solubilizadores de fosfato, fijación asimbiótica de nitrógeno.

# MOLECULAR, BIOCHEMICAL, AND MORPHOLOGICAL IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS ASSOCIATED TO THE RHIZOSPHERE AND SUBSTRATE OF VANILLA PLANTS

## ABSTRACT

The cultivation of vanilla (*Vanilla planifolia*) is highly promising in Colombia; however, little is known about the management of the crop, specifically in regard to its nutrition, and even less is known about the effects of beneficial rhizosphere microorganisms, which have the potential to serve as biofertilizers. This study concerned the *in vitro* evaluation of these microorganisms as functional groups to determine their potential use as biofertilizers. The microbes were isolated in selective media for functional groups such as cellulolytic (CEL), proteolytic/amonifiers (PROT), organic (FIT) and inorganic phosphate solubilizers (PSM), and asymbiotic nitrogen fixing bacteria (FBN). After isolation and purification, DNA was extracted from 52 microbial isolates in order to proceed with molecular identification based on ITS and 16S rDNA sequencing for fungi and bacteria, respectively. The results indicated that the most effective CEL were *Penicillium griseofulvum* and *Aspergillus fumigatus*. Those significant for their activity as PROT were identified as bacteria belonging to the *Bacillus cereus* complex and *Serratia* sp. Among the FBN there were three isolates belonging to *Pseudomonas koreensis* that stood out as being abundant and fast-growing in the selective medium; moreover, it was confirmed that the gen *nifH* was present in these isolates and was responsible for this activity. The most efficient FIT was a fungus phylogenetically related to *Plectosphaerella cucumerina*. Finally, the most effective PSM corresponded to two bacteria, one of which is phylogenetically related to the genus *Serratia* and the other to the genus *Pseudomonas koreensis*. The abundance and diversity of rhizosphere microorganisms found was significant; furthermore, some of the microorganisms showed high potential to be used as biofertilizers that could serve to improve the nutrition, growth and health of vanilla plants.

**Keywords:** cellulolytic, proteolytic, amonifiers, phosphate solubilizers, asymbiotic N<sub>2</sub>-fixers.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>Reconocimiento</b> .....	<b>iv</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>v</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>vi</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de Tablas</b> .....	<b>x</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>xii</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>xv</b>
<b>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Objetivos</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.1. Objetivo general</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2. Referencias</b> .....	<b>3</b>
<b>CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1. Generalidades del cultivo de vainilla</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2. Microorganismos asociados a la nutrición de plantas</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2.1. Ecología de los microorganismos promotores del                 crecimiento de las plantas</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2.2. Mecanismos de promoción del crecimiento en las plantas</b> .....	<b>10</b>
<b>2.3. Grupos funcionales de microorganismos</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3.1. Microorganismos celulolíticos</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3.2. Microorganismos Proteolíticos-amonificantes</b> .....	<b>14</b>
<b>2.3.3. Microorganismos solubilizadores de fosfato</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3.4. Bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico</b> .....	<b>17</b>
<b>2.3.5. Microorganismos asociados a las raíces de orquídeas</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4. Identificación molecular de microorganismos</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5. Métodos basados en el uso de ácidos nucleicos</b> .....	<b>26</b>
<b>2.5.1. Hibridización molecular</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5.2. Técnicas basadas en PCR</b> .....	<b>28</b>
<b>2.5.3. PCR en tiempo real</b> .....	<b>29</b>
<b>2.6. Referencias</b> .....	<b>30</b>



	<b>Pág.</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>CAPITULO 3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE VAINILLA.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1. Anexos capitulo 3.....</b>	<b>94</b>
<b>CAPITULO 4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA <i>IN VITRO</i> DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE VAINILLA CON USO POTENCIAL COMO BIOFERTILIZANTES.....</b>	<b>103</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>157</b>

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 3.1. Composición de los medios selectivos ( $\text{g L}^{-1}$ ) utilizados para aislar microorganismos de cinco grupos funcionales, asociados a la rizosfera de plantas de vainilla.....	<b>82</b>
Tabla 3.2. Identificación de bacterias asociadas a la rizosfera de plantas de vainilla, a partir de análisis BLAST de secuencias 16S del ADNr.....	<b>83</b>
Tabla 3.3. Matriz de identidad basada en secuencias de la región 16S del ADNr de bacterias Gram positivas aisladas de la rizosfera de plantas de vainilla del Occidente de Antioquia.....	<b>85</b>
Tabla 3.4. Matriz de identidad basada en secuencias de la región 16S del ADNr de bacterias Gram negativas aisladas de la rizosfera de plantas de vainilla del Occidente de Antioquia.....	<b>86</b>
Tabla 3.5. Identificación de hongos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla, a partir de análisis BLAST de secuencias ITS del ADNr.....	<b>87</b>
Tabla 3.6. Matriz de identidad basada en secuencias de la región ITS del ADNr de hongos aislados de la rizosfera de plantas de vainilla del Occidente de Antioquia.....	<b>88</b>
Tabla 4.1. Microorganismos en grupos funcionales aislados de la rizosfera de plantas de vainilla utilizados en este estudio.....	<b>135</b>
Tabla 4.2. Composición de los medios de cultivo selectivos ( $\text{g L}^{-1}$ ) utilizados para aislar microorganismos de cada grupo funcional.....	<b>136</b>
Tabla 4.3. Microorganismos obtenidos de la rizosfera de plantas de	

	<b>Pág.</b>
vainilla que resultaron altamente eficientes en diferentes actividades funcionales evaluadas bajo condiciones <i>in vitro</i> .....	<b>137</b>
Tabla 4.4. Pruebas bioquímicas evaluadas para la caracterización de bacterias aisladas de la rizosfera de plantas de vainilla.....	<b>138</b>
Tabla 4.5. Características morfológicas de las colonias bacteriales aisladas de la rizosfera de plantas de vainilla .....	<b>139</b>
Tabla 4.6. Resumen comparativo de los resultados coloniales y de la serie bioquímica realizada con el aislamiento 40MA190 con respecto a la descripción original de la especie <i>Pseudomonas koreensis</i> .....	<b>140</b>
Tabla 4.7. Resumen comparativo de los resultados de la prueba API 20NE realizada con el aislamiento 40MA190 con respecto a la descripción original de la especie <i>Pseudomonas koreensis</i> .....	<b>141</b>
Tabla 4.8. Resumen comparativo de los resultados coloniales y de la serie bioquímica realizada con el aislamiento 75MA194 con respecto a diferentes especies del género <i>Serratia</i> .....	<b>142</b>
Tabla 4.9. Diferenciación de especies del complejo <i>Bacillus cereus</i> .....	<b>143</b>
Tabla 4.10. Comparación de la cepa 71MA226 hallada en este estudio con las características descritas en el Manual de Bergey's para las diferentes especies del complejo <i>Bacillus cereus</i> .....	<b>144</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 2.1. Proceso de amonificación en el suelo a partir de materiales orgánicos.....	<b>15</b>
Figura 2.2. Síntesis del oxalato por acción de la enzima <i>oxaloacetato Hidrolasa</i> producida por hongos del suelo.....	<b>16</b>
Figura 2.3. Acción de la enzima fosfatasa sobre el enlace ester liberando fosfato inorgánico .....	<b>17</b>
Figura 2.4. Asimilación de $\text{NH}_4^+$ a partir de bacterias fijadoras de $\text{N}_2$ .....	<b>18</b>
Figura. 3.1. Aspecto de los cultivos de microorganismos rizosféricos de vainilla creciendo y formando halos en los diferentes medios selectivos.....	<b>89</b>
Figura 3.2.a. Amplicones obtenidos con los cebadores ITS1/ITS4 (600 pb) a partir de ADN de hongos aislados de la rizosfera de plantas de vainilla.....	<b>90</b>
Figura 3.2.b. Amplicones obtenidos con los cebadores pA/pc5B (1300 pb) a partir de ADN de bacterias aisladas de la rizosfera de plantas de vainilla.....	<b>90</b>
Figura 3.3. Árbol filogenético basado en secuencias de la región 16S del ADNr de bacterias Gram positivas provenientes de la rizosfera de plantas de vainilla del Occidente de Antioquia.....	<b>91</b>
Figura 3.4. Árbol filogenético basado en secuencias de la región 16S del ADNr de bacterias Gram negativas provenientes de la rizosfera de plantas de vainilla del Occidente de Antioquia.....	<b>92</b>
Figura 3.5. Árbol filogenético basado en secuencias de la región ITS del ADNr de hongos provenientes de la rizosfera de plantas de vainilla del	

	<b>Pág.</b>
Occidente de Antioquia.....	<b>93</b>
Figura 4.1. Aspecto de la cámara usada para evaluar la producción microbial de CO <sub>2</sub> .....	<b>145</b>
Figura 4.2. pH (arriba) y concentración de P en solución (abajo) en el medio inoculado con diferentes microorganismos aislados de la rizosfera de vainilla.....	<b>146</b>
Figura 4.3. Concentración de P en solución en el medio inoculado con diferentes microorganismos aislados de la rizosfera de vainilla.....	<b>147</b>
Figura 4.4. Apariencia de la biomasa de los hongos evaluados en el medio de crecimiento cuya fuente fue fitato de sodio.....	<b>148</b>
Figura 4.5. Producción de CO <sub>2</sub> como resultados de la inoculación de un medio con diferentes microorganismos aislados de la rizosfera de vainilla.....	<b>149</b>
Figura 4.6. Concentración de amonio en el medio inoculado con diferentes microorganismos aislados de la rizosfera de vainilla.....	<b>150</b>
Figura 4.7. Colonias (arriba) y micromorfología (abajo) de las bacterias (A) Complejo <i>Bacillus cereus</i> , (B) <i>Pseudomonas koreensis</i> y (C) <i>Serratia</i> sp.....	<b>151</b>
Figura 4.8. Colonias de <i>Bacillus</i> creciendo en Agar Mossel.....	<b>152</b>
Figura 4.9. Características micromorfológicas del hongo <i>Aspergillus fumigatus</i> . (A) Conidióforos y vesículas (800X), (B) Agrupación de conidióforos (400X), (C) Detalles de las vesículas y esterigmas (1000X), (D) y (E) Conidias (1000X y 1200X).....	<b>153</b>

	<b>Pág.</b>
Figura 4.10. Colonias de los hongos (A) <i>Aspergillus fumigatus</i> , (B) <i>Penicillium griseofulvum</i> y (C) <i>Plectosphaerella cucumerina</i> .....	<b>154</b>
Figura 4.11. Características micromorfológicas del hongo <i>Penicillium griseofulvum</i> . (A) y (B) Conidióforos con verticilios (800X y 1200X), (C) Conidias (1200X).....	<b>155</b>
Figura 4.12. Características micromorfológicas del hongo <i>Plectosphaerella cucumerina</i> . (A) Micelio y conidias (400X), (B) Conidióforos (800X), (C) Agregación de hifas (800X), (D) y (E) Detalles de conidióforos y conidias individuales y en cabezas (1200X).....	<b>156</b>

## ANEXOS

	<b>Pág</b>
Anexo 3.1. Extracción de ADN de bacterias - método SDS.....	<b>94</b>
Anexo 3.2.a. Multiplicación de microorganismos para posterior extracción de su ADN.....	<b>96</b>
Anexo 3.2.b. Proceso de extracción de micelio de hongos y maceración con nitrógeno líquido.....	<b>96</b>
Anexo 3.3. Extracción de ADN de hongos – método CTAB.....	<b>97</b>
Anexo 3.4. Gel de agarosa resultado de la extracción de ADN de bacterias (A) y hongos (B).....	<b>98</b>
Anexo 3.5. Purificación de productos de PCR con el protocolo Qiaquick PCR Purification Kit.....	<b>99</b>
Anexo 3.6. Morfología de algunas de las colonias de hongos y bacterias aisladas de la rizosfera de plantas de vainilla.....	<b>100</b>
Anexo 3.7. Electroferograma de la región 16S del ADN ribosomal de <i>Pseudomonas</i> sp. con el cebador pc5B.....	<b>101</b>
Anexo 3.8. Electroferograma de la región ITS del ADN ribosomal de <i>Plectosphaerella cucumerina</i> con el cebador ITS4.....	<b>102</b>

# CAPITULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

La vainilla (*Vanilla planifolia*) es un cultivo altamente promisorio en Colombia debido a que existen las condiciones agroecológicas adecuadas para su crecimiento y desarrollo; sus frutos curados producen la vainilla, una de las especias de mayor costo y el saborizante más utilizado en la industria alimenticia a nivel mundial (Spices Board, 2000). En Colombia, a pesar de que hay registros de la presencia de *V. planifolia* en los bosques nativos de la región del Chocó (Misas, 2005; Ledezma *et al.*, 2006), y reportes de esta especie en la Costa Atlántica, la región de Urabá, los valles interandinos y los bosques de la cuenca Amazónica, el área cultivada comercialmente es muy pequeña y los rendimientos que se obtienen son bajos comparados con otros países (Patiño, 2002). Esto se debe a diversos factores, entre ellos, a una baja floración y al desconocimiento de los requerimientos técnicos y agronómicos para su manejo, lo que dificulta la implementación de prácticas que mejoren la eficiencia del cultivo. Adicionalmente, los agricultores se basan en prácticas empíricas adaptadas de otros cultivos diferentes a la vainilla, o toman como referencia las experiencias obtenidas en otros sitios, no necesariamente con características agroecológicas similares (Soto-Arenas, 2006).

La nutrición de la vainilla es uno de los aspectos más críticos para la producción comercial, debido a que está estrechamente relacionada con la floración y, por ende, con la producción de vainas y el rendimiento del cultivo. El desarrollo radicular de estas plantas ocurre principalmente sobre un manto de materia orgánica, cuyo contenido nutricional y descomposición se constituyen en aspectos fundamentales para su crecimiento y desarrollo (Hernández, 2011). Los procesos de transformación del sustrato dependen en buena medida de la actividad microbial asociada a la rizosfera. Se han asociado tasas de crecimiento vegetativo alto con incremento en floración y fructificación como respuesta a una mejor nutrición, lo cual sugiere que un adecuado suministro de nutrientes a las plantas, redundará en mayores rendimientos en este cultivo (Mc Gregor, 2005).



Debido a que las raíces se desarrollan sobre un sustrato orgánico en descomposición, se considera que los microorganismos asociados a la raíz pueden jugar un papel importante en el suministro de nutrientes para las plantas (Andrade, 1999; Vessey, 2003). Ya que en nuestro medio poco se conoce sobre los microorganismos que habitan la rizosfera de la vainilla y las funciones específicas que ellos pueden cumplir, este proyecto se planteó con el fin de realizar una caracterización de la microbiota asociada a la rizosfera de un cultivo piloto bajo cobertizo techo-sombra ubicado en el municipio de Sopetrán (Antioquia), evaluando sus principales actividades en los procesos de transformación de nutrientes a partir de pruebas bioquímicas *in vitro* de solubilización de fosfatos orgánicos e inorgánicos, degradación de celulosa y proteínas y fijación biológica de nitrógeno.

Se espera que la identificación y la caracterización de los microorganismos habitantes de la rizosfera de vainilla que sean capaces de movilizar nutrientes hacia la raíz del cultivo, mejoren el conocimiento de los procesos de nutrición de este cultivo. De esta manera se podrán desarrollar a futuro, biofertilizantes que promuevan la nutrición y el crecimiento vegetal. Algunas experiencias reportadas en otras partes del mundo, sugieren que ésta es una alternativa viable para el cultivo de vainilla (Anilkumar, 2004; Nybe *et al.*, 2009; Murthy *et al.*, 2010). Este tipo de manejo biológico de la nutrición vegetal es muy apreciado por los potenciales consumidores internacionales de vainilla y podría generar un valor agregado adicional. Por otro lado, debido a la actual preocupación por los efectos adversos que se pueden presentar con la aplicación de agroquímicos, existe un constante y creciente interés por conocer y entender las actividades de cooperación entre poblaciones microbiales de la rizosfera y cómo éstas podrían ser aplicadas en la agricultura.

El enfoque de este trabajo consiste en seleccionar microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla mediante medios selectivos para diferentes grupos funcionales, para proceder a su identificación molecular y finalmente seleccionar aquellos que presenten las mayores actividades bioquímicas específicas en pruebas *in vitro*, para la confirmación fenotípica de su identidad taxonómica.

## **1.1. OBJETIVOS**

### **1.1.1. General**

Aislar y seleccionar microorganismos a partir de evaluaciones bioquímicas y moleculares, con potencial de uso como biofertilizantes en plántulas de vainilla.

### **1.1.2. Específicos**

Aislar microorganismos de la rizosfera de plantas de vainilla en medios de cultivo selectivos, que presenten capacidad de descomponer celulosa, proteínas, fijar N<sub>2</sub> y solubilizar fosfato inorgánico y orgánico.

Evaluar mediante pruebas bioquímicas, la efectividad de los microorganismos aislados para descomponer celulosa, proteínas, fijar N<sub>2</sub> y solubilizar fosfato inorgánico y orgánico.

Identificar los microorganismos seleccionados en las pruebas bioquímicas, mediante análisis morfológicos y moleculares.

## **1.2. REFERENCIAS**

Andrade G. 1999. Interacciones microbianas en la rizosfera, 551–575 pp.. *En*: Siqueira J.O., Moreira F.M.S., Lopes A.S., Guilherme L.R., Faquin V., Furtinni A.E., Carvalho J.G. (Eds.). Soil fertility, Soil biology and Plant Nutrition Interrelationships. Brazilian Soil Science Society/Federal University of Lavras/Soil Science Department (SBCS/UFLA/DCS), Lavras, Brasil,

Anilkumar A.S. 2004. Vanilla cultivation: A profitable agri-based enterprise. *En*: Kerala calling. February. 26-29 p.

Hernández H.J. 2011. Production of vanilla - Agricultural systems and curing, 1-25 pp. *En*: Havkin-Frenkel D. and Belanger F.C. (Eds.). Handbook of Vanilla Science and Technology, First Edition, Blackwell Publishing Ltd.

- Ledezma E. Ramírez G. and Pino-Benítez N. 2006. Forest orchids of the Choco region. *Lyonia*, 10(1): 17-31.
- McGregor A. 2005. Diversification into high-value export products: case study of the Papua New Guinea vanilla industry. Agriculture Management, marketing and finance service (AGFS) working document 2. Agriculture Support System Division. FAO. Rome. 49 p.
- Misas G. 2005. Orquídeas de la Serranía del Baudó, ConCreto, Chocó-Colombia. 787 p.
- Murthy G., Umesha K., Smitha G.R., and Krishnamanohar R. 2010. Effect of growth regulators and bio-inoculants on rooting and growth of vanilla stem cuttings. *Indian Journal of Horticulture*, 67(1): 90-93.
- Nybe E.V., Rajan S., and Raj N.M. 2009. Plantation crops, spices, medicinal and aromatic plants, 205 pp. *En: Alexander et al. (Eds.). The Adhoc Package of Practices Recommendations for Organic Farming*. Kerala Agricultural University. Kerala, India.
- Patiño V.M. 2002. Historia y dispersión de los frutales nativos del Neotrópico. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Cali, Colombia. 655 p.
- Soto-Arenas M.A. 2006. La vainilla: Retos y perspectiva de su cultivo. *Biodiversitas*, 66:2.
- Spices Board. 2000. Vanilla status paper. Spices board, Cochin, India. 33 p.
- Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*. 255: 571–586.

## CAPITULO 2

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE VAINILLA

La vainilla es una planta tropical trepadora, semiepífita, considerada como especie “única” dentro de la familia Orchidaceae, por ser una especie, no sólo ornamental, sino de valor industrial, ya que produce frutos comestibles de los cuales se extrae la vanillina, una especia con propiedades aromáticas únicas. El género *Vanilla* tiene entre 110 a 200 especies descritas (Govaerts *et al.*, 2006; Bory *et al.*, 2008; Ranadive, 2011) que están distribuidas a través de áreas tropicales y subtropicales de Norteamérica, Suramérica, África y Asia (Cameron, 2011). Recientemente en Colombia se reportó la especie *V. helleri* en el Pacífico Colombiano (Moliner-Hurtado *et al.*, 2011). La vainilla es nativa de los bosques tropicales del Sureste de Mesoamérica (Soto-Arenas, 2003; Hagsater *et al.*, 2005).

Las especies comercialmente cultivadas para la producción natural de vanillina, uno de los saborizantes de alimentos más costosos del mundo (Spices Board, 2000), son la *V. planifolia*, *V. tahitensis* y *V. pompona* (Havkin-Frenkel y Dorn, 1997; Lubinsky *et al.*, 2011). Se prefiere *V. planifolia* sobre las otras dos especies, por sus propiedades organolépticas (Ehlers y Pfister, 1997; Sreedhar *et al.*, 2007), correspondiendo al 95% de la producción mundial de este extracto. La vanillina natural es obtenida de los frutos o vainas curadas de vainilla (Purseglove *et al.*, 1981; Augstburger *et al.*, 2000). En el año 2007, Zheng *et al.*, reportaban un consumo mundial de vanillina estimado en 12.000 toneladas por año de las cuales apenas 50 t provenían de las vainas curadas de la vainilla; el resto es producto sintetizado químicamente con una calidad muy por debajo del producto natural.

El principal país productor de vainilla es Madagascar, con un 60% de la producción mundial, seguido de Indonesia y China. Hay reportes que indican que 87-90% de la producción se presenta en Madagascar e Indonesia (Sujatha y Bath, 2010; Brownell,

2011). También se cultiva en Uganda, Isla Comoro, Isla Reunión, Java, Filipinas, Papua Nueva Guinea, Fiji e India (Minoo *et al.*, 2010). En América existen cultivos comerciales en México, Costa Rica, Puerto Rico y Brasil (Berninger y Salas, 2003; Styger *et al.*, 1999).

La vainilla crece casi exclusivamente en climas subtropicales, cálidos y húmedos entre los 27° latitud Norte y Sur en todos los continentes (Soto-Arenas, 2003). Sin embargo, se reporta que crece mejor entre 10°N y 20°S de latitud (Sarma *et al.*, 2010). Tiene buen desarrollo en zonas con temperatura entre 25 y 32°C (Anandaraj *et al.*, 2005) con un promedio cercano a los 27°C y con una humedad relativa media de 80% (Fouché y Jouve, 1999). Por debajo de los 18°C se pueden afectar la actividad de las enzimas responsables del aroma y el desarrollo de las vainas (Zaubin y Wahid, 1995), además de la intensidad de la floración (Ranadive, 2005). Temperaturas que excedan los 32°C causan amarillamiento de la parte vegetativa y caída prematura de frutos (Anandaraj *et al.*, 2005).

De acuerdo con Potty y Krishnakumar (2003), la vainilla se puede cultivar con éxito en áreas más cercanas al ecuador, donde el clima húmedo y cálido prevalece a través de todo el año y con altitudes de hasta 1100 m.s.n.m. Por otro lado se requiere una precipitación media anual de 1500 a 3000 mm bien distribuida, con la presencia de un período relativamente seco (de uno ó dos meses) para inducir la floración (Puthur y Krishnakumar, 2006). Las áreas donde se presenta una estación seca prolongada no son adecuadas para el cultivo de vainilla y es necesario que se establezcan sistemas de riego (Damirón, 2004; McGregor, 2005).

Por ser una planta adaptada a las condiciones del interior del bosque tropical, para su cultivo se requiere establecer sombrío. Un exceso de sombra causa un débil crecimiento y baja producción de flores, mientras que exceso de luz solar causa golpe de sol en hojas y tallos y caída prematura de frutos. En ambas condiciones extremas las plantas son más propensas al ataque de las plagas y enfermedades (Hernández y Lubinsky, 2010).

Los suelos más adecuados para el cultivo de vainilla son los suelos franco arcillosos, bien drenados, profundos y ricos en materia orgánica. El aporte de *mulch*, más que la

fertilidad del suelo en sí misma, es importante para el éxito del cultivo. La mejor fuente de nutrientes permanente es la capa de mulch profunda y descompuesta mantenida regularmente sobre y alrededor de las raíces de vainilla que proporciona además, drenaje y aireación (Brownell, 2011). El sistema radicular de la vainilla es superficial, se localiza en los primeros 10 cm de la materia orgánica del suelo y se extiende en un radio de 1.20 m (Castro, 2008). La capacidad de suministro de nutrientes depende de la fuente, la composición del material (Sarma *et al.*, 2010) y la actividad biológica de los microorganismos (Porrás-Alfaro y Bayman, 2007). Dada la alta porosidad de este material, las raíces pueden profundizarse y extenderse para tener un mejor desarrollo y crecimiento (Ramírez y Rapidel, 1999; Ploetz, 2006). Adicionalmente, el mulch ayuda a mantener la humedad del suelo, una adecuada temperatura y contribuye a disminuir la incidencia de arvenses (Hernández y Lubinsky, 2010; Hernández, 2011).

Bajo condiciones naturales, la presión de los patógenos que atacan las raíces de la vainilla no es muy alta debido a que la actividad microbiana asociada a la descomposición de la hojarasca no es un ambiente propicio para la proliferación de los hongos patógenos (Ramírez y Rapidel, 1999). Las raíces de vainilla son muy susceptibles a los encharcamientos en todas sus etapas de desarrollo, aún por períodos cortos, por lo que se recomienda establecer su cultivo en pendientes moderadas. El pH del suelo ideal está entre 5.5 y 7.0, si es más bajo y hay altas concentraciones de aluminio, puede requerir aplicación de enmiendas, debido a que los niveles altos de este elemento pueden ser tóxicos para algunas plantas, restringiendo el crecimiento y desarrollo radical o inhibiendo la absorción de algunos elementos como calcio, fósforo y magnesio. Además se favorece el establecimiento de hongos fitopatógenos (Hernández y Lubinsky, 2010).

Es poca la información disponible acerca de los efectos sobre el rendimiento del cultivo de vainilla con la fertilización química. Se desconocen los niveles óptimos de nutrientes requeridos por la planta. En la práctica, son inferidos de especies hortícolas de otros miembros de la familia Orchidaceae (Hernández y Lubinsky, 2010). Generalmente, la vainilla no es fertilizada más allá de la aplicación del mulch. En India se hacen aplicaciones anuales por planta de 40-60 g de nitrógeno (N), 20-30 g de fósforo ( $P_2O_5$ ) y 60-100 g de potasio ( $K_2O$ ) al suelo, y aplicaciones foliares del fertilizante 17-17-17 una

vez por mes para estimular crecimiento y floración (Anandaraj *et al.*, 2005). En investigaciones más recientes en ese mismo país se ha concluido que la adición de enmiendas orgánicas (vermicompost, estiércol de granja o podas de *Gliricidia* sp.) generaron un mejor beneficio económico que la adición de fertilizantes químicos (Sujatha y Bath, 2010). Los mismos autores indicaron que el efecto de la adición de las enmiendas orgánicas fue mayor cuando también se suministró agua de riego. En algunas regiones sólo se aplican fertilizantes cuando el precio de la vainilla está relativamente alto, lo cual contribuye a una inconsistencia en los niveles de producción (Zaubin *et al.*, 2010).

En investigaciones recientes en Colombia, Arango *et al.* (2011) reportaron la combinación de 75% de material orgánico leñoso o fibra de coco, 25% de hojarasca y 7 g por planta del fertilizante 27-11-11 como la mejor combinación para mejorar el crecimiento y desarrollo de plantas de vainilla recién establecidas. En Uganda se hacen mezclas de 30% de suelo, 30% de estiércol y 40% de materiales gruesos como cáscara de café, arena, trozos de corteza o carbón triturado (ADC Commercialization Bulletin, 2000).

Se ha reportado que cultivadores de vainilla en México no han encontrado respuesta a la fertilización química en cuanto a rendimiento de vainas; y, adicionalmente, si los soportes o tutores son árboles, con las aplicaciones de fertilizantes se puede aumentar el crecimiento del dosel ocasionando un sombrero excesivo y perjudicial para el cultivo. En ese mismo país, Castro y García (2007) encontraron que la fertilización en conjunto con otras prácticas culturales, tienen efecto sobre el aumento en la producción de vainas, siempre y cuando se disponga de agua permanente especialmente en la época seca y que los fertilizantes químicos no sean aplicados durante la época de la floración, porque se pueden presentar deformaciones en las estructuras florales. En Australia hay reportes de fertilización foliar en algunos cultivos comerciales de vainilla aplicando un cuarto de la dosis normalmente aplicada en otros cultivos (Exley, 2011).

Tal como se ha indicado, dentro de las prácticas agrícolas convencionales en el cultivo de la vainilla, está el sembrarla en sustratos orgánicos, lo cual ha sugerido que no es necesario fertilizar o que requieren muy poco fertilizante, pero se sabe que el

crecimiento de la vainilla es afectado por la disponibilidad de los nutrientes, más que por el sustrato de siembra (Padilla-Vega, 2009). Esta disponibilidad de nutrientes está dada por la acción de los microorganismos que habitan la rizosfera de la planta. En investigaciones en Costa Rica se han encontrado algunos microorganismos benéficos que mejoran la resistencia de la planta a enfermedades y algunos de éstos son utilizados como biofertilizantes para aplicar al cultivo de vainilla y mejorar la producción (Varela, 2011).

## **2.2. MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA NUTRICIÓN DE PLANTAS**

### **2.2.1. Ecología de los microorganismos promotores del crecimiento de las plantas**

Algunos microorganismos del suelo son fundamentales en los ciclos biogeoquímicos y su aplicación como biofertilizantes ha sido utilizada para aumentar la producción de cultivos por muchos años. La rizosfera es un importante entorno ecológico del suelo para las interacciones planta-microorganismo; es el volumen de suelo adyacente a las raíces donde se presenta una intensa actividad microbiana. Tales interacciones asociadas a la rizosfera son determinantes para la sanidad de las plantas y la fertilidad del suelo, ya que allí habitan tanto microorganismos patógenos como benéficos (Hayat *et al.*, 2010).

El efecto rizosfera es más alto para las bacterias, seguido por los hongos. Estos microorganismos que habitan la rizosfera se pueden clasificar en grupos funcionales como bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, microorganismos solubilizadores de fósforo, microorganismos celulolíticos y amilolíticos, microorganismos proteolíticos y hongos micorrizales, entre otros (Sylvia *et al.*, 1999). Se destacan entre las bacterias algunos grupos funcionales como amonificantes y nitrificantes (Osorio, 2007). Igualmente, se deben considerar los mecanismos de interacción que existen entre diferentes grupos y las implicaciones en el manejo de sistemas de agricultura sostenible (Johansson *et al.*, 2004).

Las relaciones entre los ciclos de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y otros ciclos biogeoquímicos y los grupos funcionales de microorganismos son altamente influyentes sobre el crecimiento, la productividad de las plantas y el ciclaje de nutrientes, debido a



que los microorganismos interactúan directamente con las raíces de las plantas (Matsumoto *et al.*, 2005; Torres y Lizarazo, 2006). Muchos de los microorganismos presentes en estos grupos funcionales son considerados como PGPR (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) (Kloepper y Schroth, 1978), término que hace referencia a rizobacterias benéficas que inducen incremento en el crecimiento de las plantas.

Los microorganismos considerados como PGPRs cumplen muchas funciones en el suelo, entre ellas, ayudan a solubilizar fosfato mineral y otros nutrientes, aumentan la resistencia de la planta al stress, ayudan a estabilizar los agregados del suelo mejorando su estructura y el contenido de materia orgánica. Hay mayor retención de nitrógeno orgánico del suelo y otros nutrientes aumentado su liberación, lo cual contribuye a la reducción de la aplicación de fertilizantes nitrogenados y fosfóricos (Hayat *et al.*, 2010). Se han reportado también PGPRs en procesos de biorremediación de suelos, degradando e incluso mineralizando compuestos orgánicos recalcitrantes en asocio con plantas (Zhuang *et al.*, 2007). Las PGPRs han sido divididas en dos grupos: las que están involucradas en el ciclaje de nutrientes y la fitoestimulación y las que se relacionan con el biocontrol de patógenos de plantas (Bashan y Holguin, 1998).

Se han reportado géneros con bacterias PGPRs como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, entre otros, (Kloepper, 1983). Así mismo se han caracterizado microorganismos como *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* como potenciales PGPRs por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en forma asimbiótica, colonizar raíces y producir compuestos que regulan las poblaciones de microorganismos de la rizosfera (Kapulnik, 2002).

### **2.2.2. Mecanismos de promoción del crecimiento en las plantas**

En el suelo se encuentran tanto microorganismos deletéreos como benéficos para las plantas. Los saprófitos benéficos de una amplia diversidad de grupos microbiales, son capaces de promover el crecimiento y la sanidad de las plantas. En estos grupos se encuentran los descomponedores de materia orgánica, las PGPRs y los hongos y bacterias antagonistas de patógenos de la raíz (Barea *et al.*, 2005).

Muchas rizobacterias y rizohongos promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas debido, entre otros factores, a la producción de ácidos orgánicos, la solubilización de fosfato, la solubilización de sales insolubles de zinc, la fijación asimbiótica de nitrógeno, el incremento de la nodulación simbiótica de leguminosas por rizobios que fijan N<sub>2</sub> y a la protección indirecta de la planta contra patógenos, debido a sus efectos antagonistas o a la liberación de antibióticos (Kloepper *et al.*, 1991; Wall, 2001; Pal *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2009). Algunos géneros que contienen miembros con estas actividades, incluyen *Streptomyces*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Mortierella*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, entre otros (Hoffland *et al.*, 2004; Ping, 2004; Barea *et al.*, 2005). Generalmente este tipo de microorganismos actúan en tres formas diferentes: sintetizan compuestos particulares para las plantas, facilitan la absorción de ciertos nutrientes del suelo y disminuyen o previenen los problemas de enfermedades en las plantas (Hayat *et al.*, 2010).

Se han propuesto mecanismos directos e indirectos en la promoción del crecimiento y desarrollo de las plantas por parte de los microorganismos. Los mecanismos indirectos sobresalientes incluyen la prevención de efectos deletéreos de organismos fitopatógenos del suelo mediante la producción de sideróforos y la síntesis de antibióticos; y la producción de ácido cianhídrico (HCN) y de enzimas como la *quitinasa* y la  $\beta$ -1-3 *glucanasa*, que degradan la pared celular de los hongos. Se denota que en este tipo de mecanismos, el microorganismo libera algún metabolito que afecta otros componentes de la rizosfera, lo que estimula un mejor desarrollo de la planta (Kloepper *et al.*, 1991). Por otro lado, los mecanismos directos incluyen la producción de metabolitos por parte de algunos PGPRs, los cuales estimulan el crecimiento vegetal y ocurren independientemente del resto de la población microbiana del suelo, indiferente del sustrato en que se encuentren. Entre los metabolitos producidos se conocen hormonas como auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico (Hayat *et al.*, 2010).

Las PGPRs tienen el potencial de contribuir a la promoción del crecimiento de las plantas en forma sostenible. Aislar e identificar estos y otros microorganismos del suelo como algunas especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* que combinan la capacidad de fijar nitrógeno con la producción de sustancias capaces de promover el crecimiento en las

plantas, podría incrementar significativamente la productividad de muchos cultivos en todo el mundo (Beneduzi y Passaglia, 2011).

### **2.3. GRUPOS FUNCIONALES DE MICROORGANISMOS**

La población de microorganismos del suelo es altamente diversa en lo que se refiere a variabilidad genética y a actividades funcionales (Barea *et al.*, 2005). Las interacciones microbianas son reguladas por señales moleculares específicas. Muchas de estas interacciones son responsables por procesos ambientales determinantes del suelo como son los ciclos biogeoquímicos de nutrientes y el mantenimiento de la sanidad de las plantas y la estructura del suelo. Se reconocen dos tipos de interacciones, las que se basan en material vegetal en descomposición, que afectan la energía y el flujo de nutrientes; y las que se presentan con raíces de plantas vivas (Barea *et al.*, 2005).

En la rizosfera de las plantas, esas interacciones, entre las raíces y los microorganismos que la habitan, son constantes y relevantes tanto agronómica como ecológicamente. Estos microorganismos se pueden agrupar de acuerdo a su actividad y participación en los ciclos biogeoquímicos. Muchos de estos grupos funcionales están presentes también, de acuerdo a su actividad, por fuera de la rizosfera y en materiales orgánicos en descomposición. La actividad microbial de microorganismos no rizosféricos puede ser importante para el control de las enfermedades de las plantas (Osorio, 2007).

El uso de técnicas moleculares para identificar microorganismos del suelo es clave para el estudio de la ecología de la rizosfera, por cuanto es rápida, no requiere conocimiento previo de los microorganismos a caracterizar y sus resultados son comparables con bases de datos globales (Pühler *et al.*, 2004).

#### **2.3.1. Microorganismos celulolíticos**

La celulosa es tal vez el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza. Es el componente principal de la pared celular de las plantas y el polisacárido estructural más abundante de todos los que se presentan en forma natural. La celulosa es el producto final de casi un tercio de todo el CO<sub>2</sub> fijado por las plantas (Meyer, 1994). Es un polisacárido constituido por moléculas de glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos

que interactúan entre sí por medio de puentes de hidrógeno, lo que conlleva a regiones altamente ordenadas que le dan características de resistencia e insolubilidad (Lynd *et al.*, 2002).

La descomposición de este polisacárido es parte importante del ciclo biológico del carbono. La utilización de la celulosa por los microorganismos es la responsable de uno de los mayores flujos de materia en la biosfera y es de interés cuando se quiere analizar el flujo de carbono tanto a escala local como global. Es además parte importante en los procesos de digestión anaeróbica y compostaje. Una de las características de la celulosa es su estructura cristalina, la cual es bastante resistente a la hidrólisis química y biológica; dicha estructura puede ser degradada mediante la acción de enzimas celulolíticas producidas por algunos microorganismos (Lynd *et al.*, 2002).

La celulosa es una molécula rica en energía; para hacerla disponible, algunos microorganismos producen *celulasas* extracelulares que la hidrolizan para convertirla en carbohidratos solubles que pueden pasar a través de su membrana celular (Meyer, 1994). Se ha reportado la acción enzimática de tres grupos de enzimas que actúan en la hidrólisis de la celulosa como son: las *endoglucanasas* que actúan sobre las regiones internas amorfas de la celulosa, específicamente hidrolizando los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos y originando oligosacáridos de diferentes tamaños. Otro grupo de enzimas son las *exoglucanasas* que actúan sobre los extremos libres de la celulosa liberando glucosa o celobiosa dependiendo de la enzima que actúe (*glucanohidrolasa* o *celobiohidrolasa*, respectivamente). Finalmente está el grupo de las  $\beta$ -*glucosidasas* que hidrolizan las celobiosas para llevarlas a monómeros de glucosa (Lymar *et al.*, 1995; Aro *et al.*, 2005; Castillo, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Bastias *et al.*, 2009; Sánchez, 2009; Dias *et al.*, 2010).

Entre las bacterias capaces de producir *celulasas* están *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Chromobacterium*, entre otras. Así mismo, muchos hongos de diferentes grupos taxonómicos (Ascomycetes, Basidiomycetes, Zygomycetes, etc.) son celulolíticos, siendo algunos de éstos miembros de los géneros habitantes del suelo *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Paecilomyces*, entre otros (Ahmad y Baker, 1987; Meyer, 1994; Khalid *et al.*, 2006).

Matsumoto *et al.* (2005) encontraron que los microorganismos celulolíticos se estimularon en la rizosfera de *Heliocarpus* sp., *Lithraea* sp. y *Poecilanthe* sp. por la presencia de hongos formadores de micorrizas, los cuales estimulan el crecimiento de las raíces incrementando, por lo tanto, la cantidad de celulosa disponible. Es conocido que en la rizosfera los microorganismos son capaces de usar un amplio rango de moléculas orgánicas complejas tales como ligninas, proteínas, celulosa y otros polisacáridos. El hecho de que los microorganismos celulolíticos utilicen estos sustratos complejos refuerza la idea de que no dependen de los exudados de la raíz.

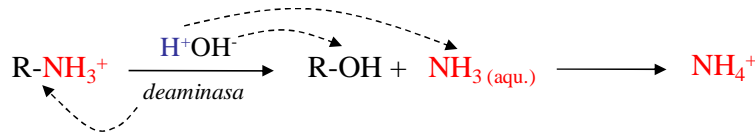
### **2.3.2. Microorganismos Proteolíticos-amonificantes**

La hidrólisis de las proteínas o proteólisis, es un proceso esencial para mantener una buena calidad del suelo y alta productividad en los cultivos (Loll y Bollag, 1983). La mayor parte del nitrógeno que está presente en los suelos se encuentra en forma orgánica constituyéndose en un gran reservorio de este elemento, siendo en gran parte derivado de la degradación, por las enzimas *proteasas*, de las proteínas y péptidos (Mrkonjic *et al.*, 2009).

Durante el proceso de la degradación hidrolítica de los polipéptidos, parte del nitrógeno es movilizado y devuelto al ciclo global del N (Ladd, 1972; Kloos *et al.*, 1998). Sin este proceso, el N orgánico quedaría en una forma no disponible para otros organismos. Este es el primer paso en el proceso de liberación de compuestos nitrogenados al ciclo del N (Paul y Clark, 1996; Mrkonjic *et al.*, 2009). Las *proteasas* son ubicuas y pueden ser producidas por plantas, animales y microorganismos. Las *proteasas* intracelulares son las encargadas de regular el N interno en las células, mientras que las *proteasas* extracelulares son responsables por la degradación del N de la biomasa en proceso de descomposición (Mrkonjic *et al.*, 2009; Hofmockel *et al.*, 2010).

Un aspecto relevante de la acción de los microorganismos proteolíticos no es tanto la degradación de proteína como tal, sino la capacidad de liberar amonio al suelo, mediante la enzima *deaminasa*. Esta enzima se encarga de remover grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NH}_3^+$ ) vía hidrólisis, produciendo iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) los cuales son asimilables por las plantas (Myrold, 2004) (Figura 2.1). Este proceso es llamado

amonificación y es llevado a cabo por microorganismos conocidos como amonificantes tal como se ha reportado para *Bacillus* sp. (Havlin *et al.*, 1999; Mrkonjic *et al.*, 2009).



**Figura 2.1.** Proceso de amonificación en el suelo a partir de materiales orgánicos. Fuente: Osorio (2012).

### 2.3.3. Microorganismos solubilizadores de fosfato

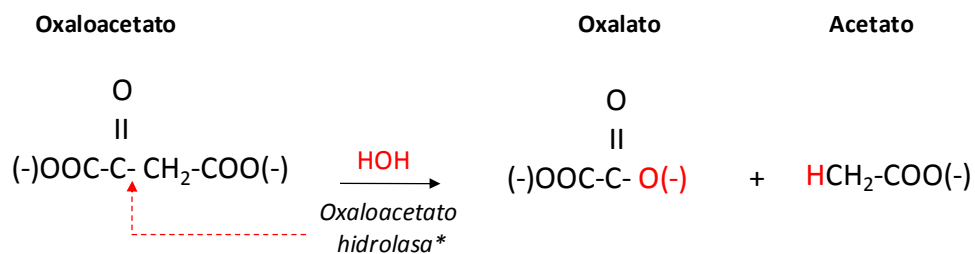
Los suelos cultivados normalmente tienen bajas cantidades de P disponible para las plantas, la deficiencia de este elemento se constituye en un serio limitante para la productividad vegetal (Havlin *et al.*, 1999; Foth, 1996). El fósforo se encuentra en diferentes compuestos orgánicos como fosfolípidos, fosfoazúcares, fosfatos de inositol, ácidos nucleicos, ATP, entre otros, que llegan al suelo mediante aporte de excretas de animales y de hojarasca (Barber, 1995). En el suelo existen microorganismos capaces de solubilizar fosfato orgánico e inorgánico a partir de diversos mecanismos.

La mayoría de los componentes del P orgánico en el suelo son fitatos que consisten principalmente de inositol penta- y hexa- fosfatos. La enzima *fitasa* es una de las *fosfatasas* responsables de la desfosforilación del fitato, por lo que juega un papel clave en la nutrición de las plantas (Unno *et al.*, 2005).

La principal forma de almacenamiento de fosfato en las semillas de plantas y en el polen es el fitato, el cual es liberado mediante la acción de las enzimas *fitasas* (Foth, 1996). Estas enzimas pertenecen a una clase especial de *fosfomonoesterasas* y se encuentran en plantas, microorganismos y algunos tejidos de animales (Konietzny y Greiner, 2004). El fitato es degradado a ortofosfato por estas enzimas (Konietzny y Greiner, 2002).

Un gran número de microorganismos incluyendo bacterias, levaduras y hongos filamentosos han sido utilizados para la producción de *fitasas* como *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Klebsiella*, *E. Coli*, *Enterobacter*, *Sporotrichum*, *Rhizomucor*, *Azospirillum*, entre otros (Richardson y Hadobas, 1997; Kerovuuo *et al.*, 1998; Idriss *et al.*, 2002; Patel y Archana, 2009; Javed *et al.*, 2010). La mayoría de estos microorganismos producen *fitasas* intracelulares solamente. La actividad degradadora de fitato extracelular ha sido observada principalmente en hongos filamentosos, identificándose cepas de *Aspergillus niger* como las mejores productoras (Gargova *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 2001). Las bacterias que han mostrado actividad *fitasa* extracelular son las que pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Enterobacter* (Konietzny y Greiner, 2002).

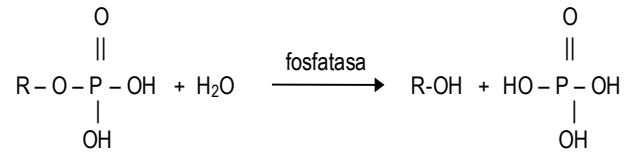
Por otra parte, se han reportado microorganismos del suelo capaces de disolver fosfatos inorgánicos insolubles a través de la producción de ácidos orgánicos (Osorio, 2011). Entre los ácidos orgánicos, o sus bases conjugadas, más efectivos están el ácido cítrico/citrato y el ácido oxálico/oxalato. El primero se forma en el ciclo de Krebs a través de la acción de la enzima *citrato-sintetasa*. Por su parte, el ácido oxálico se forma a partir de la hidrólisis del oxaloacetato en el citoplasma mediante la acción de la enzima *oxaloacetato hidrolasa* (Figura 2.2) (Kubicek *et al.*, 1988; Han *et al.*, 2007).



**Figura 2.2.** Síntesis del oxalato por acción de la enzima *oxaloacetato hidrolasa*\* producida por hongos del suelo. Fuente: Kubicek *et al.* (1988) y Han *et al.*, (2007).

En el proceso de solubilización del fósforo y su transformación hasta compuestos asimilables por las plantas, los microorganismos juegan un papel fundamental mediante

la producción de enzimas *fosfatasa* que hidrolizan los enlaces ester que unen al carbono con el fosfato para liberar el ión fosfato a la solución del suelo (Figura 2.3) (Havlin *et al.*, 1999).



**Figura 2.3.** Acción de la enzima *fosfatasa* sobre el enlace ester liberando fosfato inorgánico (Fuente: Osorio, 2012).

Dentro de este grupo se encuentran los microorganismos que son capaces de solubilizar fosfato de compuestos orgánicos o inorgánicos, los cuales pueden desarrollar interacciones sinérgicas con otros microorganismos como las micorrizas (Barea *et al.*, 1997; Osorio y Habte, 2001; Vessey, 2003). Se han reportado géneros de bacterias como *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, y de hongos como *Fusarium*, *Aspergillus* y *Mortierella* con capacidad de solubilizar fosfatos orgánicos e inorgánicos y a nivel de especie se reportan *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas fluorescens*, por ser especialmente eficientes como solubilizadores de fosfato no disponible en la solución del suelo (Mehta y Nautiyal, 2001; Osorio y Habte, 2001; Konietzny y Greiner, 2004).

Así mismo, se han encontrado correlaciones positivas entre grupos funcionales solubilizadores de fosfato y proteolíticos (amonificantes) en la rizosfera de algunas plantas creciendo en condiciones de baja fertilidad, donde se concluye que estas plantas dependen para su crecimiento y desarrollo, de los nutrientes suministrados por estos grupos funcionales (Matsumoto *et al.*, 2005).

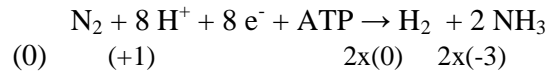
#### 2.3.4. Bacterias fijadoras de Nitrógeno atmosférico

Uno de los grupos funcionales más importantes del suelo lo componen las bacterias fijadoras de N<sub>2</sub>, al ser los únicos organismos que tienen la *nitrogenasa*, una enzima que reduce el N<sub>2</sub> a amonio. La fijación biológica de N<sub>2</sub> (FBN) es el primer paso del ciclo del N desde la atmósfera hasta la biósfera, lo cual es clave para la productividad de

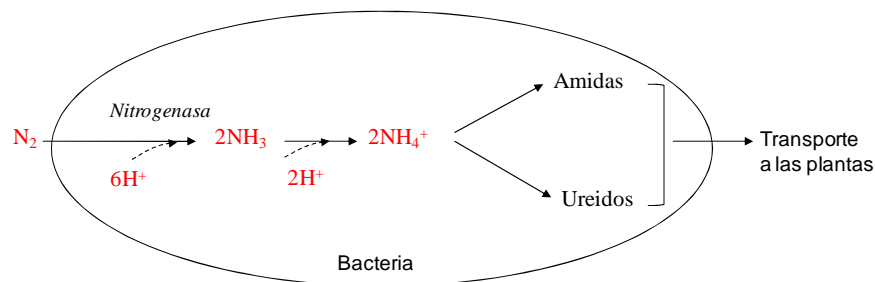


las plantas (Barea *et al.*, 2005). Estas bacterias pueden estar asociadas o no con las raíces de las plantas llegando inclusive a formar relaciones simbióticas tal como ocurre con el grupo de los rizobios (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*) y diversos tipos de leguminosas (Graham, 1999; Barea *et al.*, 2005).

Otro tipo de asociación (no simbiótica) ocurre entre diversos tipos de bacterias y plantas no leguminosas de diferentes familias botánicas (Zuberer, 1999). Estas bacterias pueden habitar en la rizosfera, el rizoplasma y el interior de los tejidos vegetales sin llegar a formar estructuras especializadas (nódulos). Entre los géneros más representativos de este grupo se reportan *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Acetobacter* y *Clostridium*, entre otros (Döbereiner, 1992; Baldani *et al.*, 1997; Boddey *et al.*, 2006; Flores-Mireles *et al.*, 2007; Bashan y de-Bashan, 2010). La reacción FBN consiste en la reducción del dinitrógeno (N<sub>2</sub>) a amoníaco (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), con una alta demanda de ATPs; la reacción puede presentarse de la siguiente forma:



El NH<sub>3</sub><sup>+</sup> sintetizado mediante el proceso anterior es convertido a NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el ambiente ácido de la rizosfera. Posteriormente el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> es utilizado por las bacterias o las plantas en un proceso llamado asimilación del amonio, en el cual, por lo general se forma glutamina mediante la enzima *glutamina sintetasa*. A partir de este compuesto se forman otros aminoácidos ureidos y amidas, además de otros compuestos nitrogenados (Figura 2.4) (Myrold, 2004).



**Figura 2.4.** Asimilación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a partir de bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> (Graham, 1999).

Esta reacción tiene unas altísimas demandas de energía ( $H^+$ , electrones y ATPs) que se obtienen a partir de la oxidación respirativa de sustratos carbonáceos, usualmente liberados por la planta. Estos compuestos carbonáceos no siempre están fácilmente disponibles para los microorganismos en la rizosfera debido a la alta competencia que existe en este ambiente y esto se constituye en uno de los grandes limitantes de la FBN. Bajo tales circunstancias la FBN no es tan efectiva para suministrar el nitrógeno requerido por las plantas.

Dentro de este grupo funcional se han reportado bacterias como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, entre otras (Zuberer, 1999). Es frecuente observar también asociación de hongos formadores de micorrizas y bacterias fijadoras de nitrógeno asimbióticas que participan en la absorción de nutrientes, siendo algunos ejemplos especies de los géneros *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* (Hayat *et al.*, 2010).

### **2.3.5. Microorganismos asociados a las raíces de orquídeas**

Existe una amplia evidencia experimental reportada de que algunas bacterias y hongos son capaces de llevar a cabo actividades que de una u otra manera contribuyen a beneficiar el crecimiento y la sanidad de las plantas y la calidad del suelo. Una alternativa para llevar esto a la práctica es realizar un adecuado manejo de los microorganismos mediante la preparación de inoculantes o biofertilizantes para reducir el uso de agroquímicos.

En las orquídeas, y en particular en el cultivo de vainilla, poco se sabe acerca de la composición y la actividad funcional de los microorganismos asociados a la raíz, con excepción de la asociación con hongos micorrizales, que son fundamentales para el desarrollo de estas plantas y que han sido estudiados desde tiempo atrás (Burgeff, 1959). A pesar de que Colombia es uno de los países con mayor diversidad de orquídeas, con un estimado de 15% del total de especies en el mundo (Ortiz *et al.*, 1994; Senghas, 2001), han sido muy pocos los estudios relacionados con los hongos formadores de micorriza en estas especies (Díaz *et al.*, 2000; Mosquera-Espinosa, 2010). Recientemente, ha habido un creciente interés por estudiar este tipo de asociación en orquídeas debido al impacto que tienen en la nutrición y en la

germinación de las semillas de especies de alto valor comercial (Otero *et al.*, 2004; Otero y Bayman, 2009; Mosquera-Espinosa, 2010).

La mayoría de los hongos que participan en la asociación micorriza-orquidoide pertenecen al género *Rhizoctonia*. En algunas ocasiones se han considerado a las orquídeas como parásitas del hongo debido a que forman con este una relación muy dependiente (Mosquera-Espinosa *et al.*, 2010). En plantas de vainilla, Hernández (2011) indica que el aporte de material orgánico al cultivo de vainilla aumenta la actividad biológica, promoviendo el desarrollo de las micorrizas del grupo de *Rhizoctonia* y de antagonistas de patógenos.

Recientemente, en investigaciones realizadas en *V. planifolia*, Ordoñez (2012) encontró estados perfectos e imperfectos de la familia Ceratobasidiaceae de los Agaricomycetes, familia que incluye reconocidos endófitos de la vainilla como *Rhizoctonia* sp. De igual forma Hernández (2011) menciona a los hongos *Ceratobasidium*, *Thanatephorus* y *Tulasnella* estableciendo asociación con plantas de vainilla. Específicamente se encontró que el hongo *Ceratobasidium* tuvo un efecto positivo sobre la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas. Porras-Alfaro y Bayman (2007) realizaron estudios en cuatro especies de vainilla de Puerto Rico, Cuba y Costa Rica y encontraron que el hongo más común asociado a las raíces terrestres fue *Ceratobasidium*, mientras que *Tulasnella* lo fue para las raíces aéreas.

Las zonas aptas para el cultivo de vainilla por lo general son de baja fertilidad. Una alternativa para disminuir este problema es el uso de biofertilizantes, los cuales son un componente importante en el manejo integrado de nutrientes pues son costo-efectivos, eco-amigables y se constituyen en una fuente renovable de nutrientes (Gruhn *et al.* 2000). Estos consisten de mezclas de cepas eficientes de microorganismos fijadores de N<sub>2</sub>, solubilizadores de fosfato o microorganismos celulolíticos usados para aplicar directamente a las semillas de las plantas o a materiales en descomposición. El objetivo de estas aplicaciones es incrementar el número de tales microorganismos y acelerar los procesos microbiales que aumentan la disponibilidad de nutrientes y que pueden ser fácilmente asimilados por las plantas (Albino y Andrade, 2006; Gentili y Jumpponen, 2006).

Es de amplio conocimiento que muchas especies de *Bacillus* y *Paenibacillus* pueden contribuir a la sanidad, crecimiento y desarrollo de las plantas con su actividad de solubilizadores de P o controladores biológicos de fitopatógenos, siendo la mayoría de biofertilizantes comerciales basados en especies de *Bacillus*, dada su producción de endosporas que permiten darle estabilidad a la población durante la formulación y almacenamiento de los productos (Beneduzi y Passaglia, 2011).

Wilkinson *et al.* (1994) aislaron bacterias asociadas a 12 especies de orquídeas y encontraron que las cepas más abundantes pertenecían a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Kurthia* y *Arthrobacter* y en menor cantidad a miembros de la familia Enterobacteriaceae.

En plantaciones de vainilla se recomienda inocular los sustratos con microorganismos como *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum* sp. y bacterias solubilizadoras de fósforo para promover el crecimiento de las plantas (Anilkumar, 2004). En investigaciones recientes, se han aislado microorganismos solubilizadores de fosfato de suelo rizosférico y de raíces de *Vanilla* sp. creciendo naturalmente en diferentes sitios y en cultivos, encontrándose mayor cantidad de microorganismos con esta capacidad en las plantas silvestres (Bernal, 2009). Se ha determinado además que el consorcio de especies de *Azotobacter* y de *Pseudomonas* fluorescentes ha sido sobresaliente como promotores del crecimiento y establecimiento de plantas de vainilla micropropagadas (Surendra *et al.*, 2009).

En investigaciones realizadas por Tsavkelova *et al.* (2007) se encontraron microorganismos productores de auxinas que estimulaban la formación y el crecimiento de raíces de *Paphiopedilum appletonianum* y *Pholidota articulata*, dos orquídeas tropicales. Entre los géneros de microorganismos encontrados se destacan *Streptomyces*, *Bacillus*, *Erwinia* y *Pseudomonas*.

Aunque es incipiente la investigación, hay reportes de microorganismos como *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* asociados a las raíces de la vainilla que son utilizados como control biológico de enfermedades causadas por hongos; donde además de disminuir el ataque de estos patógenos, podrían estimular el crecimiento aumentando la producción (He, 2007; Naik *et al.*, 2009). En

estudios similares, Suseela y Kumar (2008), evaluaron un consorcio de rizobacterias en vainilla, que incluye especies de *Bacillus*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*. Por otra parte, Suseela *et al.* (2009) evaluaron el control biológico de *Fusarium*, el cual ocasiona la pudrición de las raíces de vainilla, mediante la aplicación de microorganismos aislados de la rizosfera de plantas de vainilla de los géneros *Rhizoctonia*, *Trichoderma* y *Paecilomyces*, encontrando que aunque todos los microorganismos ejercieron control sobre *Fusarium* en menor o mayor grado, *Paecilomyces* controló el patógeno casi en su totalidad.

En vista del creciente interés mundial por los cultivos orgánicos certificados, Sadanandan y Hamza (2006) evaluaron en cultivos de vainilla aportes al suelo de diferentes mezclas de materiales orgánicos y biofertilizantes comparados con fertilizantes NPK de síntesis química, usualmente recomendados para este cultivo. Se resalta que hubo incremento en el rendimiento y en la calidad de las vainas con los tratamientos orgánicos en mezcla con biofertilizantes. Estos mismos autores realizaron estudios similares en diferentes especies llegando a la conclusión de que los biofertilizantes y el aporte de materiales orgánicos no sólo juegan un papel muy importante en el mejoramiento y la calidad del suelo y los cultivos, sino también en la sostenibilidad de los agroecosistemas a largo plazo. En algunas especies evaluadas se presentó una reducción en el rendimiento entre un 10-20 %, pero esto podría ser compensado con el aumento en el valor de venta de los productos orgánicos certificados.

#### **2.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS**

La taxonomía de microorganismos se ha fundamentado tradicionalmente en el empleo de caracteres morfológicos y de propiedades fisiológicas. En muchos casos estas características son variables, produciendo información insuficiente o poco precisa que conduce a la generación de clasificaciones artificiales. En las últimas décadas, el desarrollo de herramientas de biología molecular ha jugado un papel fundamental en la taxonomía moderna de los hongos y bacterias. Adicionalmente, su empleo ha mejorado el nivel de conocimiento sobre la biología de los microorganismos y sus relaciones

filogenéticas con otros organismos, así como también han potenciado su exploración bioprospectiva (Hawksworth *et al.*, 1995; Weising *et al.*, 1995; Zuluaga *et al.*, 2011).

Estas técnicas se fundamentan en el análisis de cromosomas, y/o genes de sus productos (proteínas) e incluyen entre otras: electroforesis en campo pulsado, hibridización DNA-DNA, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), análisis de la relación G + C, polimorfismo del DNA amplificado al azar (RAPD), polimorfismo de la longitud del DNA amplificado (AFLP), PCR específico, microsatélites, polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP) y secuenciación directa del DNA (Oren y Papke, 2010).

En la taxonomía de microorganismos, las regiones que codifican para el ADN ribosomal (ADNr) han sido las más empleadas para realizar estos estudios, debido a que contienen tanto regiones altamente variables como secuencias muy conservadas, que pueden ser empleadas para realizar análisis a todos los niveles taxonómicos. La región ADNr se encuentra en todos los seres vivos, pues participa directamente en la conformación de los ribosomas, estructuras celulares responsables de la síntesis de proteínas. Debido a esta importante función, se ha planteado que su evolución puede reflejar la misma evolución de los organismos vivos (Hillis *et al.*, 1996; Oren y Papke, 2010).

En los hongos y otros eucariotes, el ADNr está localizado tanto en el genoma nuclear como en el mitocondrial. En el caso del ADNr nuclear, este se encuentra organizado en unidades repetidas en tándem de aproximadamente 8-12 kb. Las unidades están conformadas por tres genes ribosomales: la subunidad 18S (subunidad pequeña-SSU), 28S (subunidad grande-SLU) y 5.8S y por dos regiones intergénicas: ITS1 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*). Cada grupo del tándem está separado de las otras unidades por regiones espaciadoras intergénicas (IGS), que pueden a su vez contener una copia de la subunidad 5S; aunque ésta generalmente se ubica en otras zonas del genoma (Edel, 1998; Vilgalys, 2004). En la actualidad numerosas secuencias de ADNr se encuentran disponibles en las bases de datos moleculares. Esto ha hecho posible el diseño de cebadores universales a partir de regiones conservadas que flanquean las regiones variables (Zuluaga *et al.*, 2009; Henrik *et al.*, 2010).

La región 5S fue inicialmente empleada para establecer relaciones filogenéticas entre organismos distantes evolutivamente. Sin embargo en los últimos años ha sido poco usada dada su alta conservación y corta longitud. La región 18S por su parte, se ha empleado especialmente para realizar estudios a nivel de orden o supraordinales, así por ejemplo Bowman *et al.* (1992) realizaron un trabajo pionero para determinar las relaciones filogenéticas entre las clases Basidiomycetes, Ascomycetes y Chytridiomycetes.

La subunidad grande se caracteriza por contener tanto regiones (dominios) que evolucionan rápidamente, como otras que lo hacen muy lentamente. Debido a esta característica, dicha región se ha empleado para realizar estudios supra y subgéricos. Además de las regiones ITS, los dominios más empleados para resolver problemas taxonómicos en hongos, son los altamente variables D1 y D2, ubicados en el extremo 5' de la región 28S (Göker *et al.*, 2003; Henrik *et al.*, 2010). Las regiones ITS evolucionan rápidamente debido a que presentan una menor presión de selección que las regiones codificadoras del ADNr. Esta característica ha sido empleada en la taxonomía de hongos para realizar estudios a nivel de géneros cercanos, especies e incluso de poblaciones (Henrik *et al.*, 2010).

A pesar de la gran utilidad que poseen las regiones ribosomales para ser empleadas en análisis filogenéticos, algunas veces se han encontrado incongruencias entre los árboles generados, la biología de los hongos estudiados y las relaciones evolutivas de los taxones definidos. La principal razón de tales problemas radica en la acción no uniforme de fuerzas evolutivas sobre las regiones ADNr de taxa cercanos. Esto se ha solucionado mediante el análisis de regiones adicionales del genoma tales como aquellas que codifican para proteínas tales como RPB1, RPB2, TEF1 $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina, y  $\gamma$ -actina (Schmitt *et al.*, 2009).

Las regiones codificadoras de proteínas han sido aplicadas para contestar preguntas taxonómicas a todos los niveles; por ejemplo han sido utilizadas para determinar las relaciones entre eucariotes ancestrales, así como para el estudio de las relaciones evolutivas de diferentes grupos de microorganismos (Schmitt *et al.*, 2009). Una de las principales características de estas regiones y de la cual se deriva su utilidad en estudios

filogenéticos, es su organización en regiones codificadoras (exones) interrumpidas por regiones no codificadoras (intrones). Los intrones aparentemente no poseen una función fundamental en las células, de tal manera que están sujetas a un control evolutivo menos riguroso que aquel ejercido sobre los exones; así, dichas regiones presentan un alto nivel de variación en sus secuencias de nucleótidos, lo cual las faculta para su análisis filogenético (Steenkamp, 2000).

Los análisis evolutivos utilizando regiones codificadoras de proteínas se fundamentan en la hipótesis que los genes o regiones seleccionadas son ortólogas, es decir que su historia evolutiva es similar entre los individuos bajo estudio. Eventos que conducen a la formación de copias múltiples de genes (duplicación, hibridización y transferencia horizontal) pueden resultar en genes no ortólogos, y por lo tanto su utilización para definir relaciones filogenéticas puede arrojar la definición de grupos polifiléticos. Entre los genes ortólogos más utilizados en estudios taxonómicos de eucariotes, se encuentran aquellos que codifican para las tubulinas, *polimerasas* de ARN dependientes de ADN, *quitina sintetasas*, factores de elongación, histona H3 y actinas (Steenkamp, 2000). Para el caso de bacterias, estas técnicas emplean cebadores específicos que se unen a regiones ribosomales (16S o ITS) o funcionales como *endoglucanasa*, *hrpB* y *fliC*, (Schonfeld *et al.*, 2003).

En la actualidad, la base para la detección, identificación y caracterización de bacterias y hongos en agroecosistemas, consiste en la combinación de metodologías morfológicas y bioquímicas tradicionales con técnicas moleculares soportadas en los desarrollos bioinformáticos de los últimos años (Schmitt *et al.*, 2009; Henrik *et al.*, 2010).

Entre los procedimientos de detección de microorganismos más comúnmente utilizados se destacan el empleo de medios de cultivo selectivos y semiselectivos. Sin embargo, el grado de sensibilidad de estos procedimientos es variable y frecuentemente bajo ( $10^2$  a  $10^3$  UFC  $g^{-1}$ ), debido entre otras razones a diferencias en la microflora del suelo que impiden el crecimiento del microorganismo de interés y al grado de subjetividad generado en la lectura de las colonias del microorganismo por parte de los operarios (Van Der Wolf *et al.*, 1998).



La utilización de plantas indicadoras ha sido otro componente de diagnóstico rutinario de microorganismos, aunque su utilidad es limitada por el bajo nivel de sensibilidad de la prueba, que oscila entre  $10^4$  y  $10^6$  UFC  $g^{-1}$  (Pradhanang *et al.*, 2000). Además, se han diseñado diversas técnicas serológicas que utilizan anticuerpos policlonales y monoclonales en esquemas tipo ELISA ó pruebas de flujo lateral para uso en campo (Pradhanang *et al.*, 2000).

La sensibilidad de los métodos serológicos se puede aumentar mediante la aplicación de procedimientos de enriquecimiento como la incubación de extractos en medio líquido (Elphinstone *et al.*, 1996), alcanzándose niveles de sensibilidad de 20 a 200 UFC  $g^{-1}$  (Priou *et al.*, 2006). Sin embargo, la generación de reacciones cruzadas con organismos cercanos o con bacterias que producen EPS con epítopes similares a los presentes en las especies bacteriales de interés, hacen necesaria la confirmación de los resultados con otras pruebas que ofrezcan mayores niveles de confiabilidad tales como aquellas basadas en la técnica de PCR (Denny y Hayward, 2001).

Aunque las técnicas basadas en PCR tienen un alto potencial como método de detección, su empleo rutinario es limitado por las inconsistencias generadas debido a la inhibición enzimática de las reacciones por parte de compuestos fenólicos y polisacáridos ácidos presentes en las plantas, ó por los ácidos húmicos y fúlvicos de los suelos (Picard *et al.*, 1992). Existen diferentes alternativas metodológicas para solucionar dichos inconvenientes, destacándose la utilización de la técnica de inmunocaptura que separa eficientemente las células bacteriales de interés del resto de componentes de los extractos mediante el empleo de anticuerpos policlonales.

En la actualidad se viene incrementando el número de trabajos tendientes a incorporar la metodología de PCR en tiempo real en los programas de detección y cuantificación de inóculo de hongos y bacterias de diferentes sustratos y tejidos.

## **2.5. MÉTODOS BASADOS EN EL USO DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Una ventaja de los métodos basados en el uso de ácidos nucleicos es la alta precisión que ofrecen para la detección de microorganismos, así como su uso simultáneo para la caracterización genética de las cepas e incluso de su interacción con el hospedero. Estos

métodos se dividen básicamente en dos grupos: hibridización con secuencias de ADN/ARN y aquellos que emplean la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Álvarez, 2010; Oren y Papke, 2010).

### **2.5.1. Hibridización molecular**

El principio de esta técnica se basa en la fijación de pequeñas cantidades de extractos de plantas (*Tissue-printing*) o de ácidos nucleicos totales (*Dot-blot*) en membranas de nylon o nitrocelulosa, que son reconocidos por sondas marcadas radioactivamente o por sondas no isotópicas. El resultado se monitorea por el cambio de coloración que se observa en la membrana (detección colorimétrica) ó sobre una película de detección (métodos radioactivos ó quimioluminiscentes) (Álvarez, 2010).

*Hibridización Dot-blot:* En esta metodología, se parte de una pequeña cantidad de la muestra a evaluar, a la cual se realiza extracción de ácidos nucleicos procediendo a su desnaturalización a altas temperaturas o por tratamiento con álcali; luego una pequeña muestra es fijada en la membrana con la ayuda de UV. Los sitios no específicos de reconocimiento en la membrana son bloqueados por incubación en la etapa de prehibridización, utilizando una solución que contiene una proteína (generalmente albúmina de suero bovino). Posteriormente, se realiza el proceso de hibridización en la membrana con una sonda marcada, para luego lavar y realizar el revelado, que depende del tipo de sonda utilizada. Se ha reportado que la técnica puede detectar hasta 0,5 pg del genoma. Considerando que la prueba es fiable, rápida y fácil de desarrollar, se presenta como una alternativa al uso de la técnica de ELISA convencional, cuando no se cuentan con anticuerpos específicos para un microorganismo de interés o cuando los costos de éstos son muy altos (Astier *et al.*, 2007; Álvarez, 2010).

*Tissue-printing:* En este caso, se utiliza una aplicación directa de secciones frescas de tejido en una membrana para visualizar *in situ* la distribución en los tejidos de los microorganismos. El procedimiento es rápido, sensible y simple (no utiliza extracción de ácidos nucleicos), es económico porque no requiere de equipo especializado, además es apropiado para evaluar un alto número de muestras por día. Esta técnica permite estudiar aspectos relacionados con la localización de los microorganismos de interés en los tejidos de las plantas (Webster *et al.*, 2004).

Las hibridaciones son reveladas mediante el marcaje de la prueba con un isótopo radioactivo ( $P^{32}$ ) o un reportero no radioactivo como biotina, acetilaminofluorene (AAF), fluorovitosina o digoxigenina (Astier *et al.*, 2007).

### **2.5.2. Técnicas basadas en PCR**

Se fundamentan en la amplificación exponencial de una secuencia de ácidos nucleicos que es flanqueada por un par de cebadores, los cuales son usados por una *polimerasa* termoestable de ADN para la formación de las nuevas cadenas. La técnica consta de múltiples ciclos (usualmente 35 a 40) en los cuales hay desnaturalización de ADN de doble cadena, anillamiento de los cebadores (oligonucleótidos de 16 a 35 bases), extensión (polimerización) y nuevamente desnaturalización. Esto permite la detección precisa de una región del genoma específica y su posterior secuenciación para caracterizarla con exactitud (Oren y Papke, 2010).

Los métodos basados en PCR permiten una mayor sensibilidad que las pruebas mencionadas anteriormente, debido a que una pequeña secuencia es amplificada millones de veces, posibilitándose su visualización como bandas a través de electroforesis en geles (Shcherbakova, 2007). Entre las diferentes variaciones que tiene esta técnica se incluyen:

*PCR anidada*: se fundamenta en el empleo de dos pares de cebadores, los externos que dan origen a un fragmento que sirve de molde para el segundo par (internos), generando amplicones altamente específicos (Webster *et al.*, 2004; Shcherbakova, 2007).

*PCR-RFLP*: En esta técnica se hace uso en conjunto de la metodología RFLP y PCR, para estudiar las diferencias entre los microorganismos con base en la ausencia/presencia de sitios de restricción en la secuencia de sus genomas. Luego de la amplificación por PCR, los fragmentos obtenidos son digeridos con una enzima de restricción y se analiza el patrón de bandas mediante electroforesis. Es un método que permite diferenciar aislamientos sin los costos que consumen la clonación y la secuenciación (Webster *et al.*, 2004).

*PCR múltiple*: Múltiples especies o razas pueden ser detectadas en una sola reacción de PCR, que combina cebadores específicos para los diferentes microorganismos. La técnica requiere que los productos de la amplificación posean tamaños diferentes para cada especie y que entre los cebadores no haya reacciones cruzadas (Webster *et al.*, 2004).

*PCR-Inmunocaptura (IC-PCR)*: Esta metodología combina el reconocimiento del microorganismo de interés con el uso de anticuerpos específicos y la amplificación por PCR. La reacción antígeno-anticuerpo, constituye la primera fase, en la cual se reduce el riesgo de contaminación con inhibidores presentes en los tejidos o sustratos, al obtenerse el microorganismo fijado a las placas de poliestireno. Luego, en condiciones alcalinas y en presencia de un detergente se libera el ARN ó ADN genómico para ser amplificado posteriormente mediante RT-PCR o PCR convencional (Webster *et al.*, 2004; Shcherbakova, 2007; Álvarez, 2010).

### **2.5.3. PCR en tiempo real**

Esta metodología permite monitorear la acumulación en tiempo real de los productos de PCR para cada ciclo durante toda la reacción. La técnica no requiere correr las muestras en gel de electroforesis ya que la información requerida se obtiene en las gráficas del monitoreo de la reacción. Es más rápida, específica y sensible que una PCR convencional, además de ser un método cuantitativo al suministrar información de la cantidad de producto amplificado, previa generación de una curva de calibración (Shcherbakova, 2007).

El equipo para este procedimiento posee instrumentación para la medición de la fluorescencia generada por la liberación de fluorocromos liberados o incorporados en los diferentes ciclos de la reacción. Se pueden emplear colorantes como SYBRgreen®, que es un compuesto que se intercala en el ADN de doble cadena y es la forma de detección más simple de la técnica; aunque tiene como desventaja el hecho que el colorante se puede intercalar en amplicones inespecíficos generados durante la reacción (Shcherbakova, 2007).

Otra metodología que evita los problemas de detección inespecífica, consiste en el uso de sondas Taqman® (25-30 nt), las cuales se unen al interior de la secuencia demarcada por los cebadores. Posee un marcaje en su extremo 5' de un derivado de Fluoresceína (generalmente 6-FAM) y en el extremo 3' un compuesto que absorbe la fluorescencia del primero, denominado atenuador (*quencher*) (generalmente TAMRA). La detección se da cuando la sonda hibridiza en la secuencia de interés (al igual que los cebadores específicos) y al comenzar la extensión, la acción 5'-3' *exonucleasa* de la *polimerasa* degrada la sonda, liberando el fluorocromo que se encuentra hacia el extremo 5', siendo posible su detección por parte del equipo. Otros formatos de la técnica incluyen las denominadas sondas Scorpion™ ó *Molecular Beacons*, en los cuales las sondas forman estructuras plegadas en forma de asa, que una vez se eleva la temperatura en la reacción son separadas, produciéndose la fluorescencia y por tanto la detección respectiva (Shcherbakova, 2007; Álvarez, 2010).

## 2.6. REFERENCIAS

ADC Commercialization Bulletins. 2000. Vanilla. Agribusiness Development Centre of the USAID-funded Uganda's Investment in Developing Export Agriculture (IDEA) Project. [www.foodnet.cgiar.org](http://www.foodnet.cgiar.org) Kampala, Uganda. 11p.

Ahmad J.S. and Baker R. 1987. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 358-362.

Albino U. B. and Andrade G. 2006. Evaluation of the functional group of microorganisms as bioindicators on the rhizosphere microcosm, 29-46 pp. *En*: M.K. Rai Ed. Handbook of Microbial Biofertilizers. The Haworth press, N.Y.

Álvarez R.J.A. 2010. Caracterización serológica y molecular de virus asociados al material de siembra de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Bosh) en Colombia. Tesis de Maestría en Ciencias - Microbiología. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

Anandaraj M., Rema J., Sasikumar B., and Suseela-Bhai R. 2005. Vanilla (Extension pamphlet). Indian Institute of Spices Research. Calicut, Kerala, India, 11 p.

Anilkumar A.S. 2004. Vanilla cultivation: A profitable agri-based enterprise, 26-29 pp. *En: Kerala calling*. February.

Arango D.A., Osorio M.A.I., Diez G.M.C. Moreno H.F. 2011. Actividades previas al establecimiento del cultivo de vainilla, 24-44 pp. *En: Moreno F. y Díez M.C. (Eds.). Cultivo de vainilla. Contribuciones para el desarrollo de su cadena productiva en Colombia*. Medellín, Colombia.

Aro N., Pakula T. and Penttilä B. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi, *FEMS Microbiology Reviews* 29: 719-739.

Astier S., Albouy J., Maury Y., Robaglia C., and Lecoq H. 2007. Principles of plant virology. Genome, pathogenicity, virus ecology. Science Publishers, Enfield, NH, USA.

Augstburger F., Berger J., Censkowsky U., Heid P. Milz J., and Streit C. 2000. Agricultura orgánica en Trópico y Subtrópico. Vainilla. Naturland 1ª Ed. Alemania. 18 p.

Baldani J., Caruso L., Baldani V.L.D., Goi S.R., and Dôbereiner J. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol Biochem* 29(5-6): 911-922.

Barber S.A. 1995. Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach. New York, Wiley, 414p.

Barea J.M., Azcón-Aguilar C., and Azcón R., 1997. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems, 65–77 pp. *En: Gange, A.C., Brown, V.K. (Eds.), Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*. Blackwell Science, Cambridge, UK.

Barea J.M., Pozo M.J., Azcón R., and Azcón-Aguilar C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot* 56(417): 1761-1778.

Bashan Y. and de-Bashan L.E. 2010. Chapter two - How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—A critical assessment. *Adv Agron* 108: 77-136.

Bashan Y. and Holguin G. 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol Biochem* 30: 1225-1228.

Bastias B., Anderson I., Rangel-Castro I., Parkin P., Prosser J., and Cairney W. 2009. Influence of repeated prescribed burning on incorporation of  $^{13}\text{C}$  from cellulose by forest soil fungi as determined by RNA stable isotope probing, *Soil Biol Biochem* 41(3): 467-472.

Beneduzi A. and Passaglia L.M.P. 2011. Genetic and Phenotypic Diversity of Plant Growth Promoting Bacilli, 1-20 pp. *En: Maheshwari D.K. (Ed.). Bacteria in Agrobiolology: Plant Growth Responses.* Springer, NY.

Bernal P.L. 2009. Aislamiento de microorganismos solubilizadores de P (PSM) de las raices de *Vanilla* sp. *En: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis400.pdf>*

Berninger F. and Salas E. 2003. Biomass dynamics of *Eritrina lanceolata* as influenced by shoot-pruning intensity in Costa Rica. *Agroforestry Systems* 57:19-28.

Boddey R.M., Bruno J.R., Alves B.J.R., Reis V.M., and Urquiaga S. 2006. Biological nitrogen fixation in agroecosystems and in plant roots, 178-186 pp. *En: Uphoff N. et al. (Eds.) Biological approaches to sustainable soil systems.* CRC Press. Boca Raton, FL.

Bory S., Lubinsky P., Risterucci A-M., Noyer J.L., Grisoni M., Duval M.-F., and Besse, P. 2008. Patterns of introduction and diversification of *Vanilla planifolia* (Orchidaceae) in Reunion Island (Indian Ocean). *Am J Bot* 95: 805-815.

Bowen G.D. and Rovira A.D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv Agron* 66: 1-102.

- Bowman B.T., Tailor J.W., Brownlee A.G., Lee J., Lu S-D., and White T.J. 1992. Molecular evolution of the fungi: Relationship of the Basidiomycetes, Ascomycetes, and Chytridiomycetes. *Mol Biol Evol* 9: 285-296.
- Brownell Jr. R.J. 2011. Fair trade – The future of Vanilla?, 107-116 pp. *En: Havkin-Frenkel D. and Belanger F.C. (Eds.). Handbook of Vanilla Science and Technology, First Edition, Blackwell Publishing Ltd.*
- Burgeff H. 1959. Mycorrhiza of orchids. Withner C. (Ed.). *The orchids: A scientific survey. The Roland Press, New York, pp. 361–395.*
- Cameron K.M. 2011. Vanilla phylogeny and Classification. *Handbook of Vanilla Science and Technology, First Edition, Havkin-Frenkel D. and Belanger F.C. (Eds.). Blackwell Publishing Ltd. 243-255 pp.*
- Castillo R.F. 2005. *Biotecnología ambiental. Ed Tébar. Madrid, España. 616 p.*
- Castro B.G. 2008. Evaluación del cultivo y producción de vainilla en la zona de Papantla, Veracruz, México. Tesis PhD. *Ecología y Manejo de Recursos Naturales. Instituto de Ecología, A. C. 93p.*
- Castro-Bobadilla G., and García-Franco J.G. 2007. Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) crop systems used in the Totonacapan area of Veracruz, Mexico: Biological and productivity evaluation. *J Food Agric Environ* 5(2): 136-147.
- Damirón V. R. 2004. *La vainilla y su cultivo. Dirección General de Agricultura y Fitosanitaria del estado de Veracruz. 50 p.*
- Denny T.P. and Hayward A.C. 2001. *Ralstonia*, 151–166 pp. *En: Laboratory guide for identification of Plant pathogenic bacteria. Third ed.*
- Dias A., Freitas G., Marques G., Sampaio A., Fraga I., Rodrigues M., Evtuguin D., and Bezerra R. 2010. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Biores technol* 101(15).



Díaz G., Sánchez de Prager M., Gómez E. y Mier C. 2000. Endomicorrizas y metabolitos secundarios en Orquidáceas de hábitats terrestres. *Fitopatología Colombiana* 24: 5-9.

Dôbereiner J. 1992. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis* 13: 1–13.

Edel V. 1998. Used of PCR and RFLP in fungal sistematics, 51-75 pp. *En: Frisvand, J., Bring, P. and Arora (Eds.). Chemical fungal taxonomy. Marcel Dekker. Inc.*

Ehlers D. and Pfister M. 1997. Compounds of vanillons (*Vanilla pompona* Schiede). *J Essent Oil Res* 9: 427-431.

Elphinstone J.G., Hennessy J., Wilson J.K., and Stead D.E. 1996. Sensitivity of detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin.*, 26: 663–678.

Exley R. 2011. Vanilla production in Australia. 69-78 pp. *En: Havkin-Frenkel D.K. and Belanger F.C. (Ed.). Handbook of Vanilla, Science and Technology, First Edition, Blackwell Publishing Ltd.*

Flores-Mireles A.L., Winans S.C., and Holguin G. 2007. Molecular characterization of diazotrophic and denitrifying bacteria associated with mangrove roots. *Appl Environ Microbiol* 73(22): 7308–7321.

Foth H.D. and Ellis B.G. 1996. *Soil Fertility.* Lewis Publishers, New York, 290 p.

Fouché J.G. and Jouve L. 1999. *Vanilla planifolia: history, botany and culture in Reunion Island.* *Agronomie* 19: 689-703.

Gargova S., Roshkova Z., and Vancheva G. 1997. Screening of fungi for phytase production. *Biotechnol Tech* 11: 221–224.

Gentili F. and Jumpponen A. 2006. Potential and possible uses of bacterial and fungal biofertilizers, 1-18 pp. *En: Rai M.K. (Ed.). Handbook of Microbial Biofertilizers. The Haworth press N.Y.*

- Göker M., Voglmaryr H., Riethmuller A., Weib M., and Oberwinkler F. 2003. Taxonomic aspects of Peronosporaceae inferred from Bayesian molecular phylogenetics. *Can J Bot* 81: 672-683.
- Govaerts R., Campacci M.A, and Holland B.D. 2006. World checklist of Orchidaceae. [www.kew.org/wcsp/monocots/](http://www.kew.org/wcsp/monocots/)
- Graham P.H. 1999. Symbiotic nitrogen fixation, 325-347 pp. *En: Sylvia D. et al. (Eds.). Principles and applications of soil microbiology.* Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Gruhn P., Goletti F., and Yudelman M. 2000. Integrated nutrient management, soil fertility and sustainable agriculture: current issues and future challenges. Food, Agriculture and environment discussion paper 32. International Food Policy Research Institute, Washington D.C.
- Hagsater E., Soto-Arenas M.A., Salazar-Chávez G.A., Jiménez-Machorro R., López-Rosas M.A. and Dressler R.L. 2005. Las orquídeas de México: Orquídeas y gente. Instituto Chinoin, México D.F. pp.38-71
- Han Y., Joosten H-J., Niu W., Zhao Z., Mariano P.S. McCalman M., Kan J.V., Schaap P.J., and Dunaway-Mariano D. 2007. Oxaloacetate hydrolase, the C-C bond lyase of oxalate secreting fungi. *J Biol Chem* 282(13): 9581-9590.
- Havkin-Frenkel D., Dorn R., 1997. *Vanilla*, 29-40 pp. *En: Risch, S. J., Ho, C.-T. (Eds.), Spices, flavor chemistry and antioxidant properties.* American Chemical Society, Washington DC.
- Havlin J., Beaton J., Tisdale S.L., and Nelson W. 1999. Soil Fertility and Fertilizers. An Introduction to Nutrient Management. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
- Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. and Pegler D.N. 1995. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 8<sup>th</sup> ed. Int. Mycol. Inst., CAB Int., Egham, UK, 616p.
- Hayat R., Ali S., Amara U., Khalid R., and Ahmed I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60(4): 579-598.

- He X.H. 2007. Biocontrol of root rot disease in *Vanilla*. Thesis Ph.D. University of Wolverhampton.
- Hernández H.J., and Lubinsky P. 2010. Cultivation Systems, 75-95 pp. *En: Vanilla*. Ed. Eric Odoux and Michel Grisoni (Eds.). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hernández H.J. 2011. Production of vanilla - Agricultural systems and curing, 1-25 pp. *En: Havkin-Frenkel D.K. and Belanger F.C. (Ed.). Handbook of Vanilla Science and Technology*, First Edition, Blackwell Publishing Ltd.
- Hillis D., Moritz C., and Mable B. 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Associate, Inc. Massachusetts, 655p.
- Hoffland E., Kuyper T.W., Wallander H., and Haselwandter K. 2004. The role of fungi in weathering. *Front Ecol Environ* 2(5): 258-264.
- Hofmockel K.S., Fierer N., Colman B.J., and Jackson R.B. 2010. Amino acid abundance and proteolytic potential in North American soils. *Oecol* 163(4): 1069-1078.
- Idriss E. E., Makarewicz O., Farouk A., Rosner K., Greiner R., Bochow H., Richter T., and Borriss R. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology* 148: 2097-2109.
- Javed M.M., Ahmed W., Zahoor S., and Ul-Haq I. 2010. Solid state culturing of thermophilic fungi for phytase production. *Pak J Bot* 42(5): 3605-3611.
- Johansson J.F., Paul L.R., and Finlay R.D. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *Microb Ecol* 48 (1): 1-13.
- Kapulnik Y. 2002. Plant growth promoting by rhizosphere bacteria. *Plant roots the hidden half*. Ed Marcel Dekker. N.Y. USA. 869-887 p.
- Kerovuo J., Lauraeus M., Nurminen P., Kalkinen N., and Apajalahti J. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 64: 2079–2085.

Khalid M., Yang W.J., Kishwar N., Rajput Z.I., and Arijo A.G. 2006. Study of cellulolytic soil fungi and two nova species and new medium. *J Zhejiang Univ Sci B* 7(6): 459–466.

Kloepper J.W. 1983. Effect of seed piece inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on populations of *Erwinia carotovora* on potato roots and in daughter tubers. *Phytopathology* 73: 217-219.

Kloepper J.W., and Schroth M.N. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *Proc. 4th Int. Conf. Plant. Path. Bact. Angers.* 879-882.

Kloepper J.W., Zablotowicz R.M., Tipping E.M., and Lifshitz R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers, 315-326 p. *En: Keister D.L and Cregan P.B. (Eds). The rhizosphere and plant growth. The Netherlands.*

Kloos K., Husgen U., and Bothe H. 1998. DNA-probing for genes coding for denitrification, N<sub>2</sub>-fixation and nitrification in bacteria isolated from different soils. *Z Naturforsch* 53:69-81

Konietzny U., and Greiner R. 2002. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int J Food Sci Tech* 37: 791–81

Konietzny U., and Greiner R. 2004. Bacterial phytase: potential application, *in vivo* function and regulation of its synthesis. *Braz J Microbiol* 35: 1-2.

Kubicek C.P., Schrefel-Kunar G., Wohrer W., and Rohr M. 1988. Evidence for a cytoplasmic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microb* 54(3): 633-637.

Ladd J.N., Butler J.H.A. 1972. Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biol Biochem* 4:19-30

Loll M.J., Bollag J.M. 1983. Protein transformation in soil. *Adv Agron* 36:351-382.

Lubinsky P., Romero-González G.A., Heredia S.M., and Zabel S. 2011. Origins and patterns of vanilla cultivation in Tropical America (1500-1900): No support for an

independent domestication of vanilla in South America, 117-138 pp. *En*: Havkin-Frenkel D.K. and Belanger F.C. (Ed.). Handbook of *Vanilla* Science and Technology, First Edition, Blackwell Publishing Ltd.

Lymar E.S., Li B., and Renganathan V. 1995. Purification and characterization of a cellulose-binding  $\beta$ -glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microb* 61(8): 2976-2980.

Lynd. L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., and Pretorius I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol R* 66(3): 506-577.

Matsumoto L.S., Martines A.M., Avanzi M.A., Albino U.B., Brasil C.B., Saridakis D.P., Rampazo L.G.L., Zangaro W., and Andrade G. 2005. Interactions among functional groups in the cycling of, carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. *Appl Soil Ecol* 28(1): 57-65.

McGregor A. 2005. Diversification into high-value export products: case study of the Papua New Guinea vanilla industry. Agriculture Management, marketing and finance service (AGFS) working document 2. Agriculture Support System Division. FAO. Rome. 49 p.

Mehta S., and Nautiyal S. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Curr Microbiol* 51-56

Meyer O. 1994. Functional groups of microorganisms, 67-93 pp. *En*: E.-D. Schulze and H.A. Mooney (eds.). Biodiversity and ecosystem function. Springer, New York.

Mino D., Babu K.N. and Grisoni M. 2010. Biotechnological Applications in Vanilla, 51-73 pp. *En*: Vanilla. Ed. Eric Odoux and Michel Grisoni. CRC Press, Boca Raton, FL.

Moliner-Hurtado F.H., Flanagan N., González R.T., Soto-Arenas M.A. y Otero J.T. 2011. Caracterización de diversidad de vainilla del Pacífico Colombiano, 30 pp. *En*: Resúmenes VI Congreso Colombiano de Botánica. Biodiversidad, Desarrollo y Cultura: una visión integradora. Cali Colombia.

Mosquera-Espinosa A.T., Bayman P., Otero J.T. 2010. *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agron* 59(3-7): 316-326.

Mrkonjic F.M, Engel M., Hagn A., Munch J.C., Sommer M., and Schloter M. 2009. Changes of diversity pattern of proteolytic bacteria over time and space in an agricultural soil. *Microb Ecol* 57:391-401.

Myrold D. 2004. Transformations of nitrogen, 333-372 pp. *En: Sylvania, D., Hartel, P., Fuhrmann, J. and Zuberer, D. Principles and Applications of Soil Microbiology, Prentice Hall, New Jersey, USA.*

Naik G., Saifulla B., Devappa M., Ravindra V., Karigowda C.H., and Krishna R. 2009. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*, the casual agent of stem rot of Vanilla *in vitro*, 133 pp. *En: S. Desai, M.S. Reddy, V. Krishna Rao, Y.R. Sarma, B. Chenchu Reddy, K.R.K. Reddy (Eds.) Abstracts of the First Asian PGPR Congress for Sustainable Agriculture. Hyderabad, ANGRAU.*

Henrik N., Martin U., and Wolfgang M. 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl Microbiol Biot* 87: 99-108.

Oren A. and Papke. T. 2010. *Molecular Phylogeny of Microorganisms*. Essex, UK: Caister Academic Press. 220 p.

Ortiz P., Aguirre G., Arango A., Arango C., Bock I. 1994. *Native Colombian Orchids*. Sociedad Colombiana de Orquideología. Editorial Colina. Medellín Colombia. vol. 1. 53 p.

Osorio N.W. 2007. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Rev Fac Nac Agron* 60(1): 3621-3643

Osorio N.W. 2011. Effectiveness of Phosphate Solubilizing Microorganisms in Increasing Plant Phosphate Uptake and Growth in Tropical Soils, 65-80 pp. *En: Maheshwari D.K. (Ed). Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management (Volume III). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 345p.*

- Osorio N.W. 2012. Manejo de Nutrientes en Suelos del Trópico. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 339 p. (en prensa).
- Osorio N.W. and Habte M. 2001. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and P solubilizing fungus on growth and plant P uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Res. Mgmt.* 15:263-274.
- Otero T., Ackerman J. y Bayman P. 2004. Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Mol Ecol* 10:207 – 212.
- Otero J.T. y Bayman P. 2009. Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. *Acta Agron* 58(4):270-276.
- Padilla-Vega J. 2009. Caracterización nutricional de *Vanilla planifolia* en época de floración bajo un sistema agroforestal y acahual mejorado en la zona de amortiguamiento de la Selva Lacandona, Chiapas. *En: Memorias del VII Congreso nacional sobre áreas naturales protegidas de Mexico.* [www.congresoanps.gob.mx](http://www.congresoanps.gob.mx).
- Pal K., Bhatt D., and Chauchan S. 2000. Plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* enhanced peanut growth, yield and nutrient uptake. National research center for groundt. Gujarat, India. No.5.
- Patel K.J. and Archana G. 2009. Phytate mineralization by native soil flora and diversity of phytate mineralizing rhizobacteria and their application for plant growth promotion. *En: Abstracts of the First Asian PGPR Congress for Sustainable Agriculture.* S.Desai, M.S.Reddy, V.Krishna Rao, Y.R.Sarma, B.Chenchu Reddy, K.R.K. Reddy (Eds.) Hyderabad, ANGRAU. 133 p.
- Paul E.A. and Clark F.E. 1996. Ammonification and Nitrification, 182-183 pp. *En: Paul E.A., Clark F.E. (eds.). Soil microbiology and biochemistry.* Academic, San Diego.
- Picard C., Ponsonnet C., Paget E., Nesme X., and Simonet P. 1992. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58: 2717–2722.

- Ping L. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Plant Sci* 9(8): 263-266.
- Ploetz R.C. 2006. Fusarium-induced diseases of tropical perennial crops. *Phytopathology* 96(6): 648-652.
- Porras-Alfaro A. and Bayman P. 2007. Mycorrhizal fungi of Vanilla: Diversity, specificity and effects on seed germination and plant growth. *Mycologia* 99(4): 510-525.
- Potty S.N. and Krishnakumar V. 2003. Agrotechniques. *En: Vanilla-the Prince of Spices*. Spices Board, Kochi.
- Pradhanang P.M., Elphinstone J.G., and Fox R.T.V. 2000. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. *Plant Pathol* 49: 414-422.
- Priou S., Gutarra L., and Aley P. 2006. An improved enrichment broth for the sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* (biovars 1 and 2A) in soil using DAS-ELISA. *Plant Pathol* 55: 36 – 45.
- Pühler A., Arlat M., Becker A., Gottfert M., Morrissey J.P., and O’Gara F. 2004. What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? *Curr Opin Plant Biol* 2: 137-147.
- Purseglove J.W., Brown E.G., Green C.L., and Robbins S.R.J. 1981. *Vanilla. Spices*, vol. II. Longman Scientific and Technical Publisher, England, pp. 644-735.
- Puthur T. J. y Krishnakumar V. K. 2006. *Journal of plantations crops*. 34 (2): 90-93  
Indian Society for Plantation Crops, Kasaragod - 670 124, Kerala, India
- Ramírez C. y Rapidel B. 1999. Principales factores agronómicos restrictivos en el cultivo de la vainilla en la zona de Quepos, Costa Rica. *Memorias XI Congreso Nacional Agronómico*. San Jose, C. R. 309-313 p.



Ranadive A.S. 2005. Vanilla cultivation. The proceedings of the First International Congress. Princeton, NJ., USA, November 11-12, 2003, 25-31.

Ranadive A.S. 2011. Quality control of vanilla beans and extracts,141-161. pp. *En*: Havkin-Frenkel D.K. and Belanger F.C. (Eds.). Handbook of *Vanilla* Science and Technology, First Edition, Blackwell Publishing Ltd.

Richardson A.E., and Hadobas P.A. 1997. Soil isolates of *Pseudomonas* spp.that utilize inositol phosphates. *Can J Microbiol* 43: 509–516.

Richardson A.E., Hadobas P.A., and Hayes J.E. 2001. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant J* 25: 641–649.

Sadanandan A.K. and Hamza S. 2006. Effect of organic farming on soil quality, nutrient uptake, yield and quality of Indian spice. *En*: Abstracts of 18<sup>th</sup> world congress of soil science, July 9-15, 2006, Philadelphia, USA.

Sánchez C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv* 27(2): 185-194.

Sarma Y.R., Thomas J., Sasikumar B., and Varadarasan S. 2010. Vanilla Production in India, 295-325 pp. *En*: Vanilla. Ed. Eric Odoux and Michel Grisoni. CRC Press, Boca Raton, FL.

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

Schonfeld J., Heuer H., Van Elsas J.D., and Smalla K. 2003. Specific and Sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Soil on the Basis of PCR Amplification of *fliC* Fragments. *Appl Environ Microbiol* 69: 7248–7256.

Senghas K. 2001. Die orchideen. Third edition. Vol I/C. fasc 44/45. Parey Buchverlag. Berlin. p. 2828.

Sharma S.K., Dandge V., Sharma M.P., Ramesh A., Joshi O.P. 2009. Isolation and assessment of zinc-solubilizing *Bacillus* isolates from Nimar region of Central India, 133 pp. *En*: S.Desai, M.S.Reddy, V.Krishna Rao, Y.R.Sarma,B.Chenchu Reddy, K.R.K. Reddy (Eds.) Abstracts of the First Asian PGPR Congress for Sustainable Agriculture. Hyderabad, Angrau.

Shcherbakova L.A. 2007. Advanced methods of plant pathogen diagnostics, 483 pp. *En*: Dyakov Y.T., Dzhavakhiya V.G., Korpela T. (Eds.). Comprehensive and molecular phytopathology. Elsevier B. V.

Soto-Arenas M.A., 2003. Vanilla, pp. 321-334. *En*: Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W., Rasmussen, F. N. (Eds.). Genera Orchidacearum, vol. 3. Oxford University Press, USA,

Spices Board. 2000. Vanilla status paper. Spices board, Cochin, India. pp 33.

Sreedhar R.V., Roohie K., Venkatachalam L., Narayan M.S., and Bhagyalakshmi N. 2007. Specific Pretreatments Reduce Curing Period of Vanilla (*Vanilla planifolia*) Beans. *J Agric Food Chem* 55: 2947-2955.

Steenkamp E. 2000. Molecular taxonomic studies of selected species in the *Gibberella fujifuroi* complex. Trabajo de grado PhD. Pathopatology. Department of Microbiology and lant pathology, University of Pretoria. 160 p.

Styger E. Rakotoarimanana R. Rabevohitra R. y Fernández E.C.M. 1999. Indigenous fruit trees of Madagascar: potencial components of agroforestry systems to improve nutrition and restore biological diversity. *Agroforest syst* 46: 289-310.

Sujatha S. and Bath R. 2010. Response of vanilla (*Vanilla planifolia* A.) intercropped in arecanut to irrigation and nutrition in humid tropics of India. *Agr Water Manage* 97(7): 988-994.

Surendra G.K., Mathew S.K., and Nazeem P.A. 2009. Development of plant growth promoting microorganisms consortia technology for *ex vitro* establishment of micropropagated vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Kerala State Council for Science, Technology and Environment. Sasthra Bhavan, Pattom. Thiruvananthapuram 695004 Kerala, INDIA. <http://www.kauhort.in>

Suseela B.R. and Kumar A. 2008. Effect of rhizobacteria on *Phytophthora meadii*, *Fusarium oxysporum* F. sp. *vanillae* and *Colleotrichum vanillae* infecting vanilla. J Biol Control 22(1): 33-41.

Suseela B.R., Remya B. and Jithya D. 2009. *In vitro* and in plant assays for biological control of *Fusarium* root rot disease of vanilla. J Biol Control 23(1): 83-86.

Sylvia D.M., Fuhrmann J.J., Hartel P.G., and Zuberer D.A. 1999. Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall, New Jersey. 550 p.

Torres M.V. y Lizarazo L.M. 2006. Evaluación de grupos funcionales (ciclo del C, N, P) y actividad de la fosfatasa ácida en dos suelos agrícolas del departamento de Boyacá (Colombia). Agronomía Colombiana 24(2): 317-325.

Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Botina S.G., and Netrusov A.I. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. Microbiol Res 162(1): 69-76.

Unno Y., Okubo K., Wasaki J., Shinano T., and Osaki M. 2005. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of *Lupin* analysed by phytate utilization ability. Environ Microbiol 7(3): 396-404.

Van Der Wolf J.M., Bonants P.J.M., Smith J.J., Hagenaar M., Nijhuis E., Van Beckhoven J.R.C.M., Saddler G.S., Trigalet A., and Feuillade R. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in Western Europe determined by AFLP, RC – PFGE and Rep – PCR, 44-49pp. *En: Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects.*

Varela Q.E. 2011. Vanilla production in Costa Rica, 40-49 pp. *En*: Havkin-Frenkel D.K. and Belanger F.C. (Eds.). Handbook of *Vanilla* Science and Technology, First Edition, Blackwell Publishing Ltd.

Vessey J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571–586.

Vilgalys R. 2004. Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. Disponible en: <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>. (Consultada en Septiembre 10 de 2004).

Wall L. 2001. Consequences of an overview on PGPR work in Argentina: the field should be wider. Programa de investigación en interacciones biológicas. Universidad Nacional de Quilmes, Argentina.

Webster C.G., Wylie S.J., and Jones M.G. 2004. Diagnosis of plant viral pathogens. *Curr Sci* 86: 1604-1607.

Weising K., Nybom H., Wolff K., and Meyer W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press. Boca Raton, Florida. USA.

Wilkinson K.G., Sivasithamparam K., Dixon K.W., Fahy P.C., and Bradley J.K. 1994. Identification and characterisation of bacteria associated with Western Australian orchids. *Soil Biol Biochem* 26(1): 137-142.

Zaubin R. and Wahid P. 1995. Environmental conditions for Vanilla. Proceedings of the Agronomic Status and Post Harvest in Lampung, 47-58 *En*: Indonesian, english abstract. Bandar, Lampung. Research Institute for Spices and Medicinal Crops.

Zaubin R., Tombe M., and Liew E.C.Y. 2010. Vanilla production in Indonesia, 283-293 pp. *En*: E. Odoux and M. Grisoni (Eds.). *Vanilla*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Zhang Y., Himmel M., and Mielenz J. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol Adv* 24: 452-481.

Zheng L., Zheng P., Sun Z., Bai, Y., Wang J., and Guo X. 2007. Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresource Technol* 98(5): 1115-1119.

Zhuang X., Chen J., Shim H., and Bai Z. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment int* 33: 406-413.

Zuberer D.A. 1999. Biological dinitrogen fixation: introduction and non-symbiotic, 295-321 pp. *En: Sylvia D., Fuhrmann J., Hartel P. and Zuberer D., (Eds.). Principles and applications of soil microbiology. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.*

Zuluaga C., Buriticá P. y Marín M. 2009. Generalidades de los Uredinales (Fungi: Basidiomycota) y de sus relaciones filogenéticas. *Acta Biol Colomb* 14: 41-56.

Zuluaga C., Buriticá P. y Marín M. 2011. Filogenia de hongos roya (Uredinales) en la zona andina colombiana utilizando secuencias del ADN ribosomal 28S. *Int J Trop Biol* 59: 1-24.

## **RESULTADOS**

## CAPITULO 3

### IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE VAINILLA<sup>1</sup>

#### RESUMEN

El cultivo de vainilla es altamente promisorio en Colombia, pero poco se conoce acerca de su manejo agronómico y mucho menos de los microorganismos que crecen asociados a su rizosfera, de los cuales depende para su nutrición y crecimiento. En este trabajo se realizaron aislamientos de microorganismos de la rizosfera de plantas de vainilla en un cultivo piloto ubicado en el municipio de Sopetrán (Antioquia, Colombia). Los microorganismos se aislaron en medios selectivos de crecimiento para evaluar su capacidad para descomponer celulosa, proteínas, solubilizar fosfato inorgánico y orgánico (fitato) y fijar nitrógeno en forma asimbiótica. Una vez aislados y purificados, a los microorganismos se les realizó extracción de ADN para su posterior identificación molecular. Se obtuvieron un total de 109 aislamientos de los cuales 52 se caracterizaron por secuenciación de las regiones ITS y 16S del ADNr para hongos y bacterias, respectivamente. Se resalta la alta riqueza y variedad de microorganismos hallados en estos ambientes, algunos de los cuales tienen potencial para su utilización como biofertilizantes destinados a mejorar la nutrición y el crecimiento de las plantas de vainilla.

**Palabras clave:** *Vanilla planifolia*, PGPR, celulolíticos, proteolíticos, solubilizadores de fosfato, fijadores asimbióticos de nitrógeno.

---

<sup>1</sup> Apartes de este capítulo fueron presentados en el XV Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo. Pereira, Octubre 2011.

## ABSTRACT

The cultivation of vanilla (*Vanilla planifolia*) is highly promising in Colombia, but little is known about its agronomical management. Even less is known about the beneficial microorganisms that grow associated to its rhizosphere, on which the plant depends for its nutrition and growth. This study involved the identification of microorganisms associated to the rhizosphere of vanilla plants in a crop located in Sopetrán, Colombia. The microbes were isolated in selective media for functional groups such as cellulolytic, proteolytic, organic and inorganic phosphate solubilizers, and asymbiotic nitrogen fixing bacteria. After isolation and purification, DNA was extracted from 52 microbial isolates in order to proceed with molecular identification based on ITS and 16S rDNA sequencing, for fungi and bacteria, respectively. The abundance and diversity of rhizosphere microorganisms found was significant; furthermore, some of the microorganisms showed high potential to be used as biofertilizers that could serve to improve the nutrition and growth of vanilla plants.

**Keywords:** celullolytic, proteolytic, phosphate solubilizing microorganisms, asymbiotic nitrogen fixation

## INTRODUCCIÓN

La vainilla es la segunda especia de mayor valor a nivel mundial después del azafrán y es el saborizante más utilizado en la industria alimenticia (Spices Board, 2000). Es un cultivo promisorio en diferentes regiones de Colombia, que presentan condiciones agroecológicas apropiadas para su crecimiento y desarrollo; sin embargo, su extensión en el país es muy pequeña (72 ha) y los rendimientos que se obtienen son bajos, aproximadamente un 50% menos, comparados con otros países como Madagascar, México o Reunión (Ledezma *et al.*, 2006) donde la producción promedio es de 1.2 kg de vainas verdes por planta al año. Esto se debe, entre otros aspectos, al desconocimiento que se tienen en Colombia del manejo agronómico del cultivo, de sus problemas fitosanitarios, sus necesidades fisiológicas y de sus requerimientos nutricionales (Damirón, 2004; McGregor, 2005; Moreno y Díez, 2011).



La nutrición de la vainilla es uno de los aspectos más críticos para la producción comercial de estas plantas, debido a que está estrechamente ligada con un mejor desarrollo vegetativo de la planta, lo que conlleva a una mayor floración y, por ende, al aumento en la producción de vainas. Se ha asociado la obtención de plantas de vainilla más vigorosas y con un incremento en su floración y fructificación, como respuesta a una mejor nutrición (Castro, 2008). La información al respecto es limitada pero se sabe que iniciando el cultivo con aportes de materia orgánica vegetal en descomposición, y realizando podas en periodos de seis meses antes de la floración, se puede lograr el vigor deseado en las plantas (Damirón, 2004; McGregor, 2005). Adicionalmente, si se mantiene un riego constante, sobre todo en épocas secas y de floración, se alcanza una mejor producción (Castro y García, 2007). Se desconocen los niveles óptimos de nutrientes requeridos por la planta de vainilla, por lo que en la práctica son inferidos de especies hortícolas de otros miembros de la familia Orchidaceae (Hernández y Lubinsky, 2010).

En investigaciones recientes, Osorio *et al.* (2011) reportaron la combinación de 75% de material orgánico leñoso o fibra de coco, 25% de hojarasca y 7 g por planta del fertilizante 27-11-11 como la mejor combinación para mejorar el crecimiento y desarrollo de plantas de vainilla recién establecidas. En explotaciones comerciales de India, se realizan aplicaciones anuales por planta de 40 a 60 g de nitrógeno (N), 20 a 30 g de fósforo ( $P_2O_5$ ) y 60 a 100 g de potasio ( $K_2O$ ) al suelo, así como aplicaciones foliares del fertilizante 17-17-17 una vez por mes, para estimular el crecimiento y floración (Anilkumar, 2004; Anandaraj *et al.*, 2005).

En investigaciones más recientes en ese mismo país, se ha concluido que la adición de enmiendas orgánicas (vermicompost, estiércol de granja o podas de matarratón) en combinación con riego, generaron un mejor beneficio económico que la adición de fertilizantes químicos (Sujatha y Bath, 2010). En Uganda se hacen mezclas de 30% de suelo, 30% de estiércol y 40% de materiales gruesos como cáscara de café, arena, trozos de corteza o carbón triturado para su uso como sustrato de este cultivo (ADC Commercialization Bulletin, 2000).

El sistema radicular de la vainilla es superficial, se localiza en los primeros 10 cm de la materia orgánica del suelo y se extiende en un radio de 1.20 m (Castro, 2008). Requiere un sustrato liviano, rico en materiales orgánicos y porosos, ya que no puede desarrollarse directamente sobre suelo de origen mineral (Fouché y Jouve, 1999; Damirón, 2004). Dados los hábitos de crecimiento de esta especie, se considera que los microorganismos rizosféricos juegan un papel importante en la descomposición de hojarasca y de los diversos sustratos utilizados para su establecimiento; en la disponibilidad y toma de nutrientes por parte de las plantas y en la promoción de su crecimiento (Ramírez y Rapidel, 1999; Kannaiyan, 2003; Ploetz, 2006; Castro, 2008).

Es ampliamente reconocida la dependencia micorrizal de la vainilla con hongos de la clase Basidiomycetes y específicamente con miembros de la forma-género *Rhizoctonia* (Ceratobasidiales, Exidiales, Tulasnellales) (Otero *et al.*, 2002; Valadares, 2009). Aparentemente, estos hongos juegan un papel fundamental para el desarrollo de las plantas gracias a que tienen la capacidad de hidrolizar carbohidratos insolubles en el suelo y transferirlos a las plantas en formas asimilables de carbono (Smith y Read, 1997). Recientemente, en investigaciones realizadas en cultivos y poblaciones nativas de vainilla en Colombia, Ordoñez (2012) encontró endófitos de *Rhizoctonia* sp. en estas plantas.

Muchos de los microorganismos de la rizosfera de las plantas forman un bio-componente integral de los suelos, afectando positivamente su fertilidad a través de los ciclos biogeoquímicos. Estos microorganismos se pueden clasificar por grupos funcionales, en bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, microorganismos solubilizadores de fosfato, microorganismos celulolíticos y amilolíticos, microorganismos proteolíticos- amonificantes y hongos micorrizales, entre otros (Sylvia *et al.*, 1999).

En el grupo de los fijadores de N<sub>2</sub> se encuentran bacterias que pueden estar asociadas o no con las raíces de las plantas, llegando inclusive a formar relaciones simbióticas, tal como ocurre con el grupo de los rizobios (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*) y diversos tipos de leguminosas (Graham, 1999; Barea *et al.*, 2005). El otro tipo de asociación (no simbiótica) ocurre entre diversos tipos de

bacterias y plantas no leguminosas de diferentes familias botánicas (Zuberer, 1999). Entre los géneros más representativos de este grupo se reportan *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Acetobacter* y *Clostridium*, entre otros. Estas bacterias pueden habitar en la rizosfera, rizoplano y el interior de los tejidos vegetales, sin llegar a formar estructuras especializadas (nódulos) (Döbereiner, 1992; Baldani *et al.*, 1997; Boddey *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2007; Bashan y de-Bashan, 2010).

Por otra parte, entre las bacterias con capacidad de producir *celulasas* se destacan *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Chromobacterium*, entre otras. Así mismo, se han reportado los hongos *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Phanerochaete* y *Paecilomyces*, como importantes componentes biológicos en los procesos de degradación de celulosa en la biosfera (Ahmad y Baker, 1987; Meyer, 1994; Khalid *et al.*, 2006).

En cuanto a los solubilizadores de fosfato, son numerosos los microorganismos de la rizosfera reportados con capacidad para disolver P insoluble (Henri *et al.*, 2008; Hameeda *et al.*, 2008), destacándose las especies bacteriales *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas fluorescens* (Illmer and Schinner, 1992; Aditya *et al.*, 2009) y los miembros de los géneros micóticos *Aspergillus* y *Penicillium* (Souchie *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2008). Adicionalmente, existen otros microorganismos que han presentado una alta actividad solubilizadora de P, como *Mortierella* (Osorio y Habte, 2001), *Fusarium*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Chryseobacterium*, *Gordonia*, *Phyllobacterium*, *Delftia* (Wani *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006), *Azotobacter* (Kumar *et al.*, 2001), *Xanthomonas*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Zaidi *et al.*, 2009).

Los solubilizadores de P que actúan sobre fuentes orgánicas incluyen un gran número de microorganismos que incluyen las bacterias *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Klebsiella* sp., *E. Coli*, *Enterobacter* sp., *Azospirillum* sp. y los hongos *Sporotrichum* sp., *Rhizomucor* sp. y *Aspergillus niger*, entre otros (Gargova *et al.*, 1997; Richardson y Hadobas, 1997; Kerovuo *et al.*, 1998; Zaidi *et al.*, 2009;

Richardson *et al.*, 2001; Idriss *et al.*, 2002; Konietzny y Greiner, 2002; Javed *et al.*, 2010).

Desafortunadamente, poco se conoce acerca de los microorganismos que habitan la rizosfera de la vainilla en nuestro medio, de las funciones específicas que ellos cumplen sobre los sustratos utilizados en los cultivos del país y de los mecanismos de interacción que existen entre los diferentes grupos. En el mundo es escasa la información disponible sobre las características de la microflora benéfica asociada a las plantas de vainilla en explotaciones comerciales. Sin embargo en algunos de los reportes disponibles se ha identificado a *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de P como biofertilizantes útiles para promover el crecimiento de estas plantas (Anilkumar, 2004). Así mismo, Surendra *et al.* (2009) desarrollaron un consorcio de PGPR's para la micropropagación *ex vitro* de plantas de vainilla, encontrando especies de *Azotobacter*, *Pseudomonas* fluorescentes y de diversas especies de *Bacillus* como las más eficientes.

La caracterización de microorganismos rizosféricos y su posterior selección por su capacidad de hacer más disponibles los nutrientes, movilizarlos hacia la planta o promover su crecimiento, pueden contribuir a un posterior desarrollo de biofertilizantes, conducentes a mejorar la nutrición de la vainilla. Con miras a lograr dicho objetivo, este estudio se planteó como un paso inicial tendiente a la identificación de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla de un cultivo piloto bajo cobertizos de techo-sombra del occidente Antioqueño. Para esto se evaluaron diferentes grupos funcionales (celulolíticos, proteolíticos, microorganismos solubilizadores de fosfato inorgánico y orgánico y bacterias fijadoras de nitrógeno asimbióticas) y se realizó su identificación molecular con base en la secuenciación de regiones ITS (hongos) y 16S (bacterias) del ADN ribosomal (ADNr).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Aislamiento de microorganismos**

Este estudio se realizó en los laboratorios de Ecología y Conservación Ambiental y de Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Muestras de la rizosfera de plantas de vainilla de un año de edad, con buen desarrollo,

sanas y sin síntomas visuales de deficiencias nutricionales se tomaron de diferentes lotes de un cultivo bajo cobertizos de techo-sombra, ubicado en el municipio de Sopetrán (Antioquia, Colombia). El sustrato en el que se establecieron las plantas correspondía a 85% de hojarasca, 15% de material leñoso y 5% de estiércol de cabras. Las muestras de raíces se cortaron con una tijera podadora previamente desinfectada con alcohol al 70%, se empacaron en bolsas plásticas con el sustrato y se conservaron en nevera a 4°C hasta su análisis posterior.

Para el aislamiento de los microorganismos, el material colectado se mezcló homogéneamente sobre papel craft y se tomaron al azar 10 g (base húmeda). Con esta muestra se prepararon diluciones seriales hasta  $10^{-8}$  en agua desionizada destilada estéril, en  $\text{CaCl}_2$  0.01 M y en agua peptonada al 1%. Posteriormente, se transfirieron 50  $\mu\text{L}$  a cajas de Petri que contenían medios selectivos para aislar microorganismos celulolíticos (CEL) (Wood, 1980), proteolíticos-amonificantes (PROT) (Wood modificado por Andrade, 2003), fijadores de  $\text{N}_2$  (FBN) (Döbereiner y Day, 1976) y solubilizadores de fosfato inorgánico (PSM) (Osorio y Habte, 2001) y orgánico (FIT) (Tabatabai, 1982) (Tabla 3.1). Todos los medios fueron incubados a 28°C por 72 h en condiciones de luz natural.

Las colonias microbiales que desarrollaron halos en los medios PSM, CEL, PROT y FIT, se seleccionaron para ser purificados en cajas de Petri con agar nutritivo (AN), para las bacterias y con extracto de malta (EM) y papa dextrosa agar (PDA) suplementado con 50 mg/mL de penicilina y de sulfato de estreptomicina, para los hongos. Luego se almacenaron a 4°C hasta su uso posterior. En los diferentes medios, los halos indican que la actividad deseada en un microorganismo se está expresando. Por ejemplo, degradación de celulosa y de proteína (caseína) en los medios CEL y PROT, producción de acidez en el medio PSM y de *fosfatasa* en FIT. Para el caso de las bacterias fijadoras de  $\text{N}_2$  el desarrollo de colonias en el medio libre de N ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  y aminoácidos) fue el indicador de la ocurrencia de dicha actividad.

## **Identificación molecular de los microorganismos**

### **Extracción de ácidos nucleicos**

Las bacterias obtenidas se sembraron en tubos de ensayo que contenían 5 mL de medio líquido Luria-Bertani (LB) por 24 h en agitación constante, para luego realizar el proceso de extracción de ADN mediante el método del SDS (Anexos 3.1 y 3.2.a). Los hongos, se sembraron en EM líquido y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 15 días para obtener abundante micelio (Anexo 3.2.a). Al cabo de este tiempo, se procedió a obtener el micelio mediante filtración con bomba de vacío y se maceró con nitrógeno líquido (Anexo 3.2.b) para luego extraer su ADN mediante el método del CTAB 3X (Anexo 3.3), o alternativamente utilizando el kit comercial *DNeasy plant mini* (Qiagen, Alemania). La integridad del ADN extraído fue determinada por electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 70 V durante 60 min, suplementado con 3 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL), en buffer TBE 1X (Tris base 108 g, ácido bórico 55 g, EDTA 0.5 M, 40 mL, para 1 L, pH a 8.1). Posterior al corrido, el gel se visualizó utilizando un transiluminador UV con ayuda del software Biodoc analyze (Biometra, Alemania).

El tamaño aproximado de las bandas generadas se comparó con el marcador de peso molecular 1kb (Fermentas, Lituania) (Anexo 3.4). Las concentraciones de ADN obtenidas se calcularon por absorbancia a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm, utilizando un Nanodrop 2000C (Thermo, EEUU), obteniéndose un rango entre 70 y 2300 ng de ADN/µL con una relación 260:280 de 1.12 a 1.98.

### **Amplificación por PCR de regiones ribosomales**

La identificación taxonómica de los aislamientos de hongos se realizó con base en la amplificación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr (Vilgalys, 2008), utilizando los cebadores ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White *et al.*, 1990). Para el caso de las bacterias se amplificó la subunidad pequeña (16S) del ADNr con los cebadores pA (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y pc5B (5' TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (Kuske *et al.*, 1997).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25  $\mu$ L conteniendo 0.5  $\mu$ M de los cebadores, 1 U de Taq ADN *polimerasa* recombinante (Fermentas), 0.2 mM de dNTPs, 1X de buffer de enzima (100 mM Tris-HCl, pH 8.8, 500 mM KCl, 0.8% Nonidet P40), 1.8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ L de ADN (50 ng/ $\mu$ L) y agua destilada estéril. En todas las reacciones se incluyó un control negativo sin muestra de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador T3 (Biometra), con un programa que consistió de una desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguido por 40 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C (para ITS) y 60°C (para 16S) por 30 s, 72°C por 1 min; y una extensión final a 72°C por 7 min.

Luego de la amplificación, se tomaron 5  $\mu$ L de los productos de reacción para separarlos por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% suplementado con bromuro de etidio (10 mg/mL), con las condiciones anteriormente descritas y utilizando como patrón de referencia el marcador de peso *GeneRuler 100 pb DNA Ladder Plus* (Fermentas).

Una vez definida la especificidad y tamaño de los productos amplificados, éstos se purificaron utilizando los kits *QIAquick PCR Purification* y *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) (Anexo 3.5), dependiendo de su especificidad, para proceder a su secuenciación directa mediante el sistema *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (PE Applied Biosystems) y su corrido en un secuenciador ABI Prism 3730xl de la compañía Macrogen (Corea del Sur), (Anexos 3.7 y 3.8).

### **Análisis de secuencias**

Las secuencias obtenidas con cada cebador, fueron editadas mediante los programas BioEdit 6.0.6 y Chromas 1.45, construyéndose secuencias consenso y confirmándose su identidad por comparación con las bases de datos moleculares, mediante BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). Paralelamente, se obtuvieron del GenBank secuencias de las regiones estudiadas de hongos y bacterias relacionadas taxonómicamente con los microorganismos putativamente identificados mediante el BLASTN, para su alineación con las generadas en esta investigación, mediante el software Clustal W y la realización de un análisis filogenético con el software Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011) utilizando el método de *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987),

con 1000 iteraciones para determinar los valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) y con base en las distancias genéticas inferidas por el método de Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980).

## **RESULTADOS**

### **Aislamiento de microorganismos**

El proceso de aislamiento de microorganismos en los medios de cultivo de los diferentes grupos funcionales de interés, permitió visualizar una alta diversidad y abundancia de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla, con un valor aproximado de la población de  $50 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  de tejido. Para cada uno de los grupos, el rango de las colonias fluctuó entre: FBN ( $10 \times 10^4 - 150 \times 10^4$ ), FIT ( $5-30 \times 10^4$ ), PSM ( $5-300 \times 10^4$ ), CEL ( $23-110 \times 10^4$ ) y PROT ( $8 \times 10^4 - 400 \times 10^6$ ). Las diluciones seriales de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  permitieron la obtención de colonias individuales adecuadas para el proceso de purificación de aislamientos con un promedio de  $1 \times 10^{-4}$  para CEL y FIT y  $1 \times 10^{-5}$  para FBN, PSM y PROT. Con base en los morfotipos coloniales, se purificaron 120 cepas de microorganismos, para luego obtener 25 aislamientos de FBN, 6 de FIT, 20 de PSM, 30 de PROT y 28 de CEL, para un total de 109 cepas (9 hongos y 100 bacterias). En la figura 3.1 se presentan las reacciones del crecimiento de microorganismos, como la formación de halos en algunos medios. En A se observa el cambio de color de verde a amarillo indicando el cambio en el pH del medio debido a la producción de acidez por parte del microorganismo. En B se observan microorganismos formando halo en el medio para fitato, lo que indica la producción de fitasas. En C se puede observar el crecimiento de colonias en medio selectivo para fijadores biológicos de nitrógeno el cual carece de este elemento y finalmente en D se observa la formación de halos en el medio para celulolíticos luego de realizar el revelado con rojo congo indicando la producción de celulasas. La morfología de algunas de las colonias de hongos y bacterias se observa en el anexo 3.6.

### **Identificación molecular de los microorganismos**

De los 109 aislamientos originalmente obtenidos, se seleccionó para la identificación molecular, al menos una cepa de cada tipo morfológico diferenciable en cada medio,



siendo evaluadas 44 cepas bacteriales y 8 micóticas. La amplificación de los productos de PCR de las regiones ITS del ADNr de los hongos, generó un fragmento de aproximadamente 600 pb con los cebadores ITS1 e ITS4 (Figura 3.2.a). Para la región 16S del ADNr de bacterias, los amplicones obtenidos tuvieron un tamaño aproximado de 1200-1300 pb con los cebadores pA y pc5B (Figura 3.2.b).

### **Identificación molecular de bacterias**

El análisis por BLAST de las secuencias de los 44 productos purificados para la región 16S del ADNr de bacterias, indicó que 17 de las cepas pertenecen al género *Pseudomonas*, 7 al género *Bacillus*, 4 al género *Serratia*, 4 al género *Enterobacter*, 3 al género *Acinetobacter*, 2 al género *Chromobacterium* y 2 al género *Klebsiella*; mientras que se presentó un representante de los géneros *Citrobacter*, *Acidovorax*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus* y *Curtobacterium* (Tabla 3.2).

Estos resultados de BLASTN corresponden a un alineamiento local que conduce a identificaciones putativas, pues dependen de la validez taxonómica de las accesiones depositadas en las bases de datos moleculares; por lo tanto para tener mayor confiabilidad en la identificación se realizó un análisis filogenético con secuencias de referencia que presentan respaldo en la literatura científica, siendo posible en la mayoría de casos solo la inferencia taxonómica a nivel genérica, aunque para algunas cepas fue posible plantear su hipótesis de identidad a nivel de especies. Sin embargo, es fundamental tener en cuenta que la identificación inequívoca de las especies debe contemplar esquemas polifásicos que incluyan pruebas bioquímicas, morfológicas y moleculares de acuerdo al Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (ICNB).

El análisis filogenético de las bacterias Gram positivas se realizó con base en 742 pb e incluyó además de las secuencias obtenidas en este estudio, 23 secuencias representativas de diferentes especies principalmente de los géneros identificados mediante el BLASTN. El dendrograma resultante presentó tres clados principales (I, II y III), siendo el primero de ellos ocupado por representantes del género *Bacillus*; el segundo clado presentó cepas de referencia de actinomicetes del género *Streptomyces* y el tercero correspondió a corynebacterias de los géneros *Curtobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*. De las nueve bacterias Gram positivas obtenidas en el estudio, siete se

asociaron filogenéticamente con especies del género *Bacillus*, siendo dos de ellas (87MA197 y 79SEP31) identificadas como posibles miembros de la especie *B. megaterium* y las otras cinco (77SEP29, 43MA191, 95MA198, 71MA226, 174MA251) asociadas al complejo de especies *B. cereus*. Las dos bacterias restantes, se asociaron filogenéticamente con miembros de los géneros *Curtobacterium* (59BMA249) y *Rhodococcus* (55MA248) en el clado III, aunque la resolución del análisis no permitió su identificación a nivel de especie (Figura 3.3).

La matriz de identidad genética obtenida, arrojó valores de 1 para las cepas identificadas como *B. cereus* con un representante de este complejo de especies; mientras que dicho valor fue de 0.997 para las cepas 87MA197 y 79SEP31 con respecto a *B. megaterium*, lo cual genera un gran soporte a ambas hipótesis taxonómicas. Para el caso de la cepa 55MA248 el valor de identidad genética con base a la secuencia bajo estudio fue de 0.978, y tan sólo de 0.93 entre la cepa 59BMA249 y una secuencia de referencia de *Curtobacterium*, lo que evidentemente sólo permite hacer una aproximación de la asociación de dicha bacteria con este género (Tabla 3.3).

El análisis filogenético de las bacterias Gram negativas se realizó con base en 634 pb, y comprendió las 35 cepas obtenidas en el estudio y 51 secuencias representativas de diferentes especies de los géneros identificados mediante el BLASTN. El dendrograma resultante presentó cinco clados principales (I a V) soportados por altos valores de bootstrap (>97%) y diferentes subclados (A, B, C) (Figura 3.4). El clado I representa el género *Pseudomonas* y se subdividió en tres subclados. El IA asoció a 16 de los aislamientos de este trabajo con la especie *P. koreensis*; el subclado IB presentó cepas de referencia de *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *P. putida*, siendo la cepa 100SEP37 asociada con esta última especie. El subclado IC agrupó a las cepas de referencia de *P. syringae*.

El segundo clado (II) asoció miembros de los géneros *Chromobacterium* (subclado IIA), *Acidovorax* (subclado IIB), y *Cupriavidus*, *Collimonas* y *Burkholderia* (subclado IIIC). En este segundo clado fue posible la identificación de las cepas 89SEP34 y 104SEP38 como miembros del género *Chromobacterium* y del aislamiento 96MA199 como *Acidovorax* spp. El clado III correspondió a representantes del género *Acinetobacter* e

incluyó tres de los aislamientos (99SEP36, 90SEP35 y 76SEP28). El clado IV presentó dos subclados (A y B). El grupo IVA permitió identificar a los aislamientos 72MA192 y 78SEP30 como miembros del género *Klebsiella*, mientras que en el clado IVB se asociaron las cepas 175MA201, 81MA195, 75MA194 y 70SEP27 con *Serratia sp.*; 97MA200, 23SEP17 y 22SEP16 con el género *Enterobacter* y la cepa 80MA227 con *Citrobacter*. Finalmente en el clado V se ubicaron representantes del género *Flavobacterium* y la cepa 37MA189 obtenida en este estudio.

Los valores de identidad genética soportan la hipótesis taxonómica de que 16 de los aislamientos son afines filogenéticamente a la especie *P. koreensis*, al compartir un valor de 0.99 con las cepas de referencia. Este análisis de identidad permite postular con alto nivel de certeza la naturaleza de patógenos humanos de las cepas de *Klebsiella* y *Enterobacter* aisladas en el estudio, al compartir niveles de 1 y 0.994 entre las cepas 72MA192 y 75MA194, con secuencias de referencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*, respectivamente. Por otra parte, los valores de identidad genética obtenidos para las cepas identificadas como *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Chromobacterium*, así como también de la cepa 100SEP37 asociada con *P. putida* en el análisis filogenético, indican que estas bacterias sólo son identificables en este estudio a nivel genérico (Tabla 3.4).

### **Identificación molecular de hongos**

El análisis por BLASTN de las ocho secuencias ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr, indicó que tres de los hongos pertenecen al género *Plectosphaerella*, mientras que se presentó un representante de cada uno de los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Bionectria* y *Phoma* (Tabla 3.5).

El análisis filogenético de los hongos obtenidos en la investigación, generó un dendrograma con ocho clados (I a VIII) fuertemente soportados por valores de bootstrap superiores a 94% (Figura 3.5). El primero de ellos representa el género anamórfico *Fusarium*, y presentó una asociación del aislamiento 201MA166 con la especie fitopatógena *F. solani*. El clado II correspondió a secuencias de referencia de *Trichoderma sp.*; mientras que el clado III agrupó a la cepa 50MA160 con un representante del género *Bionectria* (Hypocreales). El clado IV albergó representantes

del Ascomycete Phyllachoral *Plectosphaerella* e incluyó a tres de los aislamientos obtenidos en el estudio (35MA158, 51SEP40 y 52SEP41).

Los clados V y VI se presentaron asociados e incluyeron a los géneros anamórficos de hyphomycetes moniliales *Penicillium* y *Aspergillus*, siendo las especies más afines filogenéticamente a los aislamientos 49MA159 y 108MA163, *P. griseofulvum* y *A. fumigatus*, respectivamente. El clado VII agrupó al aislamiento 200MA165 con miembros del género anamórfico formador de picnidios *Phoma*. Y finalmente el clado VIII correspondió a *Botryosphaeria* y a algunos de sus estados imperfectos *Lasiodiplodia*.

La matriz de identidad soportó la asociación a nivel genérica de los hongos identificados como *Plectosphaerella* sp. (0.9), *Bionectria* sp. (0.92) y *Phoma* sp. (1) mientras que el aislamiento 201MA166 asociado en el dendrograma con *F. solani* y el 49MA159 asociado con *P. griseofulvum*, presentaron bajos niveles de identidad con las secuencia de referencias de dichas especies, por lo que resulta preferible definir su identidad sólo a nivel genérico. Finalmente, el hongo 108MA163 presentó un alto valor de identidad con la cepa de referencia de *A. fumigatus* (Tabla 3.6).

## **DISCUSIÓN**

El cultivo de vainilla representa un renglón agroindustrial de gran potencial para Colombia, especialmente en las regiones del Urabá, Magdalena medio, las selvas del Pacífico, Amazonas y el Occidente Antioqueño, donde se presentan las condiciones agroecológicas óptimas para su desarrollo. Adicionalmente, gracias a la gran diversidad de especies de vainilla nativas que se presentan en el país, existe una oportunidad única para la generación de especias, aromas y derivados alternativos a la vainilla tradicional, así como también para el desarrollo, a partir de programas de mejoramiento genético, de híbridos con características organolépticas especiales y resistencia a plagas y enfermedades (Ordoñez *et al.*, 2011). A pesar de este potencial, el nivel de conocimiento que se tiene en el país del manejo agronómico de este cultivo es incipiente y en gran medida se ha obtenido de experiencias provenientes de otros países como Madagascar, Mauricio y Reunión, cuyas condiciones agroecológicas, dada su situación insular, distan mucho de las que se presentan en Colombia (Damirón, 2004).

Uno de los aspectos que más afecta la producción de la vainilla, son las prácticas de nutrición que se realizan en el cultivo, por cuanto las raíces de esta planta no se desarrollan en suelo de origen mineral, sino sobre el compost resultado de la descomposición de la materia orgánica superficial. Bajo condiciones de explotación comercial, dicho *mulch* es suplido por la adición de diversos sustratos como vermicompost, residuos celulolíticos de podas y rocerías, fibras de coco y estiércol animal, entre otros (Arango *et al.*, 2011). Esta situación ubica en primer orden la necesidad de conocer la microflora asociada a los diferentes procesos biogeoquímicos que ocurren en la rizosfera y sustratos que se utilizan para la producción de vainilla. Es por esto que la presente investigación se planteó como una aproximación inicial a la identificación de grupos de microorganismos asociados a funciones esenciales en los procesos de descomposición y disponibilidad de nutrientes en este cultivo, como la degradación de celulosa y derivados proteicos, fijación biológica de nitrógeno, y la solubilización de fuentes orgánicas e inorgánicas de fósforo.

Los resultados obtenidos permitieron aislar e identificar varios microorganismos con capacidad potencial para su uso posterior como biofertilizantes en el cultivo de vainilla. Estos resultados permitieron en primer término confirmar la inmensa diversidad de microorganismos asociados con la rizosfera de las plantas de vainilla en un cultivo bajo cobertizos de techo-sombra ubicado en el municipio de Sopetrán (Antioquia), seleccionándose con base en los morfotipos coloniales un total de 109 cepas, 52 de las cuales fueron identificadas molecularmente a partir del análisis de secuencias 16S del ADNr para bacterias e ITS para hongos. A pesar de que la selección de los aislamientos a identificar se basó en criterios fenotípicos, se destacó la abundancia de bacterias del género *Pseudomonas* y específicamente de la especie *P. koreensis*, que representó 16 de las 17 cepas identificadas en este género, a partir de todos los medios evaluados y principalmente de FBN y PSM.

Las bacterias del género *Pseudomonas* están ampliamente distribuidas en suelos agrícolas y tienen diversas funciones relacionadas con la descomposición de materia orgánica y la promoción del crecimiento de las plantas, aunque algunas pueden tener también efectos patogénicos (Avis *et al.*, 2008; Saharan y Nehra, 2011). *P. koreensis* fue aislada por primera vez de suelos agrícolas de Corea (Kwon *et al.*, 2003);

taxonómicamente es afín al grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes. Es una bacteria que ha sido reportada como una alternativa promisorio como biocontroladora de Oomycetes que producen zoosporas y que son reconocidos patógenos de diversos cultivos (Palleroni, 1984; Hultberg *et al.*, 2010).

Toribio *et al.* (2011) han demostrado el potencial que tiene *P. koreensis* para inhibir el crecimiento de algunos microorganismos patógenos de plantas a través de la producción de biosurfactantes y otros metabolitos secundarios; así como de su alta capacidad para competir con otros microorganismos en la rizosfera. Kitamura *et al.* (2010) encontraron que varios representantes del género *Pseudomonas*, incluyendo a *P. koreensis*, son capaces de sintetizar una amida del ácido succínico, compuesto que es un promotor del crecimiento de las plantas. Adicionalmente, se ha reportado que miembros del género *Pseudomonas* aislados de nódulos de raíces de leguminosas, presentan afinidad filogenética con *P. putida*, *P. koreensis* y *P. fluorescens*, entre otros. (Issar *et al.*, 2012). De gran interés resultará evaluar en el futuro, cual es el papel principal de esta bacteria en la rizosfera de las plantas de vainilla, ya que fue principalmente detectada creciendo en medio selectivo para bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> y solubilizadores de P.

Por otra parte, de las nueve bacterias Gram positivas identificadas en el estudio, siete correspondieron a representantes del género *Bacillus*, dos de ellas asociadas filogenéticamente con *B. megaterium* y cinco al complejo de especies *B. cereus*; estas últimas fueron aisladas en su totalidad del medio para evaluar capacidad proteolítica, mientras que los dos aislamientos de *B. megaterium* se obtuvieron de evaluaciones de celulolíticos y solubilizadores de roca fosfórica (PSM).

El complejo de especies *B. cereus* está conformado por las especies *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis*, no siendo posible con la resolución que ofrecen las secuencias del ADNr 16S diferenciar dichas especies. *B. anthracis* es una bacteria ampliamente reconocida por causar el ántrax y que puede ser identificada con base en la amplificación de los genes *lef*, *cya* y *pag* del plásmido pXO1. *B. thuringiensis* se diferencia de las demás especies, porque tiene la capacidad de producir inclusiones cristalinas de proteína (endotoxinas) durante la esporulación. Jensen *et al.* (2003) indican que para la identificación molecular de estas especies es necesaria la

amplificación de los genes que codifican para las proteínas *Cyt* y *Cry*, además de *btcap* y *vip3a*, codificantes para proteínas involucradas en las síntesis de la cápsula (Guttmann y Ellar, 2000; Sauka y Benintende, 2008). De interés resultará en un próximo trabajo, la identificación a nivel de especie de las cepas obtenidas en esta investigación, de manera que se evalúe su papel en la rizosfera de las plantas de vainilla.

Por su parte *B. megaterium* es una bacteria ampliamente investigada, que se caracteriza por su capacidad como promotora de crecimiento vegetal a partir de la producción de compuestos volátiles, la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y el incremento en el número y longitud de pelos radicales y raíces secundarias (López-Bucio *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2010). Esta bacteria ha sido reportada también promoviendo el crecimiento en plántulas de *Phaseolus vulgaris*, gracias al aumento en la producción de citoquininas en las plantas inoculadas (Ortíz-Castro, 2008) y como solubilizadora de fosfato y biocontroladora de patógenos en *Capsicum annuum* (Akgül y Mirik, 2008). Por lo anterior, el aislamiento obtenido de *B. megaterium* en este estudio, presenta un potencial como PGPR en plantas de vainilla y debería ser considerado en el futuro para ser evaluado bajo condiciones de campo.

Otra bacteria que resultó representativa de los microorganismos proteolíticos obtenidos en el estudio, fue *Serratia* sp., con tres de las cuatro cepas identificadas; la otra cepa se obtuvo del medio que contenía celulosa como única fuente de carbono. Algunas bacterias del género *Serratia* se caracterizan por formar un pigmento producido como un metabolito secundario conocido como prodigiosina, pero no es bien conocida su función. Esta pigmentación sólo se presenta en un bajo porcentaje de cultivos aislados y es dependiente de la especie y de las condiciones de incubación (Grimont y Grimont, 1992).

Algunas especies de *Serratia* se encuentran frecuentemente en aguas, suelos, plantas, material vegetal en descomposición y ocasionalmente en el intestino de diversos animales invertebrados (Grimont y Grimont, 2006; Pradel *et al.*, 2007). El género incluye las especies *S. marcescens*, *S. nematodiphila*, *S. rubidaea*, *S. liquefaciens* y *S. plymuthica*, entre otras. La primera de ellas es un patógeno facultativo humano que causa infecciones nosocomiales. Estas bacterias tienen la capacidad de producir enzimas

extracelulares que degradan quitina, y *proteasas* que degradan caseína, lo cual representa un potencial para ser usada en la industria y en la agricultura como controlador biológico de hongos patógenos (Hejazi y Falkiner, 1997). *S. marcescens* también ha sido ampliamente reportada como una bacteria eficiente en la solubilización de fosfato inorgánico, con potencial para su uso en la extracción de P insoluble en minas naturales de este elemento (Villegas y Fortin, 2002; Farhat *et al.*, 2009). En el caso de algunas especies del complejo *S. liquefaciens*, se reconoce que éstas producen sustancias químicas promotoras del crecimiento de las plantas, tienen propiedades antifúngicas, estimulan el establecimiento de bacterias simbiotas fijadoras de N<sub>2</sub> y actúan como patógenos de insectos (Grimont y Grimont, 1992; Kalbe *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997).

Por su parte, la especie *S. nematodiphila* es fluorescente y también desarrolla la pigmentación roja. Fue inicialmente encontrada asociada en forma simbiótica con el nematodo entomopatógeno *Heterorhabditoides chongmingensis* en China y comparte el 99.8% de similitud en sus secuencias de la región 16S del RNAr con *S. marcescens* (Zhang *et al.*, 2009). En 2011, Abebe *et al.* reportaron la simbiosis entre el nematodo entomopatógeno *Caenorhabditis briggsae* y la bacteria *Serratia* sp., siendo comprobada su efectividad para el manejo del insecto plaga de la producción apícola, *Galleria mellonella*. Adicionalmente, Dastager *et al.* (2011) encontraron que *S. nematodiphila* es eficiente en la solubilización de P, produce ácido indol acético (AIA), sideróforos y crece en medio libre de nitrógeno. De ahí que los autores concluyeron que esta especie tiene un alto potencial para ser base de inoculantes y alcanzar el efecto de promoción del crecimiento en algunas plantas.

En nuestro estudio, se encontraron dos cepas de *Acinetobacter* como proteolíticas asociadas a la rizosfera de vainilla y un tercer aislamiento como solubilizador de roca fosfórica. Hay muchas especies descritas de éste género, pero en general se agrupan en cinco complejos: *A. calcoaceticus-baumannii*, *A. iwoffii*; *A. johnsonii*, *A. haemolyticus* y *A. junii* (Bouvet y Grimont, 1986). El género *Acinetobacter* se caracteriza por presentar bacterias no fermentativas, saprófitas habitantes de suelos, cuerpos de agua, aguas residuales y alimentos; así como también son frecuentemente encontradas en



ambientes clínicos, siendo *A. baumannii* el patógeno nosocomial más significativo del género (Bouvet y Grimont, 1986; Gutnick y Bach, 2008; Seifert y Wisplinghoff, 2008).

Se ha estimado que *Acinetobacter* puede constituir el 0.001% del total de la población heterótrofa aeróbica del suelo y el agua. Por su versatilidad metabólica, tienen la habilidad de remover fosfato de aguas residuales, minimizando así el problema de eutrofización. Son también capaces de elaborar y secretar polímeros (Gutnick y Bach, 2008). Juegan un papel importante en varios procesos industriales, así como en la biodegradación de un amplio rango de contaminantes orgánicos ambientales (Williams y Kay, 2008). En este sentido, Singh *et al.* (2011) sustentan el primer reporte de cepas de *Acinetobacter* aisladas de industrias de colorantes, capaces de utilizar compuestos aromáticos (carbazol) como única fuente de C y N. Adicionalmente, se conoce que esta bacteria es también una importante PGPR y por tanto, varios autores encontraron que especies de *Acinetobacter* podrían ser formuladas en biofertilizantes de amplio espectro, por su capacidad probada para solubilizar fosfato, fijar N<sub>2</sub> y producir AIA (Indiragandhi *et al.*, 2008; Gulati *et al.*, 2009).

Tal como se indicó anteriormente, se ha encontrado que bacterias del género *Acinetobacter*, además de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Rhizobium* y *Mycobacterium*, tienen capacidad de producir AIA (Wilkinson *et al.*, 1994; Tsavkelova, 2005). El AIA de origen microbiano es altamente relevante en la promoción de la germinación de orquídeas, cuando las cepas bacterianas están en estrecha relación con las semillas (Tsavkelova, 2007). Esta situación plantea una interesante línea de investigación con las cepas de estos géneros obtenidos en el presente estudio, dados los problemas de latencia que experimentan las semillas de vainilla en nuestro medio.

De interés resultó el aislamiento en el estudio de las enterobacterias *Klebsiella* y *Enterobacter*, especialmente en los medios destinados a evaluar la solubilización de P orgánico e inorgánico. Estas bacterias son saprófitas, frecuentemente encontradas en aguas, suelos y otros sustratos que tienen contacto con estiércol de animales, al ser algunas de sus especies habitantes comunes del tracto digestivo y urinario de diversos mamíferos. Así por ejemplo *K. pneumoniae* que es clínicamente el más importante representante del género *Klebsiella*, es un patógeno importante en infecciones

nosocomiales que se caracteriza por tener una gran cápsula externa de polisacáridos. Sin embargo, en forma natural está presente en los suelos y puede ser aislada de la superficie de las raíces de algunas plantas (Brisse *et al.*, 2006).

Esta bacteria ha sido muy estudiada como una bacteria diazotrofa de vida libre, pues al menos 30% de las cepas pueden fijar N en condiciones anaeróbicas (Brisse *et al.*, 2006; Reinhardt *et al.*, 2008). Ya que las cepas de *K. pneumoniae sensu stricto* asociadas con plantas vivas o en descomposición, son diferentes de las que están asociadas con infecciones en humanos (las primeras utilizan 5-ketogluconato como única fuente de carbono y carecen de cápsulas), de gran interés resultará evaluar dichas características en las cepas aquí identificadas, de manera que sea posible definir la viabilidad de su inclusión como potenciales biofertilizantes en cultivos de vainilla (Brisse *et al.*, 2006).

Con respecto a la otra enterobacteria detectada, *E. cloacae*, se debe indicar que es un importante patógeno nosocomial, que puede ser encontrado además en frutas y vegetales en general. Junto con las especies *E. asburiae* y *E. aerogenes* forman el complejo *E. cloacae*. Las infecciones causadas por este patógeno causan la más alta tasa de mortalidad comparado con otras infecciones de *Enterobacter* (Grimont y Grimont, 2006) y aunque este organismo tiene cepas patógenas de humanos, algunos aislamientos han sido usados como agentes de control biológico de Oomycetes que causan la pudrición de las semillas de pepino, como *Pythium ultimum*, y como controlador de algunos insectos plaga (Dijk y Nelson, 2000), lo que representa un posible uso en el manejo de Oomycetes del suelo que afectan la vainilla. Ya que entre los residuos utilizados para obtener el sustrato de crecimiento de la vainilla en el cultivo utilizado en este trabajo, se utiliza 5% de estiércol de ovinos, además de 15% de material leñoso y 85% de hojarasca, no resultan sorprendidos dichos aislamientos y por el contrario llaman la atención sobre la necesidad de realizar un proceso de compostaje completo con los residuos de origen animal utilizados en este cultivo, de manera que prevalezcan unas condiciones de bioseguridad para los productores y consumidores de vainilla.

En relación con las demás bacterias identificadas en el estudio, es de notar la alta diversidad de géneros encontrados, incluyendo *Rhodococcus*, *Curtobacterium*, *Flavobacterium*, *Acidovorax* y *Chromobacterium*, bacterias que representan en su

conjunto la existencia en la rizosfera de vainilla de una compleja red de procesos metabólicos que desempeñan diversas funciones en la descomposición de los sustratos utilizados para el establecimiento y la nutrición de esta planta. Así por ejemplo, se destaca el efecto de *Rhodococcus* en la producción de sideróforos, que conducen a la formación de complejos solubles de Fe que pueden ser tomados por diversas especies vegetales. De igual manera se ha confirmado que esta bacteria es solubilizadora de fosfato tricálcico mediante el mecanismo de producción de ácidos orgánicos (Saharan y Nehra, 2011) y su participación en reacciones de biodesulfurización de combustibles fósiles, en la degradación de PCBs y en general, en la utilización de una amplia variedad de compuestos orgánicos como fuente de energía (Lichtinger *et al.*, 2000). Lo anterior ubica a los miembros de este género en un lugar importante en el reciclaje global del carbono y como un componente fundamental en las formulaciones microbianas destinadas a los procesos de biorremediación de ambientes contaminados con compuestos orgánicos recalcitrantes.

Con respecto a la identificación de los nueve hongos aislados, lo que primero llama la atención es la presencia de algunos fitopatógenos en la rizosfera de las plantas de vainilla, como *Fusarium solani* y *Phoma* sp., lo cual nuevamente conduce a plantear la necesidad de extremar los cuidados con respecto al origen y tratamiento de los sustratos utilizados para el establecimiento de los cultivos, pues un mal uso de estas fuentes puede llevar a la dispersión generalizada de patógenos limitantes del cultivo en el país, lo cual afectaría aún más los planes de expansión de esta especie. En este sentido, recientemente Santa *et al.* (2011) realizaron un estudio tendiente a evaluar los hongos asociados a la pudrición basal de las plantas de vainilla, el principal problema fitosanitario de este cultivo en el mundo (Pinaría *et al.*, 2010) y encontraron que la especie *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* corresponde al agente causal de dicha enfermedad. Pero adicionalmente identificaron otros hongos de los géneros *Fusarium*, *Phoma* y *Lasiodiplodia* en plantas con síntomas de necrosis de tallos, lo que coincide plenamente con los resultados de este trabajo.

Con respecto a hongos saprófitos, el estudio identificó a tres de los aislamientos como miembros del género *Plectosphaerella* a partir del medio con fitato, lo cual los señala como componentes del proceso de solubilización de las fuentes orgánicas de P presentes

en las macromoléculas de los sustratos utilizados en este cultivo. El fitato es un derivado del mio-inositol presente como fuente de almacenamiento de P en diversos tejidos de plantas y especialmente en semillas (Raboy, 2003). Los hongos degradadores de fitato producen *fitasas* que actúan en forma extracelular y que se han utilizado como aditivos de los concentrados de animales monogástricos, que al carecer de dichas enzimas, son incapaces de utilizar la fuentes de P presentes en dicho compuesto (Vats y Banerjee, 2004).

Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio donde se indica la capacidad de este hongo para producir *fitasas*, lo cual representa no sólo un importante hallazgo por su posible utilización como biofertilizante en aplicaciones dirigidas a la solubilización de fuentes orgánica de P, sino también por su potencial como fuente de enzimas para la industria de alimentación animal, tal como ocurre con hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* y *Rhizopus* (Vats y Banerjee, 2004). En este sentido, Ying-Wu *et al.* (2009) realizaron una investigación tendiente a evaluar la función como endófito de *Plectosphaerella cucumerina* en plántulas de remolacha, encontrando que su presencia no sólo mejoró la actividad de las enzimas clave en el metabolismo de los azúcares y del nitrógeno en las plántulas, sino que también promovió el crecimiento, el rendimiento y la acumulación de azúcares en la remolacha.

Adicionalmente a los hongos mencionados, en este trabajo también fue posible la identificación de *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium griseofulvum* y *Bionectria* sp. Los dos primeros hongos son conocidas especies saprófitas habitantes de diversos sustratos, donde cumplen importantes funciones como degradadores de materia orgánica y fundamentalmente de los componentes de la pared celular de las plantas, gracias a sus múltiples enzimas hidrolíticas, que incluyen *celulasas*, *pectinasas* y *lacasas* (de Vries y Visser, 2001).

Por su parte *Bionectria* es un género de Ascomycetes del orden Hypocreales que incluyen saprófitos degradadores de madera, hojarasca y algunas especies micoparasíticas (Schroers, 2001), por lo cual de gran interés resultará en el futuro la identificación a nivel de especie del aislamiento obtenido, pues podría tener una utilidad en el manejo fitosanitario en este cultivo, más aún cuando los principales patógenos de la vainilla son

hongos habitantes del suelo como *Fusarium* spp. que pueden permanecer latentes por largos períodos de tiempo, gracias a su producción profusa de clamidosporas.

Este estudio representa un primer avance en el reconocimiento de la microflora asociada a la rizosfera de un cultivo piloto de vainilla del Occidente Antioqueño. En él se encontró un alto nivel de diversidad con respecto a los géneros y especies de hongos y bacterias identificados, que brinda una importante fuente de información sobre la utilización potencial de microorganismos como biofertilizantes, controladores biológicos o simplemente aceleradores de la descomposición de nutrientes propios de los sustratos en los que se desarrollan las raíces de las plantas de vainilla. Adicionalmente, se identificaron bacterias con problemas de bioseguridad por su posible condición de patógenas humanas, así como hongos fitopatógenos asociados a la rizosfera, situaciones ambas que ameritan realizar esfuerzos para certificar la fuente de los sustratos y su manejo adecuado en procesos de compostaje propios de este tipo de explotaciones agrícolas.

## REFERENCIAS

Abebe E., Akele F.A., Morrison J., Cooper V., and Thomas W.K. 2011. An insect pathogenic symbiosis between a *Caenorhabditis* and *Serratia*. *Virulence*. 2(2): 158-161.

ADC Commercialization Bulletins. 2000. Vanilla. Agribusiness Development Centre of the USAID-funded Uganda's Investment in Developing Export Agriculture (IDEA) Project. [www.foodnet.cgiar.org](http://www.foodnet.cgiar.org) Kampala, Uganda. 11p.

Aditya B., Ghosh A., and Chattopadhyay D. 2009. Co-inoculation effects of nitrogen fixing and phosphate solubilising microorganisms on teak (*Tectona grandis*) and indian redwood (*Chukrasia tubularis*). *J Biol Sci* 1(1): 23-32.

Ahmad J.S., and Baker R. 1987. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 358-362.

Akgül D.S, Mirik M., 2008. Biocontrol of *Phytophthora Capsici* on Pepper plants by *Bacillus Megaterium* strains. *J Plant Pathol* 90(1): 29-34.

- Anandaraj M., Rema J., Sasikumar B., and Suseela-Bhai R. 2005. *Vanilla* (Extension pamphlet). Indian Institute of Spices Research. Calicut, Kerala, India, 11 pp.
- Anilkumar A.S. 2004. *Vanilla* cultivation: A profitable agri-based enterprise. *En: Kerala calling*. February. 26-30 pp.
- Avis T.J., Gravel V. Antoun H., Tweddell R.J. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biol Biochem* 40: 1733–1740.
- Baldani J., Caruso L., Baldani V.L.D., Goi S.R., Döbereiner J. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol Biochem* 29(5–6): 911–922.
- Bashan Y. and de-Bashan L.E. 2010. Chapter two - How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—A critical assessment. *Adv Agron* 108: 77-136.
- Boddey R.M., Bruno J.R., Alves B.J.R, Reis V.M., and Urquiaga S. 2006. Biological nitrogen fixation in agroecosystems and in plant roots, 178-186. *En: Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*. Uphoff N. *et al.* (Eds.) CRC Press. Boca Raton FL.
- Bouvet P.J.M and Grimont P.A.D. 1986. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii* *Int J Sys Bacteriol* 36(2): 228-240.
- Brisse S. Grimont F. and Grimont P.A.D. 2006. The genus *Klebsiella*, 159-196. *En: The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria*. 3<sup>rd</sup> ed. M. Dworkin *et al.*, (Eds.). Springer NY., USA.
- Castro B.G. 2008. Evaluación del cultivo y producción de vainilla en la zona de Papantla, Veracruz, México. Tesis Ph.D. Ecología y Manejo de Recursos Naturales. Instituto de Ecología, A. C. 93p.

Chen Y.P., Rekha P.D., Arun A.B., Shen F.T., Lai W.A., and Young C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol* 34: 33–41.

Damirón V.R. 2004. La vainilla y su cultivo. Dirección General de Agricultura y Fitosanitaria del estado de Veracruz. 50 p.

Dastager S.G., Deepa C.K., and Pandey A. 2011. Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Piper nigrum* L.). *World J. Microbiol Biotechnol* 27(2): 259-265.

De Vries R.P. and Visser J. 2001. Polysaccharides degradation of plant cell wall enzymes involved in *Aspergillus*. *Microbiol Mol Biol Rev* 65(4): 497-522.

Dijk K.v., Nelson E.B. 2000. Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and Damping-Off. *Appl Environ Microbiol* 66(12): 5340-5347.

Dijkshoorn L. and Nemeč A., 2008. The diversity of the genus *Acinetobacter*, 348 pp. *En: Gerischer U. (Ed) Acinetobacter molecular biology*. Caister Academic Press. Germany.

Döbereiner J. 1992. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis* 13: 1–13.

Döbereiner J. and Day J.M. 1976. Associative simbiose in subtropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. 518–538. pp. *En: Newton, W.E., Nyman, C.J. (Eds.), Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Symposium on Nitrogen Fixation II*, Washington State University Press, Pullman,

Egamberdiyeva D. and Islam K.R. 2008. Salt-tolerant rhizobacteria: Plant growth promoting traits and physiological characterization within ecologically stressed environments, 257-283. *En: Ahmad I. Pichtel J. and Hayat S. (Eds.). Plant-Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*. Wiley-VCH. Germany.

Farhat M. B., Farhat A., Bejar W., Kammoun R., Bouchaala K., Fourati A., Antoun H., Bejar S., and Chouayekh H. 2009. Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CTM 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa. Arch Microbiol 191(11): 815-24.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.

Flores-Mireles A.L., Winans S.C., and Holguin G. 2007. Molecular characterization of diazotrophic and denitrifying bacteria associated with mangrove roots. Appl Environ Microbiol 73(22): 7308–7321.

Grimont F. and Grimont P.A.D. 1992. The genus *Serratia*, 2822-2848 pp. *En: Balows A. and Trusper H.G. (Eds.). The Prokaryotes. Springer NY., USA.*

Grimont F. and Grimont P.A.D. 2006a. The genus *Serratia*, 219-244 pp. *En: The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria. 3<sup>rd</sup> ed. Dworkin M. et al. (Eds.). Springer NY., USA.*

Grimont F. and Grimont P.A.D. 2006b. The genus *Enterobacter*, 197-214 pp. *En: Dworkin M. et al. (Eds.). The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria. 3<sup>rd</sup> ed. Springer NY., USA.*

Gulati A., Vyas P., Rahi P., and Kasana R.Ch. 2009. Plant growth-promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. Curr Microbiol 58: 371-377.

Gutnick D.L. and Bach H. 2008. Potential application of *Acinetobacter* in Biotechnology, 348 pp. *En: Acinetobacter Molecular Biology. Gerischer U. (Ed). Caister Academic Press. Germany.*

Guttmann D.M. and Ellar D.J. 2000. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. FEMS Microbiol Lett 188(1): 7-13.



- Hameeda B., Harini G., Rupela O.P., Wani S.P., and Reddy G. 2008. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol Res* 163: 234–242.
- Hejazi A. and Falkiner F. R. 1997. *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol* (46): 903-912.
- Henri F., Laurette N.N., Annette D., John Q., Wolfgang M., Francois-Xavier E., and Dieudonne N. 2008. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from acidic soils of Cameroon. *Afr J Microbiol Res* 2: 171–178.
- Hultberg M., Alsberg T., Khalil S., and Alsanius B. 2010. Suppression of disease in tomato infected by *Pythium ultimum* with a biosurfactant produced by *Pseudomonas koreensis*. *BioControl* 55(3): 435-444.
- Hultberg M., Bengtsson T., and Liljeroth E. 2010. Late blight on potato is suppressed by the biosurfactant-producing strain *Pseudomonas koreensis* 2.74 and its biosurfactant. *BioControl* 55(4): 543-550.
- Illmer P. and Schinner F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem* 24: 389–395.
- Indiragandhi P., Anandham R., Madhaiyan M., and Sa T.M. 2008. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) *Curr Microbiol* 56(4): 327-333.
- Issar S., Sharma S., Kumar C.D., Kumar G.H. y Gaur R.K. 2012. Molecular Characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from root nodules of various leguminous plants of Shekhawati Region, Rajasthan, India. *Am J Plant Sci* 3: 60-63
- Jensen G. B., Hansen B. M., Eilenberg J., and Mahillon J. 2003. The hidden lifestyles of *B. cereus* and relatives. Review Article. *Environ Microbiol* 5(8): 631–640.

- Kalbe C., Marten, P., and Berg, G. 1996. Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. *Microbiol Res* 151: 433-439.
- Khalid M., Yang W.J., Kishwar N., Rajput Z.I., and Arijó A.G. 2006. Study of cellulolytic soil fungi and two nova species and new medium. *J Zhejiang Univ Sci B* 7(6): 459-466.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120.
- Kitamura T., Soejima H., and Sugiyama T., 2010. U.S. *Patent No. 2010/0248314A1*. Process for production of succinic acid amide compound. Sumimoto Chemical Company. Tokyo, Japan. Patent Application Publication.
- Koo S.Y. and Cho K.S. 2009. Isolation and characterization of a plant growth-promoting rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5 *J. Microbiol Biotechnol* 19(11): 1431-1438.
- Kumar V., Behl R.K., and Narula N. 2001. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. *Microbiol Res* 156: 87-93.
- Kuske C.R., Bams S.M., and Busch J.D. 1997. Diverse uncultivated Bacterial Groups from Soils of the Arid Southwestern United States that are Present in Many Geographic Regions. *Appl Environ Microbiol* 63: 3614-3621.
- Kwon S.W., Kim J.S., Park I.Ch., Yoon S.H., Park D.H., Lim Ch.K., and Go S.J. 2003. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 21-27.
- Lichtinger T. *et al.* 2000. Biochemical identification and biophysical characterization of a channel-forming protein from *Rhodococcus erythropolis*. *J Bacteriol* 182: 764-770.

López-Bucio J., Campos-Cuevas J.C., Valencia-Cantero E., Velázquez-Becerra C., Farías-Rodríguez R. y Macías-Rodríguez L.I. 2009. *Bacillus megaterium* modifica la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* independientemente de auxinas y etileno. *Biológicas* 11: 01-08.

Matsumoto L.S., Martines A.M., Avanzi M.A., Albino U.B., Brasil C.B., Saridakis D.P., Rampazo L.G.L., Zangaro W., and Andrade G. 2005. Interactions among functional groups in the cycling of, carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. *Applied Soil Ecology* 28(1): 57–65.

Meyer O. 1994. Functional groups of microorganisms, 67-93 pp. *En: Schulze E.D. and Mooney H.A. (Eds.) Biodiversity and ecosystem function.* Springer, New York.

Ordoñez C.N.F., Osorio M.A.I., Calle P.J.E., Díez G.M.C. y Moreno H.F. 2011. La vainilla en Colombia y en el mundo, 11-23 pp. *En: Moreno F. y Díez M.C. (Eds.). Cultivo de vainilla. Contribuciones para el desarrollo de su cadena productiva en Colombia.* Medellín, Colombia.

Ordoñez C.N.F. 2012. Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo *Rhizoctonia* y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de planta de *Vanilla planifolia* Jacks. Tesis de Maestría en Bosques y Conservación Ambiental. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. 2012

Ortíz-Castro R., Valencia-Cantero E., and López-Bucio J. 2008. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signal Behav* 3(4): 263-265.

Osorio M.A.I., Gómez L.N.M., Arango M.D.A., Moreno H.F., Díez G.M.C. y Osorio V.N.W. 2011. Establecimiento y manejo del cultivo de vainilla, 45-58 pp. *En: Moreno F. y Díez M.C. (Eds.). Cultivo de vainilla. Contribuciones para el desarrollo de su cadena productiva en Colombia.* Medellín, Colombia.

Osorio N.W., and Habte M. 2001. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and P solubilizing fungus on growth and plant P uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Res Mgmt* 15: 263-274.

- Otero J.T., Ackerman J.D., and Bayman P. 2000. Diversity and host specificity of mycorrhizal fungi from tropical orchids. *Am J Bot* 89: 1852–1858.
- Palleroni N.J. 1984. Pseudomonadaceae, 141-199 pp. *En: Krieg N.R. and Holt J.G. (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.*
- Pandey A., Das N., Kumar B., Rinu K., and Trivedi P. 2008. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 97–102.
- Pinaria A.G., Liew E.C.Y., and Burgess L.W. 2010. *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. *Australas Plant Pathol* 39: 176–183.
- Pradel E., Zhang Y., Pujol N., Matsuyama T., Bargmann C.I., and Ewbank J.J. 2007. Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 104(7): 2295-2300.
- Raboy V. 2003. myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochem* 64: 1033-1043.
- Ramírez L.E., G. and Pino-Benitez N. 2006. Forest orchids of the Choco region. *Lyonia*, 10(1): 17-31.
- Reinhardt E.L., Ramos P.L., Manfio G.P., Barbosa H.R. Pavan C., and Moreira-Filho C.A. 2008. Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from brazilian agricultural plants at São Paulo state. *Braz J Microbiol* 39: 414-422.
- Richardson A.E., and Hadobas P.A. 1997. Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Can J Microbiol* 43: 509–516.
- Richardson A.E., Hadobas P.A., and Hayes J.E. 2001. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *Plant J* 25: 641–649.
- Saharan B.S., Nehra V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. 30 p.

Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Santa C., Díez M.C., Marín M. 2011. Identificación morfológica y molecular de microorganismos fitopatógenos asociados a plantas de vainilla (*Vanilla planifolia*) en cultivos del occidente antioqueño. XXX Congreso Colombiano y XVI Latinoamericano de Fitopatología. Bogotá, Colombia.

Sauka D.H. y Benintende G.B. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev Argent Microbiol* 40: 124-140.

Schroers H.J. 2001. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys* anamorphs. *Stud Mycol* 46: 1-214.

Seifert H. and Wisplinghoff H. 2008. Molecular Epidemiology of *Acinetobacter* species 348 p. *En: Gerischer U. (Ed.). Acinetobacter Molecular Biology*. Caister Academic Press. Germany.

Singh G.B., Gupta S., Srivastava S., and Gupta N. 2011. Biodegradation of carbazole by newly isolated *Acinetobacter* spp. *Bull Environ Contam Toxicol* 87(5): 522-6.

Smith S. and Read D. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2nd Ed. London Academic Press. 605 p.

Souchie E.L., Azcón R., Barea J.M., Saggin-Junior O.J., and Silva E.M.R. 2006. Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. *Pesqui Agropecu Bras* 41: 1405–1411.

Spices Board. 2000. Vanilla status paper. Spices board, Cochin, India. pp 33.

Sujatha S. and Bath R. 2010. Response of vanilla (*Vanilla planifolia* A.) intercropped in arecanut to irrigation and nutrition in humid tropics of India. *Agr Water Manage* 97(7): 988-994.

Surendra G.K., Mathew S.K., and Nazeem P.A. 2009. Development of plant growth promoting microorganisms consortia technology for *ex vitro* establishment of micropropagated vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Kerala State Council for Science, Technology and Environment. Sasthra Bhavan, Pattom. Thiruvananthapuram 695004 Kerala, INDIA. <http://www.kauhort.in>

Tabatabai M.A. 1982. Soil enzymes, 903-947 pp. *En: Page A. L., Miller R. H., Kineey D. R. (Eds.). Methods of soil analysis, part two, chemical and microbiological properties.* ASA-SSSA, Madison, WI.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* (In Press).

Toribio J., Escalante A.N., Caballero-Mellado J., González-González A., Zavala S., Souza V., and Soberón-Chávez G. 2011. Characterization of a novel biosurfactant producing *Pseudomonas koreensis* lineage that is endemic to Cuatro Ciénegas Basin, *Syst Appl Microbiol* In press.

Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., A.I., Botina S.G., and Netrusov A.I. 2005. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. *Microbiology* 74(1): 46-53.

Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Klimova S.Y., Shestakov A.I., Botina S.G., and Netrusov A.I. 2007. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Arch Microbiol* 188(6): 655-664.

Valadares R.B. 2009. Diversidade micorrízica em *Coppensia doniana* (Orchidaceae) e filogenia de fungos micorrízicos asociados à subtribo Oncidiinae. Tesis de Maestría. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba-Brasil. pp. 98.

Vats P. and Banerjee U.C. 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme Microb Technol* 35: 3-14.

Villegas J. and Fortin J.A. 2002. Phosphorus solubilization and pH changes as a result of the interactions between soil bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on a medium containing  $\text{NO}_3^-$  as nitrogen source. *Can J Bot* 80(5): 571-576.

Wani P.A., Zaidi A., Khan A.A., and Khan M.S. 2005. Effect of phorate on phosphate solubilization and indole acetic acid (IAA) releasing potentials of rhizospheric microorganisms. *Ann Plant Prot Sci* 13: 139–144.

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

Wilkinson K.G., Sivasithamparam K., Dixon K.W., Fahy P.C., and Bradley J.K. 1994. Identification and characterisation of bacteria associated with Western Australian orchids. *Soil Biol and Biochem* 26(1): 137-142.

Williams P.A. and Kay C.M. 2008. The catabolism of aromatic compounds by *Acinetobacter*, 348 pp. *En: Gerischer U. (Ed). Acinetobacter Molecular Biology. Caister Academic Press. Germany.*

Wood P.J., 1980. Specificity in the interactions of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr Res* 85: 271–287.

Ying-Wu S., Kai L., and Chun L. 2009. Effects of endophytic fungus on sugar content and key enzymes activity in nitrogen and sugar metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Acta Agron Sin* 35(5): 946-951.

Zaidi A., Khan M.S., Ahemad M., Oves M., and Wani P.A. 2009. Recent Advances in Plant Growth Promotion by Phosphate-Solubilizing Microbes, 23-50 pp. *En: Khan M.S., Zaidi A., and Musarrat J. (Eds.). Microbial Strategies for Crop Improvement Springer-Verlag Berlin Heidelberg.*

Zhang C.X., Yang S.Y., Xu M.X., Sun J., Liu H., Liu J.R., Liu H., Kan F., Sun J., Lai R., Zhang K.Y. 2009. *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the

entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *Int J Syst Evol Microbiol* 59(7): 1603-8.

Zhang F., Dashti N., Hynes R.K., and Smith D.L. 1997. Plant growth-promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] growth and physiology at suboptimal root zone temperatures. *Ann Bot* 79: 243-249.

Zou C., Li Z., and Yu D. 2010. *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. *J Microbiol* 48(4): 460-6.



## TABLAS

**Tabla 3.1.** Composición de los medios selectivos ( $\text{g L}^{-1}$ ) utilizados para aislar microorganismos de cinco grupos funcionales, asociados a la rizosfera de plantas de vainilla.

<b>FBN</b> Dobereiner & Day (1976)		<b>PSM</b> Osorio & Habte (2001)		<b>CEL</b> Wood (1980)		<b>PRO</b> Matsumoto <i>et al.</i> (2005)		<b>FTT</b> Tabatabai (1982)	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.4	NaCl	1.0	Carboximetil celulosa	5	Caseína	10	$\text{CaCl}_2$	2
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1	Extracto de levadura	0.1	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	Solución salina 0.85%	50*	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.5	KCl	0.5
NaCl	0.1	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1.0	Agar-Agar	15	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{CaCl}_2$	0.02	Glucosa	10			Solución salina 0.85%	50*	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{FeCl}_3$	0.01	Agar-Agar	8			Agar-Agar	15	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{MoO}_4 \cdot \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.002	Roca fosfórica	3.5					Glucosa	20
Ácido málico	5							Fitato de Na	4
Azul de bromotimol	5*							Agarosa	10
Agar-Agar	15								

\*mL

**Tabla 3.2.** Identificación de bacterias asociadas a la rizosfera de plantas de vainilla, a partir de análisis por BLASTN de secuencias 16S del ADNr.

Aislamiento	Medio	Identidad en GenBank	Número Accesoión	Tamaño del Fragmento (pb)/cobertura (%)	Identidad	Valor e
77SEP29	PROT	<i>Bacillus cereus</i>	<a href="#">AB592493.1</a>	607/100	99	0.0
79SEP31	PSM	<i>Bacillus megaterium</i>	<a href="#">JN999852.1</a>	572/100	99	0.0
43MA191	PROT	<i>Bacillus cereus</i>	<a href="#">JN999893.1</a>	824/100	99	0.0
87MA197	CEL	<i>Bacillus megaterium</i>	<a href="#">JN999852.1</a>	762/100	100	0.0
95MA198	PROT	<i>Bacillus cereus</i>	<a href="#">JN999893.1</a>	622/100	100	0.0
71MA226	PROT	<i>Bacillus cereus</i>	<a href="#">JN999893.1</a>	710/100	100	0.0
55MA248	CEL	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	<a href="#">JQ435727.1</a>	783/100	100	0.0
59BMA249	CEL	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	<a href="#">AY167859.1</a>	660/100	100	0.0
174MA251	PROT	<i>Bacillus cereus</i>	<a href="#">JN999893.1</a>	713/100	99	0.0
20SEP14	FBN	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">HQ877785.1</a>	573/100	100	0.0
21SEP15	FBN	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">HQ877785.1</a>	598/100	100	0.0
22SEP16	FIT	<i>Enterobacter</i> sp.	<a href="#">JN634853.1</a>	592/100	100	0.0
23SEP17	FIT	<i>Enterobacter</i> sp.	<a href="#">AB695204.1</a>	575/100	100	0.0
25SEP18	PSM	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">JQ320089.1</a>	598/100	100	0.0
26SEP19	PSM	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	<a href="#">EF620458.1</a>	598/100	99	0.0
27SEP20	PSM	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">JQ320089.1</a>	598/100	99	0.0
31SEP22	PROT	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">JQ359108.1</a>	598/100	100	0.0
39SEP23	PSM	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">JQ320089.1</a>	598/100	100	0.0
48SEP24	PROT	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">JQ320089.1</a>	598/100	100	0.0
58SEP25	CEL	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">JQ359108.1</a>	528/100	100	0.0
69SEP26	PSM	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">JQ359108.1</a>	500/100	100	0.0
70SEP27	PROT	<i>Serratia nematodiphila</i>	<a href="#">JN934387.1</a>	596/100	100	0.0
76SEP28	PROT	<i>Acinetobacter</i> sp.	<a href="#">HM626417.1</a>	598/100	100	0.0
78SEP30	PSM	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<a href="#">JN848784.1</a>	500/100	100	0.0
89SEP34	CEL	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<a href="#">HM449690.1</a>	496/100	99	0.0
90SEP35	PSM	<i>Acinetobacter</i> sp.	<a href="#">JQ359016.1</a>	597/100	100	0.0
99SEP36	PROT	<i>Acinetobacter</i> sp.	<a href="#">JQ359016.1</a>	597/100	100	0.0
100SEP37	FBN	<i>Pseudomonas putida</i>	<a href="#">AB681332.1</a>	598/100	100	0.0
104SEP38	FBN	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<a href="#">HM449690.1</a>	496/100	99	0.0
110SEP39	FBN	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<a href="#">JF700493.1</a>	597/100	100	0.0
37MA189	PROT	<i>Flavobacterium</i> sp.	<a href="#">HQ231918.1</a>	596/100	100	0.0
40MA190	PSM	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">JQ320089.1</a>	598/100	100	0.0
72MA192	PROT	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<a href="#">JN848784.1</a>	597/100	100	0.0

<b>75MA194</b>	PROT	<i>Serratia nematodiphila</i>	<a href="#">JN934387.1</a>	597/100	100	0.0
<b>81MA195</b>	CEL	<i>Serratia nematodiphila</i>	<a href="#">JN934387.1</a>	597/100	100	0.0
<b>96MA199</b>	PROT	<i>Acidovorax</i> sp.	<a href="#">FJ599672.1</a>	593/100	100	0.0
<b>97MA200</b>	PROT	<i>Enterobacter</i> sp.	<a href="#">JN634853.1</a>	597/100	99	0.0
<b>175MA201</b>	PROT	<i>Serratia nematodiphila</i>	<a href="#">JN934387.1</a>	595/100	100	0.0
<b>33MA221</b>	FBN	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">HQ877785.1</a>	598/100	100	0.0
<b>36MA222</b>	FIT	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">JQ320089.1</a>	581/100	100	0.0
<b>46MA223</b>	FBN	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">JQ359108.1</a>	598/100	100	0.0
<b>64MA224</b>	FBN	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">JQ359108.1</a>	598/100	100	0.0
<b>68MA225</b>	PROT	<i>Pseudomonas</i> sp.	<a href="#">JQ359108.1</a>	598/100	100	0.0
<b>80MA227</b>	CEL	<i>Citrobacter</i> sp.	<a href="#">JF833761.1</a>	597/100	99	0.0

---

**Tabla 3.3.** Matriz de identidad basada en secuencias de la región 16S del ADNr de bacterias Gram positivas aisladas de la rizosfera de plantas de vainilla del Occidente de Antioquia.

MUESTRAS	43MA191	87MA197	71MA226	55MA248	59BMA249	JN159662 <i>B. cereus</i>	JN642548 <i>B. megaterium</i>	FJ527663 <i>B. subtilis</i>	FJ768457 <i>B. pumilus</i>	FJ768453 <i>B. licheniformis</i>	JN673819 <i>S. griseus</i>	JN800338 <i>Rhodococcus</i> sp.	HQ331137 <i>Curtobacterium</i> sp.
43MA191	ID	0.956	1	0.823	0.775	1	0.953	0.92	0.941	0.945	0.826	0.805	0.834
87MA197	0.956	ID	0.956	0.821	0.773	0.956	0.997	0.963	0.95	0.949	0.821	0.804	0.832
71MA226	1	0.956	ID	0.823	0.775	1	0.953	0.92	0.941	0.945	0.826	0.805	0.834
55MA248	0.823	0.821	0.823	ID	0.858	0.823	0.819	0.792	0.826	0.823	0.906	0.978	0.922
59BMA249	0.775	0.773	0.775	0.858	ID	0.775	0.771	0.752	0.772	0.767	0.85	0.864	0.931
JN159662 <i>B. cereus</i>	1	0.956	1	0.823	0.775	ID	0.953	0.92	0.941	0.945	0.826	0.805	0.834
JN642548 <i>B. megaterium</i>	0.953	0.997	0.953	0.819	0.771	0.953	ID	0.961	0.948	0.946	0.819	0.802	0.83
FJ527663 <i>B. subtilis</i>	0.920	0.963	0.920	0.792	0.752	0.92	0.961	ID	0.916	0.916	0.795	0.783	0.803
FJ768457 <i>B. pumilus</i>	0.941	0.95	0.941	0.826	0.772	0.941	0.948	0.916	ID	0.973	0.815	0.811	0.831
FJ768453 <i>B. licheniformis</i>	0.945	0.949	0.945	0.823	0.767	0.945	0.946	0.916	0.973	ID	0.816	0.808	0.826
JN673819 <i>S. griseus</i>	0.826	0.821	0.826	0.906	0.85	0.826	0.819	0.795	0.815	0.816	ID	0.888	0.913
JN800338 <i>Rhodococcus</i> sp.	0.805	0.804	0.805	0.978	0.864	0.805	0.802	0.783	0.811	0.808	0.888	ID	0.904
HQ331137 <i>Curtobacterium</i> sp.	0.834	0.832	0.834	0.922	0.931	0.834	0.83	0.803	0.831	0.826	0.913	0.904	ID

**Tabla 3.4.** Matriz de identidad basada en secuencias de la región 16S del ADNr de bacterias Gram negativas aisladas de la rizosfera de plantas de vainilla del Occidente de Antioquia.

MUESTRAS	JF766610 <i>P. putida</i>	JN679857 <i>P. fluorescens</i>	GQ406570 <i>E. cloacae</i>	JN862928 <i>Acinetobacter</i> sp.	NR043957 <i>C. aemolyticum</i>	FR691442 <i>Flavobacterium</i> sp.	JN700196 <i>A. oryzae</i>	21SEP15	22SEP16	89SEP3	90SEP35	100SEP37	37MA189	72MA192	75MA194	96MA199	80MA227	JN107746 <i>C. freundii</i>	JF937055 <i>Serratia</i> sp.	AB675600 <i>K. pneumoniae</i>	JF496406 <i>P. korensis</i>
JF766610 <i>P. putida</i>	ID	0.918	0.818	0.845	0.827	0.738	0.81	0.921	0.826	0.788	0.843	0.933	0.741	0.821	0.816	0.808	0.808	0.805	0.816	0.821	0.92
JN679857 <i>P. fluorescens</i>	0.918	ID	0.876	0.903	0.878	0.76	0.861	0.971	0.869	0.729	0.903	0.979	0.767	0.879	0.874	0.86	0.866	0.862	0.874	0.879	0.976
GQ406570 <i>E. cloacae</i>	0.818	0.876	ID	0.887	0.828	0.749	0.819	0.867	0.991	0.673	0.881	0.872	0.765	0.979	0.994	0.818	0.973	0.971	0.994	0.979	0.872
JN862928 <i>Acinetobacter</i> sp.	0.845	0.903	0.887	ID	0.848	0.769	0.818	0.899	0.881	0.694	0.971	0.901	0.775	0.894	0.886	0.815	0.881	0.876	0.886	0.894	0.903
NR043957 <i>C. aemolyticum</i>	0.827	0.878	0.828	0.848	ID	0.738	0.891	0.88	0.821	0.82	0.843	0.881	0.746	0.834	0.826	0.891	0.823	0.828	0.826	0.834	0.881
FR691442 <i>Flavobacterium</i> sp.	0.738	0.76	0.749	0.769	0.738	ID	0.741	0.775	0.747	0.608	0.76	0.774	0.963	0.749	0.747	0.743	0.74	0.742	0.747	0.749	0.772
JN700196 <i>A. oryzae</i>	0.81	0.861	0.819	0.818	0.891	0.741	ID	0.863	0.813	0.733	0.824	0.865	0.759	0.814	0.818	0.993	0.826	0.823	0.818	0.814	0.863
21SEP15	0.921	0.971	0.867	0.899	0.88	0.775	0.863	ID	0.861	0.725	0.903	0.988	0.779	0.874	0.866	0.861	0.862	0.861	0.866	0.874	0.994
22SEP16	0.826	0.869	0.991	0.881	0.821	0.747	0.813	0.861	ID	0.682	0.874	0.866	0.764	0.971	0.986	0.811	0.964	0.963	0.986	0.971	0.866
89SEP34	0.788	0.729	0.673	0.694	0.82	0.608	0.733	0.725	0.682	ID	0.687	0.727	0.616	0.68	0.672	0.735	0.673	0.678	0.672	0.68	0.727
90SEP35	0.843	0.903	0.881	0.971	0.843	0.76	0.824	0.903	0.874	0.687	ID	0.901	0.765	0.884	0.879	0.821	0.874	0.879	0.879	0.884	0.906
100SEP37	0.933	0.979	0.872	0.901	0.881	0.774	0.865	0.988	0.866	0.727	0.901	ID	0.777	0.876	0.871	0.863	0.862	0.859	0.871	0.876	0.983
37MA189	0.741	0.767	0.765	0.775	0.746	0.963	0.759	0.779	0.764	0.616	0.765	0.777	ID	0.769	0.764	0.754	0.76	0.759	0.764	0.769	0.779
72MA192	0.821	0.879	0.979	0.894	0.834	0.749	0.814	0.874	0.971	0.68	0.884	0.876	0.769	ID	0.984	0.809	0.976	0.971	0.984	1	0.879
75MA194	0.816	0.874	0.994	0.886	0.826	0.747	0.818	0.866	0.986	0.672	0.879	0.871	0.764	0.984	ID	0.816	0.974	0.973	1	0.984	0.871
96MA199	0.808	0.86	0.818	0.815	0.891	0.743	0.993	0.861	0.811	0.735	0.821	0.863	0.754	0.809	0.816	ID	0.821	0.818	0.816	0.809	0.861
80MA227	0.808	0.866	0.973	0.881	0.823	0.74	0.826	0.862	0.964	0.673	0.874	0.862	0.76	0.976	0.974	0.821	ID	0.984	0.974	0.976	0.867
JN107746 <i>C. freundii</i>	0.805	0.862	0.971	0.876	0.828	0.742	0.823	0.861	0.963	0.678	0.879	0.859	0.759	0.971	0.973	0.818	0.984	ID	0.973	0.971	0.866
JF937055 <i>Serratia</i> sp.	0.816	0.874	0.994	0.886	0.826	0.747	0.818	0.866	0.986	0.672	0.879	0.871	0.764	0.984	1	0.816	0.974	0.973	ID	0.984	0.871
AB675600 <i>K. pneumoniae</i>	0.821	0.879	0.979	0.894	0.834	0.749	0.814	0.874	0.971	0.68	0.884	0.876	0.769	1	0.984	0.809	0.976	0.971	0.984	ID	0.879
JF496406 <i>P. korensis</i>	0.92	0.976	0.872	0.903	0.881	0.772	0.863	0.994	0.866	0.727	0.906	0.983	0.779	0.879	0.871	0.861	0.867	0.866	0.871	0.879	ID

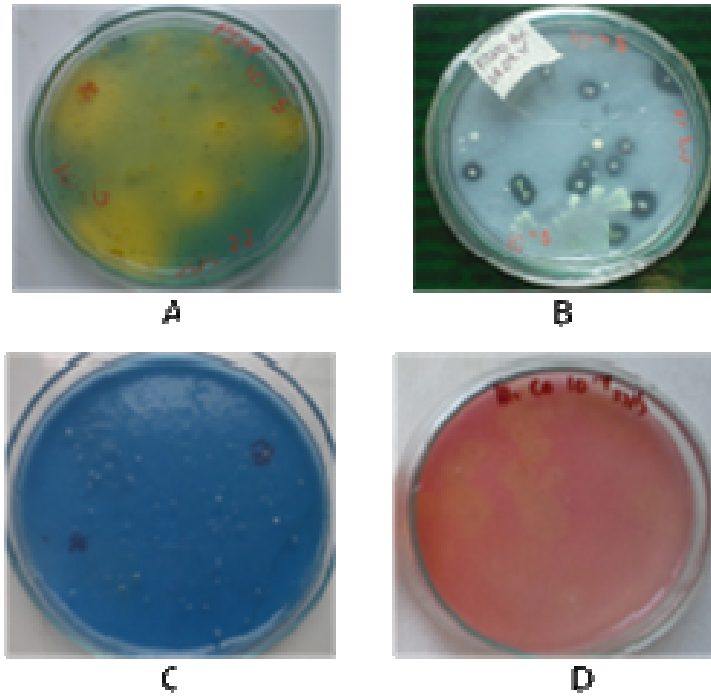
**Tabla 3.5.** Identificación de hongos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla, a partir de análisis por BLASTN de secuencias ITS del ADNr.

Aislamiento	Medio	Identidad en GenBank	Número Accesión	Tamaño del Fragmento (pb)/cobertura (%)	Identidad	Valor e
51SEP40	FIT	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	<a href="#">AB469880.1</a>	550/100	99	0.0
52SEP41	FIT	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	<a href="#">AB469880.1</a>	551/100	99	0.0
35MA158	FIT	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	<a href="#">AB469880.1</a>	545/100	99	0.0
49MA159	CEL	<i>Penicillium griseofulvum</i>	<a href="#">EU664471.1</a>	496/100	100	0.0
50MA160	CEL	<i>Bionectria ochroleuca</i>	<a href="#">EU273558.1</a>	570/100	99	0.0
108MA163	CEL	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<a href="#">HQ285569.1</a>	599/100	99	0.0
200MA165	CEL	<i>Phoma</i> sp.	<a href="#">JQ388280.1</a>	537/100	100	0.0
201MA166	PSM	<i>Fusarium</i> sp.	<a href="#">DQ657851.1</a>	551/100	100	0.0

**Tabla 3.6.** Matriz de identidad basada en secuencias de la región ITS del ADNr de hongos aislados de la rizosfera de plantas de vainilla del Occidente de Antioquia.

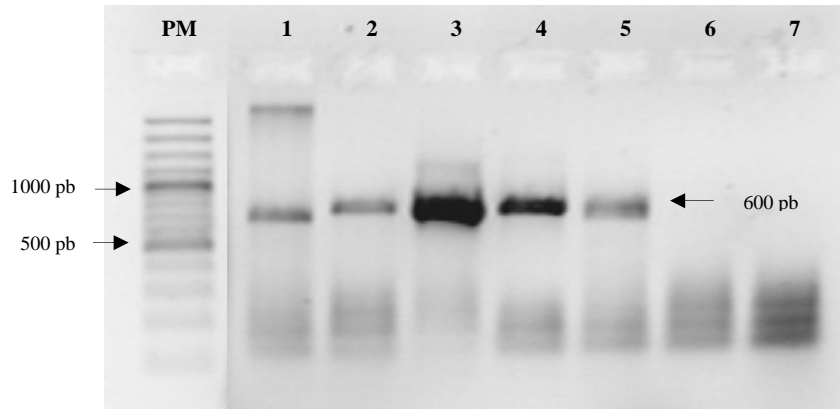
MUESTRAS	51SEP40	49MA159	50MA160	108MA163	200MA165	201MA166	HQ401273 <i>A. niger</i>	HQ630963 <i>Phoma</i> sp.	HQ248198 <i>F. oxysporum</i>	HQ148101 <i>F. solani</i>	HQ022467 <i>B. affochroleuca</i>	AB520859 <i>Plectosphaerella</i> sp.	EU664471 <i>P. griseofulvum</i>	JN153038 <i>A. fumigatus</i>
51SEP40	ID	0.478	0.653	0.565	0.492	0.66	0.546	0.492	0.66	0.607	0.622	0.9	0.498	0.556
49MA159	0.478	ID	0.511	0.728	0.437	0.525	0.694	0.437	0.505	0.471	0.474	0.55	0.871	0.73
50MA160	0.653	0.511	ID	0.614	0.502	0.79	0.6	0.502	0.751	0.737	0.922	0.61	0.54	0.603
108MA163	0.565	0.728	0.614	ID	0.509	0.622	0.904	0.509	0.602	0.573	0.577	0.539	0.779	0.987
200MA165	0.492	0.437	0.502	0.509	ID	0.512	0.497	1	0.535	0.459	0.469	0.465	0.456	0.499
201MA166	0.66	0.525	0.79	0.622	0.512	ID	0.596	0.512	0.825	0.918	0.746	0.612	0.553	0.61
HQ401273 <i>A. niger</i>	0.546	0.694	0.6	0.904	0.497	0.596	ID	0.497	0.575	0.547	0.562	0.519	0.746	0.891
HQ630963 <i>Phoma</i> sp.	0.492	0.437	0.502	0.509	1	0.512	0.497	ID	0.535	0.459	0.469	0.465	0.456	0.499
HQ248198 <i>F. oxysporum</i>	0.66	0.505	0.751	0.602	0.535	0.825	0.575	0.535	ID	0.759	0.709	0.603	0.531	0.589
HQ148101 <i>F. solani</i>	0.607	0.471	0.737	0.573	0.459	0.918	0.547	0.459	0.759	ID	0.773	0.56	0.498	0.571
HQ022467 <i>B. affochroleuca</i>	0.622	0.474	0.922	0.577	0.469	0.746	0.562	0.469	0.709	0.773	ID	0.58	0.5	0.577
AB520859 <i>Plectosphaerella</i> sp.	0.9	0.55	0.61	0.539	0.465	0.612	0.519	0.465	0.603	0.56	0.58	ID	0.539	0.539
EU664471 <i>P. griseofulvum</i>	0.498	0.871	0.54	0.779	0.456	0.553	0.746	0.456	0.531	0.498	0.5	0.539	ID	0.78
JN153038 <i>A. fumigatus</i>	0.556	0.73	0.603	0.987	0.499	0.61	0.891	0.499	0.589	0.571	0.577	0.539	0.78	ID

## FIGURAS

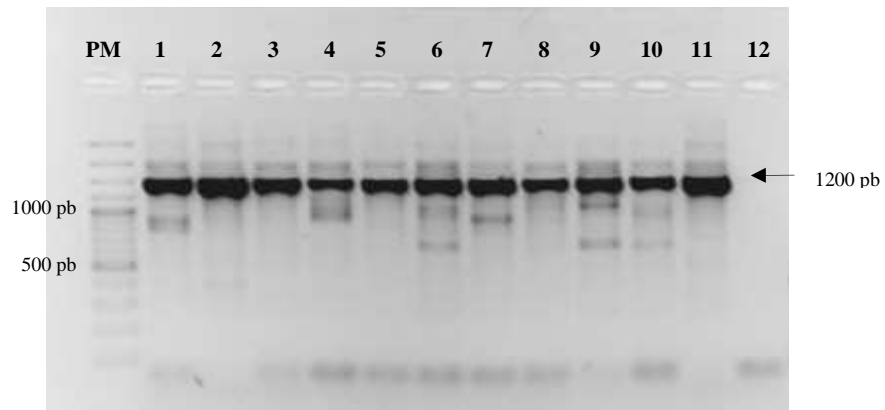


**Figura. 3.1.** Aspecto de los cultivos de microorganismos rizosféricos de vainilla creciendo y formando halos en los diferentes medios selectivos. A: PSM, cambio en pH del medio por producción de acidez. B: FIT, formación de halos translúcidos por producción de fitasas. C: FBN, crecimiento de colonias en medio libre de nitrógeno. D: CEL, formación de halos por revelado con rojo congo por producción de celulasas.

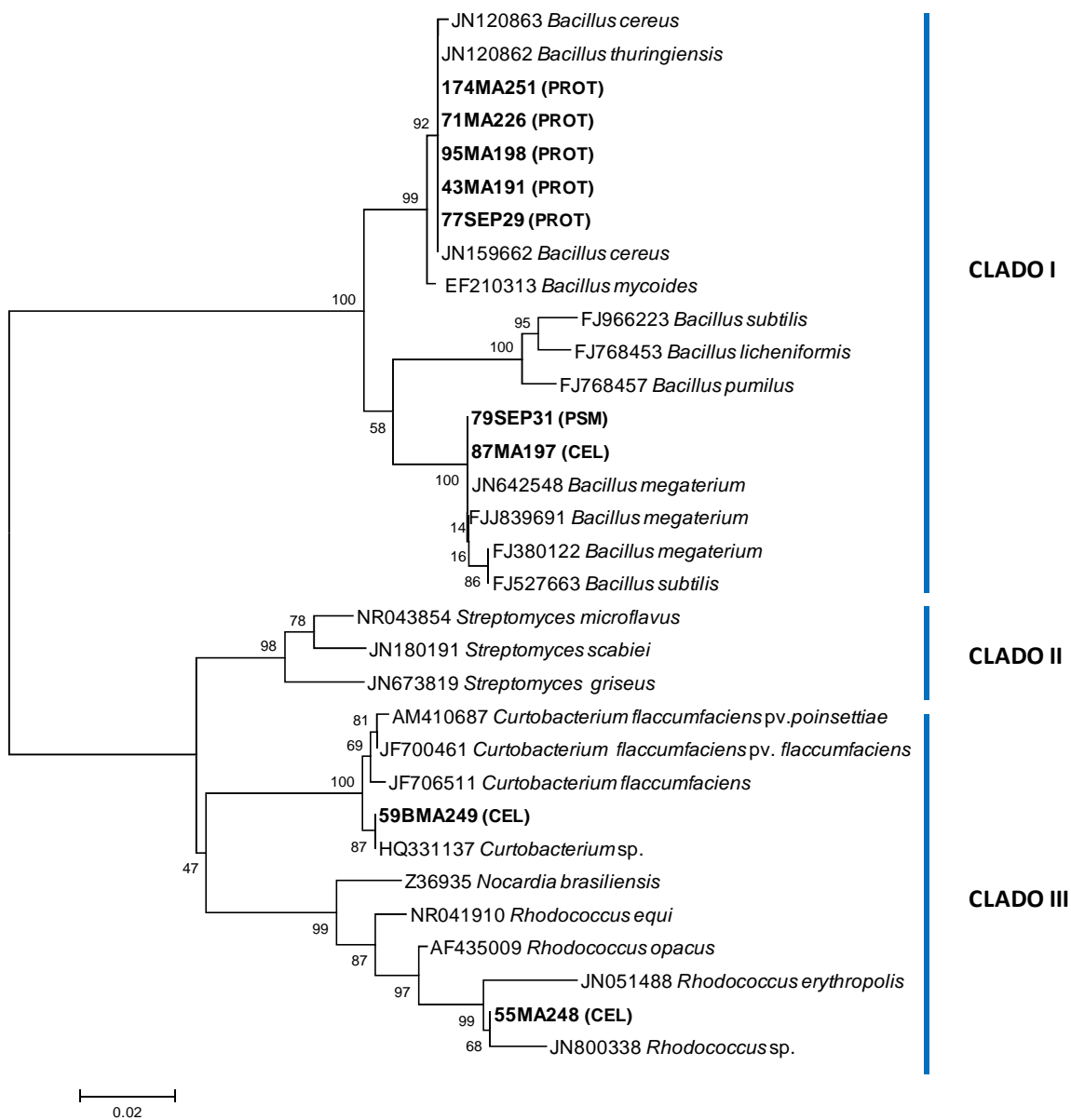




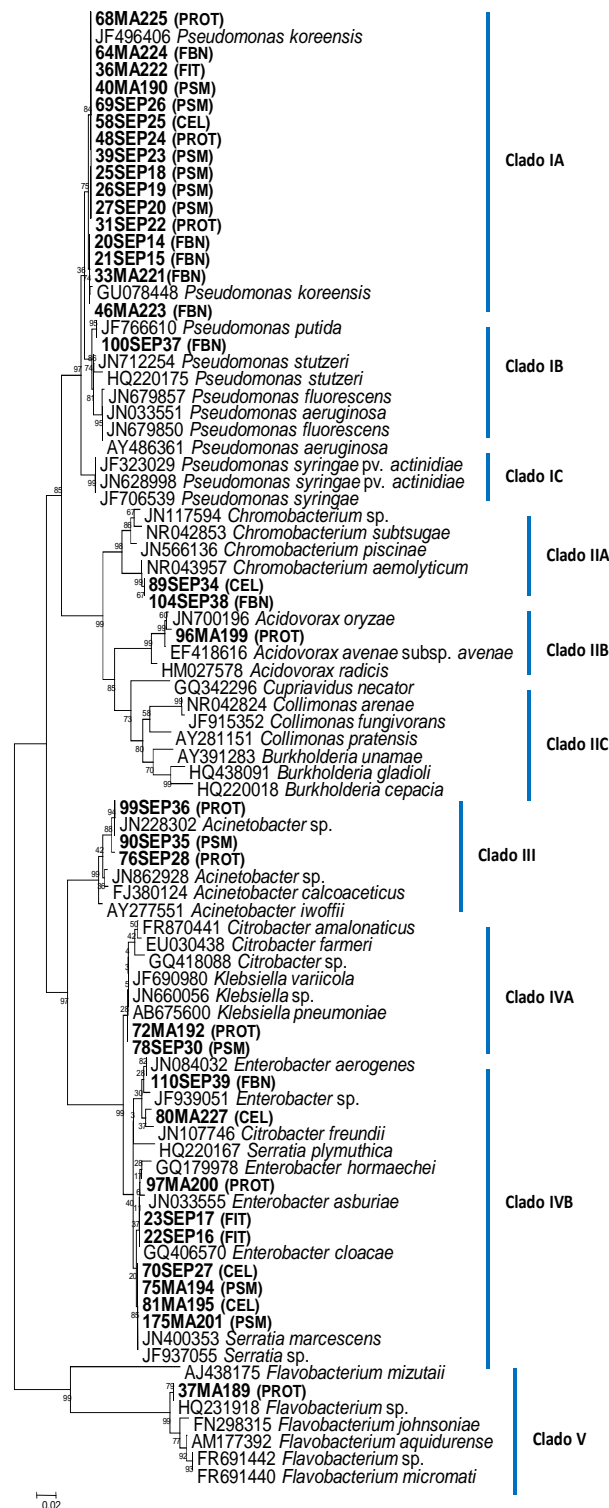
**Figura 3.2.a.** Amplicones obtenidos con los cebadores ITS1/ITS4 (600 pb) a partir de ADN de hongos aislados de la rizosfera de plantas de vainilla. Carriles 1 a 5: muestras 51SEP40, 52SEP41, 49MA159, 50MA160 y 108MA163. Carriles 6 y 7: controles negativos.



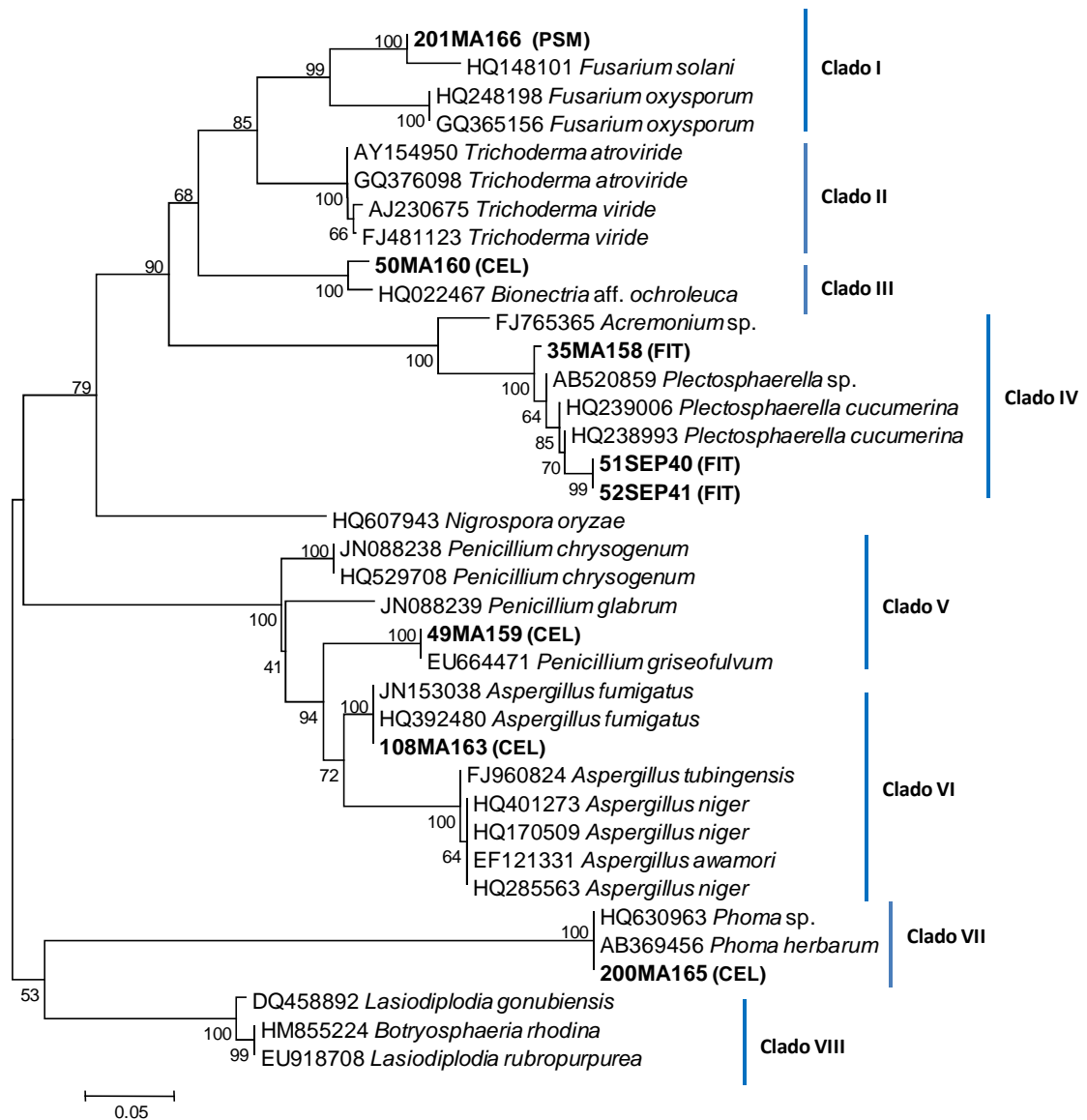
**Figura 3.2.b.** Amplicones obtenidos con los cebadores pA/pc5B (1200 pb) a partir de ADN de bacterias aisladas de la rizosfera de plantas de vainilla. Carriles 1 a 11: muestras de diferentes bacterias evaluadas en este estudio. Carril 12: Control negativo.



**Figura 3.3.** Árbol filogenético basado en secuencias de la región 16S del ADNr de bacterias Gram positivas provenientes de la rizosfera de plantas de vainilla del Occidente de Antioquia. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap. Las bacterias obtenidas en este estudio se presentan en negrita, indicándose el medio a partir del cual se obtuvieron.



**Figura 3.4.** Árbol filogenético basado en secuencias de la región 16S del ADNr de bacterias Gram negativas provenientes de la rizosfera de plantas de vainilla del Occidente de Antioquia. Los números bajo las ramas indican los valores de bootstrap. Las bacterias obtenidas en este estudio se presentan en negrita, indicándose el medio a partir del cual se obtuvieron.



**Figura 3.5.** Árbol filogenético basado en secuencias de la región ITS del ADNr de hongos provenientes de la rizosfera de plantas de vainilla del Occidente de Antioquia. Los números en las ramas indican los valores de bootstrap. Los hongos obtenidos en este estudio se presentan en negrita, indicándose el medio a partir del cual se obtuvieron.

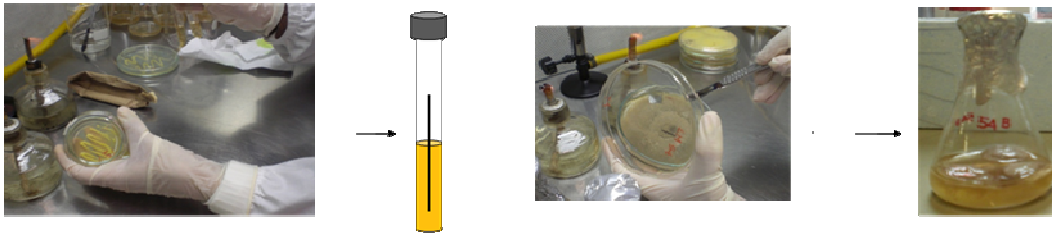
### 3.1 ANEXOS – CAPITULO 3

#### Anexo 3.1. Extracción de ADN de bacterias - método SDS

1. Cultivar la bacteria en medio sólido Agar Nutritivo (o en el medio en el que se suele cultivar) durante 24-48 h.
2. Tomar una lupada bacterial del medio y resuspenderla en 100  $\mu$ L de agua ultrapura estéril, realizar un vortéx a máxima velocidad durante 2 minutos.
3. Si se parte de bacteria creciendo en medio líquido, realizar una centrifugación previa en tubos eppendorf de 1.8 mL a 3000 rpm por 3 min. Eliminar el sobrenadante y continuar en el paso 4.
4. Centrifugar durante 4 min a 11000 rpm.
5. Descartar el sobrenadante y agregar al pellet bacteriano\* 500  $\mu$ L de buffer de extracción (NaCl 10 mM, EDTA 25 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8.0) + 100  $\mu$ L de SDS (20%).
6. \*Para bacterias Gram<sup>+</sup> adicionar previo al buffer de extracción, 50  $\mu$ L de solución de lisozima (10 mg/mL) e incubar a 37°C por 30 min.
7. Realizar vortéx a máxima velocidad e incubar en baño María a 37°C durante 1 h.
8. Adicionar 1 vol de fenol-cloroformo y realizar vortex. Centrifugar durante 10 min a 13000 rpm.
9. Tomar el sobrenadante y pasarlo a un nuevo tubo. Adicionar 300  $\mu$ L de cloroformo y centrifugar durante 5 min a 13000 rpm.

10. Tomar nuevamente el sobrenadante y pasarlo a un nuevo tubo. Adicionar 0.6 vol de isopropanol + 0.1 vol de acetato de sodio 3 M.
11. Incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1h, posteriormente centrifugar durante 10 min a 13000 rpm.
12. Descartar el sobrenadante y agregar al pellet 400  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% preenfriado y agitar por inversión. Centrifugar durante 5 min a 13000 rpm.
13. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 50  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura estéril. Adicionar 3  $\mu\text{L}$  de RNasa e incubar en baño María a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una noche.
14. Almacenar el DNA a  $4^{\circ}\text{C}$ .

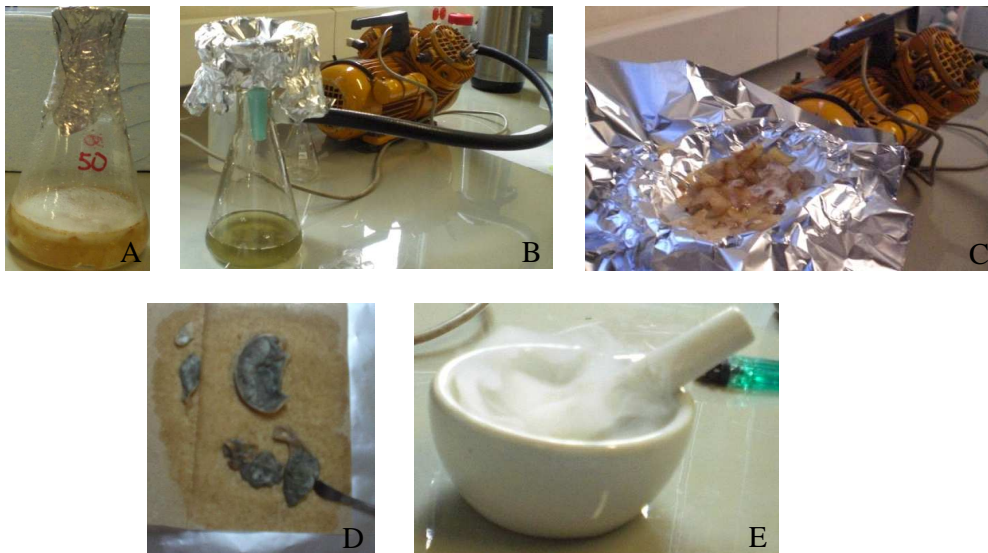
**Anexo 3.2.a.** Multiplicación de microorganismos para la extracción posterior de su ADN.



Bacterias puras multiplicadas en medio LB

Hongos multiplicados en extracto de malta

**Anexo 3.2.b.** Proceso de extracción de micelio de hongos con bomba de vacío y maceración con nitrógeno líquido. A. Multiplicación de micelio en extracto de malta. B. Extracción de micelio con bomba de vacío. C. Filtrado para extracción de micelio. D. Secado de micelio. E. Maceración con nitrógeno líquido.



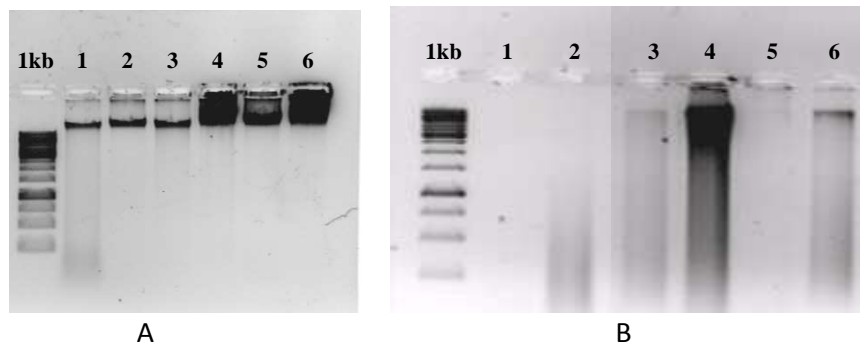
### **Anexo 3.3.** Extracción de ADN de hongos – método CTAB

La extracción de ADN se realiza siguiendo el procedimiento del CTAB, fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol-acetato de sodio.

1. Se parte del micelio previamente macerado y ubicado en tubos eppendorf de 1.5 mL.
2. Adicionar 400  $\mu$ L de buffer CTAB 2X (CTAB 2% p/v), 100 mM Tris HCL (pH 8.0), 1.4 M de NaCl, 20 mM de EDTA (pH 8.0), suplementado con 150  $\mu$ L de SDS 20%. Aplicar un vortéx leve.
3. Incubar tubos eppendorf con el CTAB 2X y el SDS 20% a 65°C por 30 min.
4. Agregar 1 vol de fenol-cloroformo (1:1) y se mezclan por inversión durante 10 min.
5. Centrifugar a 13000 rpm por 15 min (este procedimiento de separación de proteínas, se repite dependiendo del grado de pureza del sobrenadante).
6. Tomar el sobrenadante generado, se transfiere a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL y se agrega 1 vol de isopropanol frío y 0.1 vol de acetato de sodio 3 M, para precipitar por centrifugación a 13000 rpm por 30 min.
7. El pellet generado es lavado con 400  $\mu$ L de etanol al 70%, se centrifuga a 13000 rpm por 5 min, se descarta el sobrenadante y el pellet es resuspendido en 50-100  $\mu$ L (dependiendo de la cantidad de pellet) de agua destilada estéril.
8. Se adicionan 3  $\mu$ L de RNAasa (100 mg/mL), se incuba a 37°C por 12 horas.



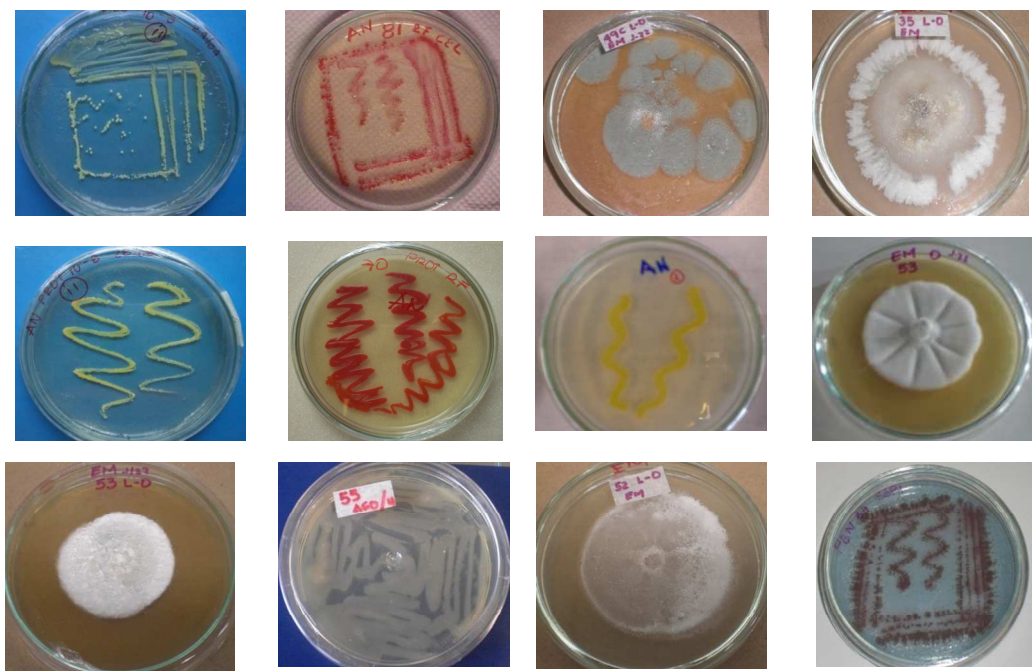
**Anexo 3.4.** Gel de agarosa resultado de la extracción de ADN de (A): bacterias. Carriles 1 a 6: muestras 77SEP29, 40MA190, 20SEP14, 75MA194, 33MA221 y 71MA226 y (B): hongos. Carriles 2 a 6: muestras 51SEP40, 52SEP41, 49MA159, 50MA160 y 108MA163. Marcador de peso: 1 Kb



**Anexo 3.5.** Purificación de productos de PCR con el protocolo *Qiaquick PCR Purification Kit*

1. Adicionar 5 vol de Buffer PB a 1 vol de muestra de PCR, mezclar.
2. Ubicar la columna QIAquick spin en el tubo de colección.
3. Aplicar la muestra a la columna QIAquick spin y centrifugar a 13000 rpm por 30-60 segundos.
4. Descartar el fluido que queda en el tubo de colección, y volver a colocar la columna QIAquick spin en ese mismo tubo.
5. Para lavar, adicionar 0.75 mL de Buffer PE a la columna QIAquick spin y centrifugar a 13000 rpm por 30-60 segundos.
6. Descartar el fluido que queda en el tubo de colección, ubicar nuevamente la columna QIAquick spin en el mismo tubo, y centrifugar por 1 minuto adicional.
7. Ubicar la columna QIAquick spin en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL.
8. Para eluir el ADN, adicionar 20  $\mu$ L de agua destilada estéril sobre el centro de la columna, centrifugar a 13000 rpm por 1 min.
9. Repetir el paso 8.

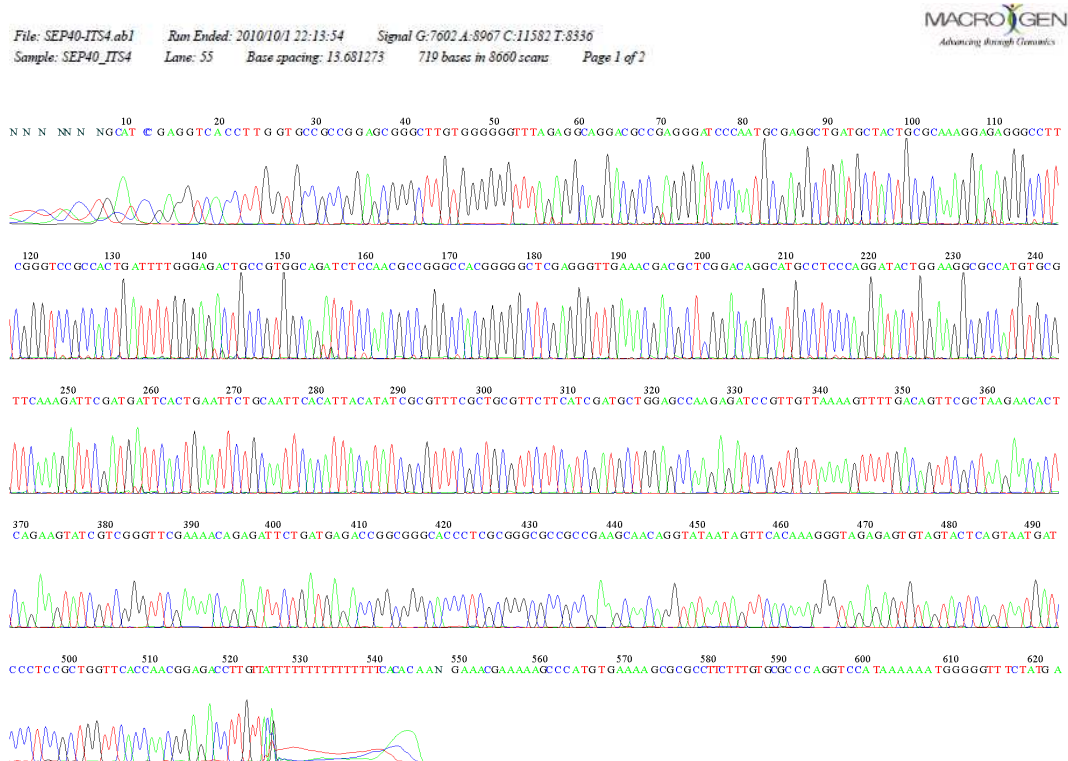
**Anexo 3.6.** Morfología de algunas de las colonias de hongos y bacterias aisladas de la rizosfera de plantas de vainilla.



**Anexo 3.7.** Electroferograma de la región 16S del ADN ribosomal de *Pseudomonas* sp. con el cebador pc5B.



**Anexo 3.8.** Electroferograma de la región ITS del ADN ribosomal de *Plectosphaerella cucumerina* con el cebador ITS4.



## CAPITULO 4

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA *IN VITRO* DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE VAINILLA CON USO POTENCIAL COMO BIOFERTILIZANTES<sup>2</sup>

#### RESUMEN

El cultivo de la vainilla (*Vanilla planifolia*) es altamente promisorio en Colombia, sin embargo, poco se conoce acerca de su manejo, específicamente en lo relacionado con los aspectos nutricionales y mucho menos con el uso de microorganismos benéficos con potencial para ser utilizados como biofertilizantes. En este estudio se realizaron evaluaciones de microorganismos previamente aislados de la rizosfera de plantas de vainilla, clasificándose en los siguientes grupos funcionales a partir de pruebas *in vitro*: celulolíticos (CEL), proteolíticos (PROT), fijadores de nitrógeno atmosférico (FBN) y solubilizadores de fosfato orgánico (FIT) e inorgánico (PSM). Los resultados indicaron que los solubilizadores de fosfato inorgánico más efectivos correspondieron a dos bacterias, una filogenéticamente relacionada con el género *Serratia* y la otra identificada como *Pseudomonas koreensis*; mientras que entre los solubilizadores de fosfato orgánico se encontró como el más eficiente, un hongo de la especie *Plectosphaerella cucumerina*. Por otra parte, los microorganismos celulolíticos más eficientes fueron los hongos *Penicillium griseofulvum* y *Aspergillus fumigatus* y los que se destacaron por su alta actividad como proteolíticos/amonificantes fueron identificados como bacterias del complejo *Bacillus cereus* y *Serratia* sp. Finalmente, entre los microorganismos fijadores asimbióticos de nitrógeno sobresalieron tres cepas de *Pseudomonas koreensis*, que crecieron rápida y abundantemente en el medio selectivo, siendo además confirmada la presencia del gen *nifH*, responsable de esta actividad metabólica.

**Palabras clave:** celulolíticos, proteolíticos, solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno.

---

<sup>2</sup> Apartes de este capítulo han sido utilizados para la elaboración de un artículo: Álvarez C., Marín M., Díez M.C y Osorio N.W. 2012. Molecular identification of microorganisms associated to the rhizosphere of vanilla and their potential use as biofertilizers. Acta Horticulturae (ISSN 0567-7572) (en prensa).

## ABSTRACT

The cultivation of vanilla (*Vanilla planifolia*) is highly promising in Colombia; however, little is known about the management of the crop, specifically in regard to its nutrition, and even less is known about the effects of beneficial rhizosphere microorganisms, which have the potential to serve as biofertilizers. This study concerned the *in vitro* evaluation of these microorganisms as functional groups to determine their potential use as biofertilizers. The results indicated that the most effective inorganic-phosphate solubilizers (PSM) corresponded to two bacteria, one of which is phylogenetically related to the genus *Serratia* and the other to the genus *Pseudomonas koreensis*. The most efficient organic-phosphate solubilizer (FIT) was a fungus phylogenetically related to *Plectosphaerella cucumerina*. The most effective cellulolytic microorganisms (CEL), meanwhile, were *Penicillium griseofulvum* and *Aspergillus fumigatus*. Those significant for their activity as proteolytic/amonifyers were identified as bacteria belonging to the *Bacillus cereus* complex and *Serratia* sp. Finally, among the asymbiotic N<sub>2</sub>-fixers (FBN), there were three isolates belonging to *Pseudomonas koreensis* that stood out as being abundant and fast-growing in the selective medium; moreover, it was confirmed that the gen *nifH* was present in these isolates and was responsible for this activity.

**Keywords:** cellulolytic, proteolytic/amonifyers, phosphate solubilizers, asymbiotic N<sub>2</sub>-fixers.

## INTRODUCCIÓN

La vainilla (*V. planifolia*) es una orquídea tropical altamente promisorio para ser cultivada en Colombia debido a las condiciones agroecológicas favorables y al alto precio internacional que alcanzan sus frutos curados, como fuente de vainillina (Spices Board, 2000). Sin embargo, a pesar de la presencia de poblaciones nativas de vainilla en diferentes partes de Colombia (Misas, 2005; Ledezma *et al.*, 2006), el área cultivada comercialmente con esta planta es muy pequeña y los rendimientos son bajos comparados con otros países (Patiño, 2002), como resultado de las bajas floraciones y del desconocimiento de su manejo agronómico en el país (Soto-Arenas, 2006).

Dado que la nutrición de la vainilla es uno de los aspectos más críticos para la producción comercial de estas plantas (McGregor, 2005) y a que el desarrollo radical ocurre a partir de la descomposición microbial de la materia orgánica (Hernández, 2011), se considera que los microorganismos asociados a la raíz pueden jugar un papel importante en el suministro de nutrientes para las plantas (Andrade, 1999; Vessey, 2003). Desafortunadamente, en nuestro medio poco se conoce sobre los microorganismos que habitan la rizosfera de la vainilla y de las funciones específicas que ellos pueden cumplir en la disponibilidad de nutrientes (Anilkumar, 2004; Nybe *et al.*, 2009; Murthy *et al.*, 2010).

El manejo biológico de la nutrición vegetal es muy apreciado por los potenciales consumidores internacionales de vainilla y podría generar un valor agregado adicional para la producción de vainilla en Colombia. En otras partes del mundo, esta aproximación se ha utilizado y se han encontrado resultados interesantes que han llevado a recomendar que en plantaciones de vainilla los sustratos orgánicos se inoculen con *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum* sp. y diferentes bacterias solubilizadoras de fósforo para promover el crecimiento de las plantas (Anilkumar, 2004).

Surendra *et al.* (2009), encontraron que el consorcio de especies de *Azotobacter* y de diferentes *Pseudomonas* fluorescentes ha sido sobresaliente como promotores del crecimiento y establecimiento de plantas de vainilla micropropagadas. Lo anterior es muy interesante ya que es posible encontrar estos y otros microorganismos en la rizosfera de vainilla o de orquídeas tropicales. Por ejemplo, Wilkinson *et al.* (1994) encontraron que los géneros de bacterias más abundantes asociados a la rizosfera de diferentes especies de orquídeas fueron *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Kurthia* y *Arthrobacter* y en menor cantidad diferentes miembros de la familia Enterobacteriaceae.

Tsavkelova *et al.* (2007) reportan la presencia de *Burkholderia*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* como microorganismos productores de auxinas que promueven la formación y el crecimiento de raíces de orquídeas tropicales. Así mismo, Suseela y Kumar (2008) encontraron que *Pseudomonas fluorescens* fue uno de los microorganismos más efectivos como promotores de crecimiento de plantas de vainilla.



Adicionalmente, algunos de estos microorganismos también pueden ejercer control biológico de enfermedades en el cultivo de vainilla, entre ellos se destacan *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, *Rhizoctonia* sp. y *Paecilomyces* sp. (He, 2007; Naik *et al.*, 2009; Suseela *et al.*, 2009).

Los anteriores estudios sugieren que existe una alta probabilidad de encontrar microorganismos en la rizosfera de vainilla que puedan promover la nutrición, el crecimiento y la sanidad vegetal. Este estudio se planteó con el objetivo de evaluar la actividad *in vitro* de microorganismos rizosféricos de plántulas de vainilla, en procesos de transformación de nutrientes tales como amonificación, solubilización de fosfatos orgánicos e inorgánicos, degradación de celulosa y fijación biológica de nitrógeno, realizándose una confirmación fenotípica de la identidad de aquellos que resultaron más eficientes en las diferentes pruebas realizadas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Microorganismos**

Este estudio se realizó a partir de los aislamientos obtenidos en un trabajo previo de identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera de las plantas de vainilla (Álvarez *et al.*, 2012). Para esto se seleccionaron 11 aislados de solubilizadores de fosfato inorgánico y cuatro solubilizadores de fosfato orgánico (PSM y FIT, respectivamente), ocho aislados degradadores de celulosa (CEL), 13 proteolíticos/amonificantes (PROT) y 3 bacterias asimbióticas fijadoras de nitrógeno atmosférico (FBN) (Tabla 4.1). Los medios en los que se realizaron los aislamientos para cada grupo funcional se presentan en la tabla 4.2. Estos microorganismos se mantuvieron en nevera a 4°C para su posterior multiplicación y utilización en diferentes experimentos bajo condiciones *in vitro*. Los hongos se mantuvieron en medios PDA y extracto de malta y las bacterias en agar nutritivo.

## **Pruebas bioquímicas de eficacia *in vitro***

### **Solubilización de fosfato inorgánico**

Los microorganismos con capacidad para solubilizar fosfato inorgánico se evaluaron mediante el método desarrollado por Osorio y Habte (2001) libre de agar (Tabla 4.2). La fuente de P que se utilizó fue roca fosfórica del Huila tamizada a 0.5 mm. Este material es bastante insoluble, su contenido de P es de 12%, su composición es  $\text{Ca}_{9.69}\text{Na}_{0.22}\text{Mg}_{0.09}(\text{PO}_4)_{5.14}(\text{CO}_3)_{0.86}\text{F}_{2.34}$  (Chien y Hammond, 1978).

De cada uno de los 11 aislamientos previamente identificados como PSM (Tabla 4.1) se tomaron fragmentos de 0.5 cm de diámetro del medio de cultivo con colonias microbiales. Estos se transfirieron asépticamente a Erlenmeyers de 250 mL que contenían 75 mL del medio selectivo para PSM. Se incluyó un control no inoculado. Los Erlenmeyers se incubaron a 28°C durante cinco días, en un agitador orbital a 150 rpm. Al final del periodo de incubación, una alícuota de 30 mL se centrifugó a 2000 rpm por 10 min y luego se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa cuya apertura de poro es de 0.22  $\mu\text{m}$ . En los filtrados se determinó el pH con un electrodo selectivo y se midió la concentración de fósforo en solución mediante el método de azul de fosfomolibdato (Murphy y Rilley, 1962).

### **Solubilización de fosfato orgánico**

Para evaluar la actividad de los microorganismos productores de *fitasas* se utilizó el medio (50 mL) de Tabatabai (1982) (Tabla 4.2), libre de agarosa. El fitato de sodio (myo-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakisfosfato de sodio;  $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$  con 28.2 % P) fue la única fuente de P. El medio se inoculó individualmente con cuatro aislados microbiales obtenidos de la rizosfera de vainilla de la misma forma mencionada con los PSM y se incluyó un control no-inoculado. Adicionalmente, se probó como referencia el hongo *Mortierella* sp. conocido por su capacidad para solubilizar P orgánico (Ocampo *et al.*, 2012). Luego de una agitación constante a 150 rpm a 30°C por 7 días, se determinó la concentración de fósforo en el medio con el método de azul de fosfomolibdato (Murphy y Rilley, 1962).

## **Degradación microbiana de celulosa**

La actividad enzimática de los microorganismos degradadores de celulosa se cuantificó mediante una prueba de respirometría en cámara estática, herméticamente cerrada (Tate *et al.*, 1993). La cámara tenía una capacidad de 300 mL y en su interior se dispuso una caja de petri (5 cm de diámetro) que contenía 6 mL del medio selectivo para celulolíticos (Wood, 1980) (Tabla 4.2). Cada caja de Petri se inoculó asépticamente por triplicado con cada uno de los ocho aislamientos, como se indicó anteriormente, con fragmentos de 0.5 cm de diámetro de colonias fungosas tomadas desde su medio de crecimiento (extracto de malta). Los microorganismos se incubaron por cuatro días en la oscuridad, a temperatura ambiente.

En el caso de las bacterias, se inoculó la caja mediante una siembra con asa metálica estéril. Se incluyó un control no inoculado para efectos de comparación. El aspecto de las cámaras y su contenido se puede observar en la figura 4.1. En la cámara estática se incluyó un beaker con 20 mL de una solución de NaOH 0.01 M, que actuó como trampa para el CO<sub>2</sub> producido (Hopkins, 2007), el cual fue calculado estequiométricamente luego de hacer una titulación con HCl 0.1 M.

## **Capacidad microbial para producción de amonio**

En el caso de los microorganismos con actividad proteolítica/amonificante, cada aislado fue asépticamente transferido a un Erlenmeyer con 250 mL de capacidad que contenía 75 mL de medio selectivo para proteolíticos, sin agar, desarrollado por Wood (1980) (Tabla 4.2). La única fuente de nitrógeno fue la caseína (Merck 1022450500). La inoculación se realizó como se mencionó anteriormente. Se inocularon individualmente 13 aislamientos por triplicado bajo condiciones asépticas. Los medios de cultivo se incubaron a temperatura ambiente por ocho días y se dejaron en agitación constante a 150 rpm.

Luego del periodo de incubación, alícuotas del medio se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min y el sobrenadante se filtró con membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm de apertura de poro. En los filtrados se midió la concentración de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) como una medida de la capacidad para realizar la amonificación. La concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se

midió en el laboratorio de biogeoquímica de la Universidad Nacional de Colombia, mediante un electrodo selectivo (Thermo Scientific) acoplado a un potenciómetro (Hanna pH-211 Massachusetts, USA) previa adición de ISA (*Ion Strong Adjuster*, NaOH 10 M) para aumentar la fuerza iónica de la solución. Así los iones se concentran y se hace más fácil y rápida la medición. Por cada 50 mL de filtrado se adicionó 1 mL de ISA (Serie Agronomy).

### **Análisis estadístico**

Cada prueba, por grupo funcional, consistió en un experimento separado organizado con un diseño completamente al azar. Los tratamientos consistieron en la inoculación individual en cada medio con los microorganismos seleccionados; se incluyeron controles no inoculados en cada caso. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones. Las diferencias en las actividades de los microorganismos se analizaron a través de ANOVA (prueba F) y de pruebas de separación de medias (Prueba de Duncan, t-test). En ambos casos se utilizó un nivel de significancia ( $P \leq 0.05$ ). Los análisis se realizaron con el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XV.

### **Capacidad microbiana para fijar nitrógeno**

De los aislamientos bacteriales obtenidos que crecieron en el medio de FBN (Döbereiner y Day, 1976) (Tabla 4.2) durante 36 horas, se seleccionaron tres aislamientos (Tabla 4.1) que presentaron rápido crecimiento y capacidad para sobrevivir a los sucesivos repiques en los medios de cultivo. En este caso no se cuantificó la capacidad fijadora de  $N_2$ , sino que se determinó la presencia del gen *nifH* que codifica para la enzima nitrogenasa responsable de la fijación de  $N_2$ , en los tres aislamientos, utilizando los cebadores Rosch *nifHF* (AAA GGY GGW ATC GGY AAR TCC ACC AC) y *nifHRb* (TGS GCY TTG TCY TCR CGG ATB GGC AT). Se seleccionó el gen *nifH* debido a que es altamente conservado entre bacterias fijadoras de  $N_2$  (Rösch y Bothe, 2005).

## Caracterización bioquímica y morfológica de los aislamientos

A los microorganismos que arrojaron los mejores resultados en cada prueba *in vitro*, se les realizó una caracterización morfológica (hongos) y bioquímica (bacterias), con el fin de confirmar la identidad taxonómica inferida mediante las pruebas moleculares (Álvarez *et al.*, 2012).

Para el caso de los hongos, se realizó una caracterización morfológica de las estructuras microscópicas de los aislamientos, a partir de su siembra en dos medios, extracto de malta y papa dextrosa agar (PDA), e incubación bajo tres ambientes (luz continua, oscuridad continua y alternancia de luz-oscuridad) y con seguimiento durante tres meses, con el fin de evaluar la presencia de estructuras de resistencia. Los caracteres evaluados incluyeron el micelio, cuerpos fructíferos, forma, color y ornamentación de las esporas, presencia de estructuras estériles y características de conidióforos, entre otros aspectos. Con esta información se realizaron comparaciones con las monografías taxonómicas de hongos y oomycetes y con la base de datos del Mycobank (<http://www.mycobank.org/>).

En las bacterias, la caracterización incluyó la realización de tinciones de Gram, la descripción de las colonias (borde, tamaño, consistencia, color) y la aplicación de una serie bioquímica tendiente a evaluar la presencia de las siguientes enzimas: *nitrato reductasa* (medio Nitrato), *lisina descaboxilasa* (medio Lisina-hierro), *tiosulfato reductasa*, *glucasa*,  *$\beta$ -galactosidasa*, *sacarasa* (medio Triple Azúcar Hierro - TSI), *citrate reductasa* (medio Citrato Simmon's), *ureasa* (medio Urea), *triptofanasa oxidasa* y movilidad (medio SIM), *catalasa* (Prueba del Peróxido de hidrógeno) y *citocromo oxidasa* (tirillas de Oxidasa) (Cappuccino y Sherman, 1998).

Adicionalmente, para evaluar la especie asociada al complejo *Bacillus cereus*, se sembraron las colonias presuntivas en el agar Mossel (Yema de huevo - Rojo fenol - Manitol) para determinar la presencia de lecitinasa y la fermentación del manitol, así como también en el Agar sangre para determinar el tipo de hemólisis que produce.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos en las series bioquímicas y moleculares, se seleccionó uno de los aislamientos de *P. koreensis*, para ser evaluado con el kit API

20NE (Biomérieux, Francia). Para esta prueba, el aislamiento fue incubado a 37°C por 24h, para proceder a su lectura según los códigos de color generados y se interpretó con el software del fabricante.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Solubilización de fosfato inorgánico**

Las pruebas *in vitro* permitieron detectar los microorganismos que tienen un alto potencial para ser usados como biofertilizantes. Tal como se esperaba, la disolución microbial de fosfato inorgánico estuvo asociada con la producción de acidez (Figura 4.2) (Chen *et al.*, 2006). Este mecanismo consiste en la producción de ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido oxálico, ácido glucónico, entre otros), los cuales atacan la estructura de la roca fosfórica y liberan iones fosfato que pueden llegar a estar disponibles para los microorganismos o para ser absorbidos por las raíces de las plantas (Illmer y Schinner, 1992; Osorio, 2011). Kim *et al.* (1988) y Hwangbo *et al.* (2003) aislaron *Enterobacter* sp. de la rizosfera de diferentes plantas y encontraron que es altamente eficiente para solubilizar fosfato insoluble.

Se destacaron dos aislados bacteriales (75MA194 y 40MA190) por su capacidad para reducir el pH de la solución. El aislado 75MA194, relacionado filogenéticamente con *Serratia* sp. fue el más eficaz para disminuir el pH del medio desde un valor inicial de 7.9 a un pH de 4.3, y así generó la más alta concentración de P en solución (P: 9.2 mg/L) (Figura 4.2). Éste fue seguido por el aislamiento 40MA190, una bacteria identificada como miembro de la especie *Pseudomonas koreensis*, que indujo una disminución del pH a 4.5 y una concentración de P de 5.4 mg/L (Figura 4.2). Aunque otros aislados microbiales redujeron el pH de la solución por debajo del valor del control (pH 7.9), fueron inefectivos en disolver la roca fosfórica, por lo tanto no fueron capaces de incrementar significativamente la concentración de P en la solución (Figura 4.2).

En general, se ha detectado que en los sustratos comúnmente usados (fibra de coco, chips de madera, corteza de árboles, hojarasca) para el establecimiento de cultivos de vainilla, el contenido de P es muy bajo ( $\leq 0.11\%$ ) y esto puede ser un limitante para la

nutrición y el crecimiento de estas plantas (Osorio, 2012). Se esperaría que la hojarasca tuviera niveles más altos de P; aunque es ampliamente reconocido que, antes de caer, el P que se encuentra en las hojas, es translocado a los tejidos más jóvenes de la planta (León, 2007).

Una alternativa para mejorar la nutrición fosfórica de la vainilla es la aplicación de fertilizantes fosfóricos de alta solubilidad, pero se corre el riesgo de perder buena parte por lixiviación. Por otro lado, estos fertilizantes son costosos y su uso en agricultura orgánica, como la desarrollada para el cultivo de vainilla, no es permitida. Otra alternativa es la aplicación de la roca fosfórica; este material es más económico, de origen natural y se puede utilizar en agricultura orgánica, desafortunadamente es poco soluble. Los PSM tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos que disuelven la roca fosfórica y así tener un impacto favorable como biofertilizantes. Se resalta el potencial que tienen los PSM encontrados en este estudio, por cuanto existen múltiples reportes de la capacidad de diferentes especies de *Serratia* y *Pseudomonas*, como efectivos PSM (Chen *et al.*, 2006; Hameeda *et al.*, 2008; Aditya *et al.*, 2009; Farhat *et al.*, 2009). Adicionalmente a estos microorganismos, recientemente en Colombia, Osorio (2012) reportó que la bacteria *Variovorax* sp. aislada en la rizosfera de vainilla, tiene una alta capacidad para solubilizar fosfato inorgánico; mientras que Bernal (2009) encontró dos hongos rizosféricos (*Penicillium* sp. y *Fusarium* sp.) con potencial como solubilizadores de fosfato.

Los resultados de la prueba *in vitro* sugieren que estos microorganismos son efectivos para solubilizar roca fosfórica. La ausencia de arcillas o de óxidos, que retienen fosfato en formas no disponibles para las plantas, en el sustrato de crecimiento de las raíces permite plantear, que dichos microorganismos pueden generar suficiente P soluble para las plantas, que pudiera permanecer en forma disponible hasta que sea absorbido por ellas.

### **Solubilización de fosfato orgánico**

Los resultados indican que hubo diferencias significativas en la concentración de P en función de la inoculación con los diferentes hongos evaluados (Figura 4.3). Los microorganismos que fueron más efectivos para incrementar la concentración de P en la

solución fueron aquellos identificados con los códigos 52SEP41 (*Plectosphaerella cucumerina*) y 49MA159 (*Penicillium griseofulvum*), aislados de la rizosfera de plantas de vainilla. Estos microorganismos generaron una concentración de P en solución en proporción de 7 y 6.5 veces más, que el control no inoculado, respectivamente. Cabe anotar que el hongo *Mortierella* sp., utilizado como control positivo, también fue efectivo para solubilizar fosfato a partir del fitato de sodio, tal como fue reportado por Ocampo *et al.* (2012).

Los hongos 108MA163 (*Aspergillus fumigatus*) y 35MA158 (*Plectosphaerella* sp.) no fueron efectivos en incrementar la concentración de P en la solución, a pesar de que diferentes especies del género *Aspergillus* son reconocidas productoras de *fitasas* (Vats y Banerjee, 2004). Sin embargo, se observó que *A. fumigatus* tuvo un notable crecimiento en este medio (Figura 4.4), lo cual indica que posiblemente solubilizó el fitato de Na y lo absorbió para su crecimiento y desarrollo. De esta manera quizás se enmascaró su capacidad para solubilizar fitato de Na mediante la producción de *fitasas*. En contraste, el hongo 35MA158 exhibió un pobre crecimiento en dicho medio (Figura 4.4).

Como se mencionó anteriormente, el P es un elemento limitante en el cultivo de vainilla y el aporte que se hace de él a través de la hojarasca, si bien es bajo, es fundamental para la nutrición de esta especie vegetal. Una de las alternativas de almacenamiento del fosfato en los tejidos orgánicos, es en forma de myo-inositol, siendo el fitato un derivado de este (Raboy, 2003). Este compuesto lo degradan algunos microorganismos mediante la producción de *fitasas* (Havlin *et al.*, 1999).

Aunque los resultados de esta evaluación deben ser probados en campo, son bastante promisorios, ya que como se mencionó anteriormente, la nutrición fosfórica es un factor clave para la producción comercial de vainilla. Esto puede tener una mayor importancia si se trabaja con materiales orgánicos compostados ricos en fosfatos orgánicos como la pulpa de café, gallinaza, porcínaza, bovinaza, entre otros, cuyos contenidos de P fluctúan entre 0.2 a 2% (Sadeghian, 2010). En este sentido, recientemente, Monsalve *et al.* (2012) encontraron que la pulpa de café compostada indujo un crecimiento de



plántulas de vainilla significativamente superior al obtenido con otros materiales con concentraciones menores de P.

Se ha reportado ampliamente que especies del género *Penicillium* son activas en la producción de fosfatasas (Pandey *et al.*, 2008). En cambio, este podría ser el primer reporte sobre *Plectosphaerella cucumerina* como productor de fitasas, lo cual representa un importante hallazgo que merece ser evaluado bajo condiciones de campo, previa confirmación de la inocuidad de este hongo sobre las plantas de vainilla.

### **Actividad celulolítica**

Se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en la producción de CO<sub>2</sub> en función de los microorganismos inoculados (Figura 4.5). El aislado 49MA159 (*Penicillium griseofulvum*) fue el más efectivo degradador de celulosa seguido por el aislado 108MA163 (*Aspergillus fumigatus*). *Penicillium* y *Aspergillus* son dos de los más abundantes géneros de hongos encontrados en el suelo y comúnmente presentes en ambientes ricos en materia orgánica (Atlas y Bartha, 1997). Estos hongos son ampliamente conocidos por su capacidad de producir grandes cantidades de enzimas extracelulares (Webster y Weber, 2007) y por tanto no resulta sorprendente su alto desempeño en las pruebas de actividad celulolítica realizadas. Por otra parte, los aislamientos 59BMA249, 58SEP25, 55MA248, 87MA197, 82SEP32 y 82BMA resultaron poco efectivos para degradar celulosa (Figura 4.5).

La disponibilidad de azúcares libres en el suelo, es un factor limitante para la actividad microbiana ya que existe una fuerte competencia entre los microorganismos por este recurso (Stevenson, 1986; Atlas y Bartha, 1997). La degradación de celulosa es un proceso clave en la descomposición de materia orgánica, debido a que proporciona azúcares simples y energía fácilmente utilizable por los microorganismos (Wagner y Wolf, 1999). Esta mayor disponibilidad de azúcares favorece la actividad de otros microorganismos responsables de cumplir otras funciones como la solubilización de fosfato, amonificación y fijación de N<sub>2</sub> (Uphoff *et al.*, 2006).

*Aspergillus* y *Penicillium* son hongos abundantes en la hojarasca, parte de su éxito para colonizar el suelo se debe a su capacidad para producir celulasas y obtener sustratos

carbonáceos simples (Webster y Weber, 2007). Estos microorganismos están entre los responsables de iniciar los procesos de degradación de materiales orgánicos (Thies y Grossman, 2006). Vale la pena resaltar que *P. griseofulvum* (49MA159) y *A. fumigatus* (108MA163) también exhibieron capacidad para solubilizar fósforo orgánico, lo cual les confiere una actividad sobresaliente en la rizosfera. Lo anterior, permite considerarlos como microorganismos promisorios para ser usados como biofertilizantes en cultivos de vainilla, más aún cuando existen reportes de la formulación como bioinoculantes comerciales de *P. bilaii* (Whitelaw, 2000) y *A. awamori* en orquídeas (Shashidhar *et al.*, 2009).

### **Proteolíticos/amonificantes**

La prueba *in vitro* utilizada para evaluar los microorganismos PROT mostró que los aislados 71MA226, 77SEP29, 174MA251 y 75MA194 fueron significativamente más eficientes para liberar amonio a partir de caseína (Figura 4.6). Los tres primeros fueron identificados como filogenéticamente relacionados con el complejo *Bacillus cereus*, mientras que el último aislado está relacionado a *Serratia* sp. Los demás microorganismos evaluados presentaron una capacidad intermedia de liberación de amonio a partir de proteína.

De acuerdo con Robertson y Groffman (2007), en el suelo la amonificación es un proceso clave para mejorar la disponibilidad de nitrógeno. Esto es muy relevante debido a que el N es un elemento limitante en casi todos los agroecosistemas. Los microorganismos proteolíticos son capaces de degradar proteínas extracelularmente, por lo tanto participan en los procesos de mineralización del N proteínico contenido en residuos orgánicos (Havlin *et al.*, 1999). Este grupo de microorganismos es importante porque inician el ciclaje del N en el suelo a partir de residuos orgánicos; su actividad permite la liberación de aminoácidos y amonio que pueden ser utilizados directamente por las plantas o microorganismos del suelo, o ser posteriormente usados en el proceso de nitrificación (Myrold, 1999; Hofmockel *et al.*, 2010).

Osorio (2012) reportó en la rizosfera de vainilla los siguientes microorganismos con actividad amonificante: *Serratia* sp., *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus cereus*. Anilkumar (2004) indica que los sustratos orgánicos donde se cultiva vainilla pueden

ser inoculados para este fin con *P. fluorescens* entre otros organismos. Igualmente, Surendra *et al.* (2009) y Suseela y Kumar (2008) reportan que diferentes aislados de *P. fluorescens* han sido detectados como promotores de crecimiento de plantas de vainilla. Estas bacterias pueden no solo promover el crecimiento vegetal sino que también podrían ser antagonistas de patógenos como *Fusarium* sp. (Ramírez y Rapidel, 1999; He, 2007; Naik *et al.*, 2009; Suseela *et al.*, 2009)

Vale la pena resaltar que el aislamiento 75MA194 (*Serratia* sp.) no sólo presentó la capacidad como amonificante, sino también como solubilizador de fosfato inorgánico (Figura 4.6). La combinación de ambas actividades en este microorganismo son bastantes atractivas para su potencial uso como biofertilizante ya que ambos elementos (N y P) son usualmente limitantes del crecimiento vegetal. Sin embargo, a pesar de lo promisorio de esta bacteria, es necesario verificar su inocuidad en humanos antes de ser utilizado como biofertilizante.

### **Fijadores asimbióticos de N<sub>2</sub>**

La utilización de los cebadores Rosch *nifHF/Rb* permitió detectar la presencia del gen *nifH* en las tres bacterias originalmente aisladas en el medio selectivo para FBN (Tabla 4.2) (20SEP14, 21SEP15, 33MA221) e identificadas como *Pseudomonas koreensis*. Algunas especies de *Pseudomonas* como *P. stutzeri*, *P. azotifigens*, se han clasificado entre las bacterias con capacidad para fijar N<sub>2</sub> (Desnoues *et al.*, 2003; Hatayama *et al.*, 2005).

Las bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> son uno de los grupos funcionales más importantes del suelo, al ser los únicos organismos que tienen la *nitrogenasa*, una enzima que reduce el N<sub>2</sub> a amonio, el cual es asimilable por las plantas (Barea *et al.*, 2005). Para que este proceso se realice, las bacterias necesitan compuestos carbonáceos en la rizosfera que no siempre están disponibles debido a la alta demanda que existe en este ambiente (Kennedy y Tchan, 1992; Zuberer, 1999). Sin embargo, Yan *et al.* (2008) identificaron en diferentes especies de *Pseudomonas*, genes que codifican para proteínas de los sistemas de transporte de carbohidratos, aminoácidos y ácidos dicarboxílicos, componentes principales de los exudados radicales, lo que sin duda facilita una alta adaptación de dichas bacterias al ambiente altamente competitivo de la rizosfera.

Es bien conocido que las bacterias asimbióticas fijadoras de N<sub>2</sub> no son tan efectivas como las bacterias simbióticas (Kennedy y Tchan, 1992; Zuberer, 1999) y por tanto es posible que no satisfagan la totalidad de los requerimientos nitrogenados de las plantas. La significancia de estas bacterias para fijar N<sub>2</sub> en la rizosfera de vainilla puede no ser importante si se utilizan sustratos orgánicos ricos en N como vermicompost, compost, estiércol de animales y hojarasca de leguminosas, o si se aplican fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, estos microorganismos tal vez puedan tener un efecto positivo en la nutrición nitrogenada de la planta, si el sustrato de crecimiento presenta materiales orgánicos con relaciones C/N amplias (>30), tales como chips de madera, fibra de coco, cortezas de árboles, aserrín, materiales que comúnmente se aplican en nuestro medio al sustrato de establecimiento de la vainilla.

Los resultados de esta investigación indican que la rizosfera de las plantas de vainilla contiene una comunidad microbial con alto potencial para aumentar la disponibilidad de nutrientes para plantaciones comerciales de este cultivo. De esta forma se abre la posibilidad de continuar con una nueva fase experimental de evaluación de formulaciones de algunos de los microorganismos descritos, bajo condiciones controladas de campo.

### **Caracterización bioquímica y morfológica de los aislamientos**

La identidad de los microorganismos que resultaron más eficientes en las pruebas bioquímicas de eficacia *in vitro* (Tabla 4.3), fue confirmada a partir de su caracterización morfológica (hongos) y mediante series bioquímicas (bacterias).

#### **Bacterias**

Las pruebas de las series bioquímicas evaluadas en todos los aislamientos seleccionados de las pruebas *in vitro*, confirmaron la identidad de las bacterias determinadas molecularmente como pertenecientes a la especie *P. koreensis*, *Serratia* sp. y al complejo *B. cereus*; encontrándose, como era de esperarse, algunas diferencias fenotípicas en las colonias de los aislamientos de cada grupo taxonómico (Tabla 4.5), pero no en los perfiles bioquímicos estudiados (Tabla 4.4).

### *Pseudomonas koreensis*

El género *Pseudomonas* fue inicialmente definido por Migula (1894) como un taxón conformado por bacterias Gram negativas, con forma de bacilos móviles mediante flagelos polares y estrictamente aeróbicos. Estudios fenotípicos y genotípicos posteriores, especialmente aquellos adelantados por Sands *et al.* (1970), Champion *et al.* (1980) y Anzai *et al.* (1997), delimitaron su extensión al incluir en su definición la reacción oxidasa positiva, la ausencia de endosporas y la presencia (en algunas especies) de sideróforos fluorescentes de color amarillo-verdoso. Además de comparaciones de niveles de hibridación de sus ácidos nucleicos. Posteriormente, Anzai *et al.* (2000) al analizar las relaciones filogenéticas de un gran número de especies putativas de *Pseudomonas*, con base en secuencias 16S del ADNr, identificaron 57 especies y definieron a *P. aeruginosa* como la especie tipo del género.

En este trabajo, se han identificado un gran número de aislamientos de la rizosfera de plantas de vainilla filogenéticamente relacionados con la especie *P. koreensis* y aparentemente presentando una gran versatilidad metabólica, al ser aislados de pruebas de FBN, PROT, PSM, CEL y FIT.

*P. koreensis* fue inicialmente registrada a partir de aislamientos de suelos agrícolas de Corea del Sur (Kwon *et al.*, 2003); aunque actualmente se ha registrado en diferentes países Europeos (Francia, Grecia, Portugal etc.), Americanos (México, Argentina, EEUU) y Asiáticos (Japón y China) (Toribio *et al.*, 2011). Consiste de bacilos Gram negativos con tamaños de 1 x 2 µm y móviles por múltiples flagelos polares. Sus colonias son circulares con colores blancos a amarillos en LB y con capacidad de producir pigmentos fluorescentes en medio King B. Son *catalasa* y *oxidasa* positiva, no hidrolizan almidón, ni acidifican a partir de glucosa, los medios de cultivo. No reducen nitrato a nitrito, producen *lecitinasa* y su utilización de la urea es variable. No producen indol a partir de triptófano y asimilan glucosa, caprato, malato y citrato, pero no maltosa, adipato o fenilacetato (Kwon *et al.*, 2003).

En la tabla 4.6 se presenta una comparación de los resultados de la serie bioquímica y la morfología colonial del aislamiento 40MA190, con respecto a las características reportadas por Kwon *et al.* (2003) en su descripción original de esta especie.

Similarmente en la tabla 4.7, se presenta una comparación de los resultados del API 20NE en la cepa 40MA190 y la cepa tipo de la especie (Ps 9-14T = KACC10848) (Kwon *et al.*, 2003). Tal como se aprecia de ambas comparaciones, se confirma que las cepas obtenidas en este estudio corresponden a aislamientos de *P. koreensis*. Considerando que recientemente se ha reportado que diferentes linajes de esta especie bacteriana, tienen la capacidad de producir biosurfactantes del tipo lipopéptidos cíclicos con actividad antibiótica frente a bacterias como *Exiguobacterium aurantiacum* y *Bacillus subtilis* (Toribio *et al.*, 2011) y oomycetes fitopatógenos como *Pythium ultimum* y *Phytophthora infestans* (Hultberg *et al.*, 2010a,b), la confirmación taxonómica realizada en esta investigación, no solo representa el potencial de *P. koreensis* para su uso como biofertilizante, sino también que abre una posible aplicación de manejo fitosanitario, pues son varias las especies de *Phytophthora* reportadas afectando las raíces y cuello de las plantas de vainilla (Bhai y Dhanesh, 2008).

#### *Serratia* sp.

El género *Serratia* (Enterobacteriaceae) está conformado por un grupo de bacterias anaeróbicas facultativas Gram negativas, con forma bacilar provista de flagelos, que producen ácido a partir de maltosa, manitol, salicina, trehalosa y presentan reacciones negativas para ureasa, H<sub>2</sub>S, *B-glucoronidasa* y no asimilan L-sorbose, triptamina, histamina y glutarato, entre otras fuentes de Carbono. Algunas especies de *Serratia* producen un pigmento rojo no difusible denominado prodigiosina; siendo *S. marcescens*, su especie tipo, el más prolífico en su producción, aunque algunos de sus biogrupos (A3, A4, A5/8) no lo generan (Grimont y Grimont, 2006). Los miembros del género *Serratia* comparten muchas de las características definidas para la familia Enterobacteriaceae, aunque claramente se pueden diferenciar de *Klebsiella* spp., *Enterobacter aerogenes* y *E. cloacae* por la producción de *gelatinasa*, *lipasa*, *DNasa* y su crecimiento utilizando caprato o caprilato como única fuente de Carbono. Ecológicamente, las especies de *Serratia* se encuentran como habitantes de aguas, suelos, plantas y en diferentes vertebrados, incluyendo humanos, siendo *S. marcescens* una reconocida especie nosocomial oportunista (Grimont y Grimont, 2006).

En la tabla 4.8 se presenta un resumen comparativo de las características de las especies *S. marcescens*, *S. plymuthica* y *S. fonticola* con respecto a las pruebas realizadas en el presente estudio para la cepa 75MA194 (Figura 4.7). Como se puede apreciar, con la información disponible no es posible identificar inequívocamente dicha cepa a nivel de especie, y por esto es necesario en el futuro ampliar el rango de pruebas bioquímicas, especialmente aquellas relacionadas con la asimilación de diferentes fuentes de carbono. Esto, a pesar de que el análisis de secuencias 16S del ADNr arrojó un nivel de identidad de 1 con respecto a cepas reportadas en GenBank de *S. marcescens* (ej. JF937055), pero también con cepas no identificadas a nivel de especie de *Serratia* (ej. JN400353). Estos altos niveles de identidad en la región 16S del ADNr entre especies del género *Serratia* son frecuentes. Así por ejemplo, Zhang *et al.* (2009) al identificar la nueva especie *S. nematodiphila*, asociada simbióticamente con el nematodo entomopatógeno *Heterorhabditoides chongmingensis*, encontraron que compartían con otras especies del género, muy altos niveles de identidad en sus secuencias 16S del ADNr, con valores de 99.8%, 99.5% y 98.3%, con respecto a *S. marcescens* subsp. *sakuensis*, *S. marcescens* subsp. *marcescens* y *S. ureilytica*, respectivamente.

#### *Bacillus cereus*

El género *Bacillus* se caracteriza por la presencia de bacterias con forma bacilar individuales o agrupadas en pares, aunque algunas especies pueden formar cadenas e incluso largos filamentos. Generalmente forman endosporas (una por célula) que son altamente resistentes a diversas condiciones adversas, incluyendo altas temperaturas, radiaciones, altas concentraciones salinas y ausencia de humedad. Tienen reacción Gram positiva y movilidad por flagelos peritricos, aunque algunas especies no son móviles. El género incluye bacterias aeróbicas, anaeróbicas facultativas e incluso algunas especies son anaeróbicas estrictas. Generalmente son *catalasa* positiva, pero la reacción *oxidasa* es variable. La mayoría de especies son habitantes del suelo o de ambientes que han sido contaminados directa o indirectamente por suelos; pero también se encuentran algunas especies en aguas, alimentos y en ambientes clínicos. Estas últimas son consideradas patógenos débiles, con excepción de *B. anthracis*. Adicionalmente, la especie *B. thuringiensis* es un patógeno de invertebrados,

comúnmente utilizado con fines de control biológico de plagas e insectos vectores de enfermedades. La especie tipo del género es *B. subtilis* (Logan y De Vos, 2009).

*B. cereus* interactúa con otros microorganismos en la rizosfera de algunas plantas. Estas se benefician de su presencia debido a la capacidad que tiene de inhibir el ataque de algunos patógenos y de promover su crecimiento (Jensen *et al.*, 2003). Naturalmente produce los antibióticos zwittermicina A y kanosamina los cuales inhiben el crecimiento de patógenos de plantas, oomycetes, ciertos hongos y algunas especies de bacterias (Silo-Suh *et al.*, 1994). La presencia de *B. cereus* en la rizosfera de soya incrementa la nodulación por *Bradyrhizobium japonicum* (Margulis *et al.*, 1998).

*B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis* son miembros del complejo de especies *Bacillus cereus*. *B. anthracis* es el agente causal del ántrax. Sus formas más virulentas, se caracterizan por tener dos plásmidos que contienen la mayoría de sus factores de patogenicidad y se denominan pXO1 (181 kb) y pXO2 (93.5 kb). *B. thuringiensis* es una bacteria utilizada como fuente de toxinas insecticidas en forma de cristales contenidos en las endosporas. *B. cereus* es una bacteria ubicua del suelo y eventualmente patógena oportunista de humanos, a partir de la contaminación de productos lácteos (Helgason *et al.*, 2000). Las únicas diferencias estables detectadas entre *B. cereus* y *B. thuringiensis* son la presencia de genes que codifican para las toxinas insecticidas y que están ubicados en los plásmidos; aunque si estos se pierden, *B. thuringiensis* no puede ser distinguido de *B. cereus*. Similarmente, Helgason *et al.* (2000) demostraron que *B. anthracis* es indistinguible genéticamente de *B. thuringiensis* y de *B. cereus*, cuando no se incluyen los genes plasmídicos. Ya que las tres especies pueden transferirse horizontalmente estos plásmidos, estos autores consideran que dichas bacterias deben ser consideradas bajo un solo nombre. Una situación similar fue encontrada en estudios pioneros de hibridación DNA-DNA (Kaneko *et al.*, 1978) y secuenciación del ADNr (Priest *et al.*, 1994). Sin embargo, Logan y Vos (2009) en la segunda edición del volumen III (Firmicutes) del Bergey's Manual, continúan considerando formalmente a dichas especies como entes taxonómicos diferentes, con base en sus características patogénicas y algunas diferencias morfológicas y bioquímicas que se presentan en la tabla 4.9.



En esta investigación se identificaron cinco aislamientos como filogenéticamente relacionados con el complejo de especies *B. cereus* (Figura 4.7). En la tabla 4.10 se presenta una comparación de la cepa 71MA226 con las características descritas en el Bergey's manual (De Vos *et al.*, 2009) para las tres especies de este complejo.

Adicionalmente, en la figura 4.8 se observan las colonias creciendo en Agar Mossel yema de huevo, de color rosado, rodeadas de un halo algodonoso relacionado con la producción de *lecitinasa* indicando además, que no desdobra el manitol lo que confirma la identificación de *Bacillus cereus*. En la determinación del tipo de hemólisis se presentó un halo transparente en el crecimiento en Agar sangre, lo que representa otra característica típica de esta especie.

## **Hongos**

### *Aspergillus fumigatus*

*A. fumigatus* es un hongo saprófito cosmopolita que juega un papel fundamental en los ciclos del carbón y nitrógeno en los suelos. Adicionalmente, puede ser patógeno humano, causando aspergillosis broncopulmonares en pacientes inmuno-suprimidos (Rinyu *et al.*, 1995).

*A. fumigatus* se ha considerado como una especie extremadamente variable a nivel cultural y en su micromorfología, aunque es bastante homogénea con respecto a los perfiles de extrolitos que produce (Frisvad y Samson, 2004) y a las características genéticas de sus aislamientos (Hong *et al.*, 2005). Entre los metabolitos específicos que genera, se destacan algunos con efectos antibióticos y tóxicos, como esfingofunginas, espinulosina, ferricrocina, festuclavina, filostina, fumagilina, fumiclavina, fumifungina, fumigacina, fumigatina, fumitoxinas, fumitremorgina, fusígeno, gliotoxina, tripacidina, triptoquivalinas y verrucologeno (Bial-Arístegui, 2002).

En esta investigación se identificó con base en secuencias ITS del ADNr, un aislamiento (108MA163) de *A. fumigatus*, que fue plenamente confirmado a partir de su caracterización morfológica.

El aislamiento presentaba múltiples conidióforos de 300  $\mu\text{m}$  de largo x 3-8  $\mu\text{m}$  de ancho con pared lisa, de color café claro, sin tabiques ni ramificaciones. Al final de los conidióforos se presentan vesículas ensanchadas (20 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro) cubiertas parcialmente en su perímetro por esterigmas de 6-8  $\mu\text{m}$  y sin méntulas visibles. Las conidias son unicelulares, redondas o subesféricas (2-3  $\mu\text{m}$  de diámetro) con colores verdosos y formando cadenas no ramificadas lateralmente (Figura 4.9). Las colonias presentan un crecimiento rápido, son compactas y blancas al comienzo, pero se tornan rápidamente a un color verde grisáceo, de aspecto aterciopelado. El dorso de las colonias al envejecer presenta tintes amarillos o pardos (Figura 4.10).

#### *Penicillium griseofulvum*

*P. griseofulvum* es una especie del subgénero *Penicillium* y de la Serie *Urticolae*, en conjunto con *P. dipodomyicol*. Este hongo es un saprófito ubicuo ampliamente reconocido por ser un contaminante frecuente de alimentos, especialmente de granos y cereales y por ser un agente alergénico en ambientes cerrados. Ambas especies pueden ser diferenciadas con base en las disposiciones de sus verticilos, con *P. dipodomyicola* presentando estructuras bi y ocasionalmente tri-verticiladas, mientras que en *P. griseofulvum* son tri- a cuadri-verticiladas. *P. griseofulvum* produce los extrolitos griseofulvina, ácido ciclopiazónico y patulina (Frisvad y Samson, 2004).

El aislamiento 49MA159 fue identificado con base en secuencias ITS del ADNr como *P. griseofulvum*. Dicha identificación se confirmó morfológicamente, según las siguientes características:

Conidióforos aéreos de longitud variable, paredes lisas y de colores verdosos, predominantemente cuadri-verticiladas, pero con algunas ramificaciones tri-verticiladas, méntulas en verticilos de 2-4  $\mu\text{m}$ , y fiálides de 5 a 12  $\mu\text{m}$  de longitud; conidias ovadas a subesféricas de 2 a 3.5  $\mu\text{m}$ , lisas e inicialmente catenuladas (Figura 4.11). Las colonias se presentan densas con algunas zonas cubiertas de micelio blanco y con abundantes conidias de color verde a verde-grisáceo. Su reverso es de color amarilloso a naranja luego de 7 días de cultivo (Figura 4.10).

*Plectospharella cucumerina*.

*Pa. cucumerina* es un hongo de amplia distribución mundial que se ha reportado sobre una gran cantidad de hospedantes y sustratos, incluyendo lodos marinos; aunque su nicho ecológico natural es netamente rizosférico (Palm *et al.*, 1995), e incluso recientemente se han identificado aislamientos de esta especie como potenciales controladores biológicos de nematodos de los géneros *Meloidogyne* y *Globodera* (Atkins *et al.*, 2003).

Este hongo se presenta principalmente en el suelo en su forma anamórfica *Plectosporium*, un nuevo género introducido por Palm *et al.* (1995) para sustituir la antigua denominación de su estado imperfecto, *Fusarium tabacinum*. Diferentes estudios han encontrado una notable variación en las características morfológicas de *Pa. cucumerina*, por lo que se ha considerado como un complejo de especies. Dichas variaciones incluyen diferencias en la proporción de conidias septadas, presencia o ausencia de clamidosporas y diferencias en la forma y dimensiones conidiales. Adicionalmente, se han encontrado cambios considerables en las secuencias ITS del ADNr de diferentes aislamientos. Recientemente, Carlucci *et al.* (2012) con base en secuenciación de ITS y micromorfología, encontraron seis especies de este género asociadas a enfermedades basales de cultivos hortícolas de Italia (*Pa. Cucumerina*, *Pa. citrullae*, *Pa. pauciseptata*, *Pa. plurivora*, *Pa. Ramiseptata* y *Plectosphaerella melonis*).

Inicialmente *Pa. cucumerina* fue reportada como miembro de la familia Hypocreaceae (Barr, 1990), pero más recientemente Zare *et al.* (2007) propusieron la familia Plectosphaerellaceae para acomodar los miembros de los géneros *Acrostalagmus*, *Gibellulopsis*, *Musicillium*, *Plectosphaerella* (como *Plectosporium*) y *Verticillium*.

Álvarez *et al.* (2012) en un estudio con base en secuencias ITS del ADNr, encontraron tres aislamientos asociados a un clado representativo del género *Plectosphaerella* y aunque no compartieron el 100% de identidad en sus secuencias ITS con cepas de referencia de *Pa. cucumerina*, los caracteres morfológicos conducen a plantear que dichos aislamientos pertenecen a esta especie, más aún cuando Carlucci *et al.* (2012) en su estudio filogenético basado en estas regiones, reconocen un importante nivel de variación en las secuencias de diferentes aislamientos europeos de esta especie. Las

características morfológicas observadas para el aislamiento 52SEP41 se resumen a continuación:

Micelio hialino, ramificado, septado que da origen a conidióforos solitarios o poco ramificados, con paredes lisas, que terminan en fiálides solitarias rectas, aunque algunas veces pueden aparecer sinuosas, más amplias en la base y gradualmente reduciendo su tamaño hacia el ápice y de 10 a 30  $\mu\text{m}$  de longitud. Sus conidias son hialinas, lisas, aseptadas, agregándose en cabezas y con dimensiones de 5–8  $\times$  2–4  $\mu\text{m}$  (Figura 4.12). Este aislamiento no presentó clamidosporas, a pesar que sus cultivos se revisaron después de tres meses de incubación. Las colonias se presentaron planas con micelio inmerso en el medio, inicialmente de colores blancos, pero tornándose rosadas y ocre luego de 7 días. Luego de un mes de incubación, los cultivos presentaron surcos a lo largo de las colonias (Figura 4.10).

## REFERENCIAS

Aditya B., Ghosh A., Chattopadhyay D. 2009. Co-inoculation effects of nitrogen fixing and phosphate solubilizing microorganisms on teak (*Tectona grandis*) and indian redwood (*Chukrasia tubularis*). *J Biol Sci* 1(1): 23-32.

Álvarez C., Marín M., Díez M.C y Osorio N.W. 2012. Molecular identification of microorganisms associated to the rhizosphere of vanilla and their potential use as biofertilizers. *Acta Hort* (en prensa).

Álvarez L.C., Santa C.C., Ordoñez C.N., Posada B.L., Díez M.C., Osorio N.W., Marín M.M., Otero O.T. 2011. Sanidad del cultivo de vainilla, 59-71 pp. *En*: Moreno F. y Díez M.C. (Eds.). *Cultivo de vainilla. Contribuciones para el desarrollo de su cadena productiva en Colombia*. Medellín, Colombia.

Andrade G., 1999. Interacciones microbianas en la rizosfera, 551–575 pp. *En*: Siqueira, J.O., Moreira, F.M.S., Lopes, A.S., Guilherme, L.R., Faquin, V., Furtinni, A.E., Carvalho, J.G. (Eds.). *Soil fertility, Soil biology and Plant Nutrition Interrelationships*. Brazilian Soil Science Society/Federal University of Lavras/Soil Science Department (SBCS/UFLA/DCS), Lavras, Brasil.

- Anilkumar A.S. 2004. Vanilla cultivation: A profitable agri-based enterprise. *En: Kerala calling*. February. 26-30 pp.
- Atkins S.D., Clark I.M., Sosnowska D., Hirsch P.R., and Kerry1 B.R. 2003. Detection and quantification of *Plectosphaerella cucumerina*, a potential biological control agent of potato cyst nematodes, by using conventional PCR, Real-Time PCR, Selective Media, and Baiting. *Appl Environ Microbiol* 69(8): 4788–4793.
- Atlas R. and Bartha R. 1997. *Microbial Ecology*. Addison Wesley Longman, New York.
- Barea J.M., Pozo M.J., Azcón R., and Azcón-Aguilar C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J Exp Bot* 56(417): 1761-1778.
- Barr M.E. 1990. Prodrumus to nonlichenized, pyrenomycetous members of class Hymenoascomycetes. *Mycotaxon* 39: 43–184.
- Bernal P.L. 2009. Aislamiento de microorganismos solubilizadores de P (PSM) de las raices de *vanilla* sp. En: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis400.pdf>
- Cappuccino J.G. and Sherman N. 1999. *Microbiology: a laboratory manual*. 5<sup>th</sup> ed. Benjamin/Cummings. California. 477 p.
- Carlucci A., Raimondo M.L., Santos J., and Phillips A.J.L. 2012. *Plectosphaerella* species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. *Persoonia* 28: 34–48.
- Chen Y.P., Rekha P.D., Arun A.B., Shen F.T., Lai W.A., and Young C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Appl Soil Ecol* 34: 33–41.
- Chien S.H. and Hammond L.L. 1978. A comparison of various laboratory methods for predicting the agronomic potential of phosphate crops for direct application. *Soil Sci Am J* 42: 935-939.

Desnoues N., Lin M., Guo X., Ma L., Carreño-López R., and Elmerich C. 2003. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology* 149(8): 2251-2262.

Döbereiner J. and Day J.M. 1976. Associative simbiose in subtropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogens fixing sites, 518–538. pp. *En: Newton W.E. and Nyman C.J. (Eds.). Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation II*, Washington State University Press, Pullman.

Farhat M.B., Farhat A., Bejar W., Kammoun R., Bouchaala K., Fourati A., Antoun H., Bejar S., and Chouayekh H. 2009. Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CTM 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa. *Arch Microbiol* 191(11): 815-24.

Frisvad J.C. and Samson R.A. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their myco-toxins. *Stud Mycol* 49:1-173.

Hameeda B., Harini G., Rupela O.P., Wani S.P., Reddy G. 2008. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol Res* 163: 234–242.

Hatayama K., Kawai S., Shoun H., Ueda Y., and Nakamura A. 2005. *Pseudomonas azotifigens* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium isolated from a compost pile. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(4): 1539–1544.

Havlin J., Beaton J., Tisdale S.L., and Nelson W. 1999. *Soil Fertility and Fertilizers. An Introduction to Nutrient Management*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

Hernández H. J. 2011. Production of vanilla - Agricultural systems and curing, 1-25 pp. *En: Havkin-Frenkel D. and Belanger F.C. (Eds.). Handbook of Vanilla Science and Technology*, First Edition, Blackwell Publishing Ltd.

Hofmockel K.S., Fierer N., Colman B.J., and Jackson R.B. 2010. Amino acid abundance and proteolytic potential in North American soils. *Oecol* 163(4): 1069-1078.

- Hong S-B-, Go S.-J., Shin H-D., Frisvad J.C., Samson R.A. 2005. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97(6): 1316-1329.
- Hopkins D.W. 2007. Carbon mineralization. *En: Carter M.R. and Gregorich E.G. (Eds.). Soil sampling and methods of analysis. Second edition, eBook ISBN: 978-1-4200-0527-1.*
- Hultberg M., Alsberg T., Khalil S., and Alsanius B. 2010. Suppression of disease in tomato infected by *Pythium ultimum* with a biosurfactant produced by *Pseudomonas koreensis*. *BioControl* 55(3): 435-444.
- Hultberg M., Bengtsson T., and Liljeroth E. 2010. Late blight on potato is suppressed by the biosurfactant-producing strain *Pseudomonas koreensis* 2.74 and its biosurfactant. *BioControl* 55(4): 543-550.
- Hwangbo H., Park R.D., Kim Y.W., Rim Y.S., Park K.H., Kim T.H., Suh J.S., and Kim K.Y. 2003. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedius*. *Curr Microbiol* 47(2): 87-92.
- Illmer P. and Schinner F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem* 24: 389-395.
- Jensen G., Hansen B., Eilenberg J., Mahillon J. 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ Microbiol* 5(8): 631-640.
- Kaneko T., Nozaki R., and Aizawa K. 1978. Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Immunol* 22: 639-641.
- Kennedy R.I. and Tchan Y-T. 1992. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Recent advances. *Plant and Soil* 141: 93-118.
- Kim K.Y., Jordan D., and McDonald G.A. 1998. Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol Fertil Soils* 26: 79-87.

Ledezma E., Ramirez G., and Pino-Benitez N. 2006. Forest orchids of the Choco region. *Lyonia* 10(1): 17-31.

León J.D. 2007. Contribución al conocimiento del ciclo de nutrientes en bosques montanos naturales de *Quercus humboldti* y reforestado de *Pinus patula* y *Cupressus lusitánica* de la región de piedras blancas, Antioquia, Colombia. Tesis doctoral Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

Margulis L., Jorgensen J., Dolan S., Kolchinsky R., Rainey F., and Shyh-Ching. 1998. The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(3): 1236–1241.

Matsumoto L.S., Martines A.M., Avanzi M.A., Albino U.B., Brasil C.B., Saridakis D.P., Rampazo L.G.L., Zangaro W., and Andrade G. 2005. Interactions among functional groups in the cycling of, carbon, nitrogen and phosphorus in the rhizosphere of three successional species of tropical woody trees. *Appl Soil Ecol* 28(1): 57–65.

McGregor A. 2005. Diversification into high-value export products: case study of the Papua New Guinea vanilla industry. Agriculture Management, marketing and finance service (AGFS) working document 2. Agriculture Support System Division. FAO. Rome. 49 pp.

Misas G. 2005. Orquídeas de la Serranía del Baudó, ConCreto, Chocó-Colombia. 787p.

Monsalve A., Osorio A. y Moreno F.H. 2012. Efecto de sustratos orgánicos compostados o frescos sobre el desarrollo de plántulas de vainilla. Trabajo de investigación, Universidad Nacional de Colombia, Medellín (en prensa).

Mrkonjic F.M., Engel M., Hagn A., Munch J.C., Sommer M., and Schloter M. 2009. Changes of diversity pattern of proteolytic bacteria over time and space in an agricultural soil. *Microb Ecol* 57: 391-401.

Murthy G., Umesha K., Smitha G.R., and Krishnamanohar R. 2010. Effect of growth regulators and bio-inoculants on rooting and growth of vanilla stem cuttings. *Indian J Hort* 67(1): 90-93.



Myrold D. 1999. Transformations of nitrogen, 333-372 pp. *En*. Sylvia D., Hartel P., Fuhrmann J., and Zuberer D. (Eds.). Principles and Applications of Soil Microbiology, Prentice Hall, New Jersey, USA.

Nybe E.V., Rajan S., and Raj N.M. 2009. Plantation crops, spices, medicinal and aromatic plants, 205 pp. *En*: Alexander *et al.* (Eds.). The Adhoc Package of Practices Recommendations for Organic Farming. Kerala Agricultural University. Kerala, India.

Ocampo B.M., Patiño L.F. Marín M.A., Salazar M., y Gutierrez P. 2012. Isolation and characterization of potential phytase-producing fungi from environmental samples of Antioquia (Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. En Prensa.

Osorio A. 2012. Efecto de materiales orgánicos, fertilizantes e inóculos microbiales sobre el crecimiento y nutrición de plántulas de vainilla. Tesis de Maestría en Bosques y Conservación Ambiental. Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

Osorio N.W. 2011. Effectiveness of Phosphate Solubilizing Microorganisms in Increasing Plant Phosphate Uptake and Growth in Tropical Soils, 65-80 pp. *En*: Maheshwari DK (Ed.). Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management (Volume III). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Osorio N.W. and Habte M. 2001. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and P solubilizing fungus on growth and plant P uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Res Mgmt* 15: 263-274.

Pandey A., Das N., Kumar B., Rinu K., Trivedi P. 2008. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 97-102.

Patiño V.M. 2002. Historia y dispersión de los frutales nativos del Neotrópico. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT. Cali, Colombia. 655 p.

- Priest F.G., Kaji D.A., Rosato Y.B., and Canhos V.P. 1994. Characterization of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria by ribosomal RNA gene restriction fragment length polymorphisms. *Microbiology* 140: 1015–1022.
- Raboy V. 2003. myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochem* 64: 1033-1043.
- Ramírez C. y Rapidel B. 1999. Principales factores agronómicos restrictivos en el cultivo de la vainilla en la zona de Quepos, Costa Rica. 309-313 p. Memorias XI Congreso Nacional Agronómico. San Jose, C. R.
- Rinyu E., Varga J., and Ferenczy L. 1995. Phenotypic and genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 33: 2567-2575.
- Robertson G.P. and Groffman P.M. 2007. Nitrogen transformations, 341-364 pp. *En: Paul E.A. (Ed.). Soil microbiology, ecology and Biochemistry*. El Sevier, Amsterdam. The Netherlands.
- Rösch C. and Bothe H. 2005. Improved assessment of denitrifying, N<sub>2</sub>-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. *Appl Environ Microbiol* 71(4): 2026-2035.
- Sadeghian S. 2010. La materia orgánica: componente esencial en la sostenibilidad de los agroecosistemas cafeteros. Cenicafé, Chinchiná.
- Serie Agronomy. Part 2. Methods of soil analysis. Second edition. 33-6.2. Extracción con cloruro de potasio 1N y pH 7.0.
- Shashidhar K.R., Narayanaswamy T.K., Bhaskar R.N., Jagadish B.R., Mahesh M., and Krishna K.S. 2009. Influence of organic based nutrients on soil health and mulberry (*Morus indica* L.) production. *e-J Biol Sci* 1(1): 94-100.
- Silo-Suh L., Lethbridge B., Raffel S.J., He H., Clardy J., and Handelsman J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ Microbiol* 60(6): 2023–2030.

Soto-Arenas M.A. 2006. La vainilla: Retos y perspectiva de su cultivo. *Biodiversitas*: 66:2.

Spices Board. 2000. Vanilla status paper. Spices board, Cochin, India. pp 33.

Stevenson F.J. 1986. *Cycles of Soil*. John Wiley and Sons, New York, USA.

Surendra G.K., Mathew S.K., and Nazeem P.A. 2009. Development of plant growth promoting microorganisms consortia technology for *ex vitro* establishment of micropropagated vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Kerala State Council for Science, Technology and Environment. Sasthra Bhavan, Pattom. Thiruvananthapuram 695004 Kerala, INDIA. <http://www.kauhort.in>

Suseela B.R. and Dhanesh J. 2008. Occurrence of fungal diseases in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) in Kerala. *J Spices Aromatic Crop* 17(2): 140-148.

Suseela B.R. and Kumar A. 2008. Effect of rhizobacteria on *Phytophthora meadii*, *Fusarium oxysporum* F. sp. *vanillae* and *Colleotrichum vanillae* infecting vanilla. *J Biol Control* 22(1): 33-41.

Suseela B.R., Remya B. and Jithya D. 2009. *In vitro* and in plant assays for biological control of *Fusarium* root rot disease of vanilla. *J Biol Control* 23(1): 83-86.

Tabatabai M.A. 1982. Soil enzymes, 903-947 pp. *En*: Page A. L., Miller R. H., Kineey D. R. (Eds.) *Methods of soil analysis, part two, chemical and microbiological properties*. ASA-SSSA, Madison, WI.

Tate K.R., Ross D.J., O'Brien B.J., and Kelliher F.M. 1993. Carbon storage and turnover, and respiratory activity, in the litter and soil of an old-growth southern beech (nothofagus) forest. *Soil Biol Biochem* 25(11): 1601-1612.

Thies J. and Grossman J. M. 2006. *The Soil Habitat and Soil Ecology*, 59-78 pp. *En*: Uphoff N. *et al.* (Ed.). *Biological approaches to sustainable soil systems*. Taylor and Francis, Boca Raton, FL, USA.

Toribio J., Escalante A.E., Caballero-Mellado J., González-González A., Zavala S., Souza V., and Soberón-Chávez G. 2011. Characterization of a novel biosurfactant producing *Pseudomonas koreensis* lineage that is endemic to Cuatro Ciénegas Basin. *Syst Appl Microbiol* (in press).

Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Klimova S.Y., Shestakov A.I., Botina S.G., and Netrusov A.I. 2007. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Arch Microbiol* 188(6): 655-664.

Uphoff N., Ball A.S., Fernandes E.C.M., Herren H., Husson O., Palm Ch., Pretty J., Sanginga N., and Thies J.E. 2006. Understanding the Functioning and Management of Soil Systems, 3-14 pp. *En: Uphoff N. et al. (Ed.). Biological approaches to sustainable soil systems.* Taylor and Francis, Boca Raton, FL., USA.

Vats P. and Banerjee U.C. 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme Microb Technol* 35: 3-14.

Vessey J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571–586.

Wagner G.H. and Wolf D.C., 1998. Carbon transformations and soil organic matter formation, 219-258 pp. *En: Sylvia D.M., Fuhrmann J.J., Hartel P.G., and Zuberer D.A.: Principles and applications of soil microbiology.* Prentice Hall. New Jersey.

Webster J. y Weber R. 2007. *Introduction to fungi.* Cambridge University Press. Cambridge, UK.

Whitelaw M.A. 2000. Growth Promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv Agron* 69: 99-151.

Wilkinson K.G., Sivasithamparam K., Dixon K.W., Fahy P.C., and Bradley J.K. 1994. Identification and characterisation of bacteria associated with Western Australian orchids. *Soil Biol Biochem* 26(1): 137-142.

Wood P.J., 1980. Specificity in the interactions of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr Res* 85: 271–287.

Yan Y., Yang J., Dou Y., Chen M., Ping S., Peng J., Lu W., Zhang W., Yao Z., Li H., Liu W., He S., Geng L., Zhang X., Yang F., Yu H., Zhan Y., Li D., Lin Z., Wang Y., Elmerich C., Lin M., and Jin Q. 2008. Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(21): 7564-7569.

Zare R., Gams W., Starink-Willemse M., Summerbell R.C. 2007. *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musciellium*, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia* 85: 463–489.

Zuberer D.A. 1999. Biological dinitrogen fixation: introduction and non-symbiotic, 295-321 pp. *En: Sylvia D.; Fuhrmann J.; Hartel P., and Zuberer D. (Eds.). Principles and applications of soil microbiology. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.*

## TABLAS

**Tabla 4.1.** Microorganismos utilizados en este estudio de diferentes grupos funcionales aislados de la rizosfera de plantas de vainilla.

<b>Grupo funcional</b>	<b>Microorganismos</b>
<b>PSM</b>	35MA158 ( <i>Plectosphaerella cucumerina</i> ), 15MA247 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 90SEP35 ( <i>Acinetobacter</i> sp.), 77SEP29 ( <i>Bacillus cereus</i> ), 51SEP40 ( <i>P. cucumerina</i> ), 52SEP41 ( <i>P. cucumerina</i> ), 79SEP31 ( <i>B. megaterium</i> ), 40MA190 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 75MA194 ( <i>Serratia nematodiphila</i> ), 2 hongos (NI)
<b>FIT</b>	108MA163 ( <i>Aspergillus fumigatus</i> ), 35MA158 ( <i>P. cucumerina</i> ), 49MA159 ( <i>Penicillium griseofulvum</i> ), 52SEP41 ( <i>Plectosphaerella cucumerina</i> )
<b>CEL</b>	59BMA249 ( <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> ), 58SEP25 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 55MA248 ( <i>Rhodococcus erythropolis</i> ), 87MA197 ( <i>Bacillus megaterium</i> ), 82SEP32 ( <i>Bacillus</i> sp.), 82BMA196 ( <i>Bacillus</i> sp.), 108MA163 ( <i>Aspergillus fumigatus</i> ), 49MA159 ( <i>Penicillium griseofulvum</i> )
<b>PROT</b>	15MA247 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 96MA199 ( <i>Acidovorax</i> sp.), 76SEP28 ( <i>Acinetobacter</i> sp.), 95MA198 ( <i>Bacillus cereus</i> ), 53SEP54 ( <i>Penicillium</i> sp.), 68MA225 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 31SEP22 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 43MA191 ( <i>Bacillus cereus</i> ), 28SEP21 ( <i>Bacillus</i> sp.), 75MA194 ( <i>Serratia nematodiphila</i> ), 174MA251 ( <i>Bacillus cereus</i> ), 77SEP29 ( <i>Bacillus cereus</i> ), 71MA226 ( <i>Bacillus cereus</i> )
<b>FBN</b>	20SEP14 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 21SEP15 ( <i>Pseudomonas</i> sp.), 33MA221 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)

NI: no identificado

**Tabla 4.2.** Composición de los medios de cultivo selectivos (g L<sup>-1</sup>) utilizados para aislar microorganismos de cada grupo funcional.

<b>FBN</b> Dobereiner & Day (1976)		<b>PSM</b> Osorio & Habte (2001)		<b>CEL</b> Wood (1980)		<b>PRO</b> Matsumoto <i>et al.</i> (2005)		<b>FIT</b> Tabatabai (1982)	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4	NaCl	1.0	Carboximetil celulosa	5	Caseína	10	CaCl <sub>2</sub>	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1	Extracto de levadura	0.1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4	Solución salina 0.85%	50*	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5	KCl	0.5
NaCl	0.1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.0	Agar-Agar	15	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
CaCl <sub>2</sub>	0.02	Glucosa	10			Solución salina 0.85%	50*	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.01
FeCl <sub>3</sub>	0.01	Agar-Agar	8			Agar-Agar	15	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.002	Roca fosfórica	3.5					Glucosa	20
Ácido málico	5							Fitato de Na	4
Azul de bromotimol	5*							Agarosa	10
Agar-Agar	15								

\*mL

**Tabla 4.3.** Microorganismos obtenidos de la rizosfera de plantas de vainilla que resultaron altamente eficientes en diferentes actividades funcionales evaluadas bajo condiciones *in vitro*.

<b>Grupo funcional</b>	<b>Aislamientos más eficientes</b>
<b>PSM</b>	40MA190 ( <i>Pseudomonas koreensis</i> ), 75MA194 ( <i>Serratia</i> sp.)
<b>FIT</b>	49MA159 ( <i>Penicillium griseofulvum</i> ), 52SEP41 ( <i>Plectosphaerella cucumerina</i> )
<b>CEL</b>	108MA163 ( <i>Aspergillus fumigatus</i> ), 49MA159 ( <i>Penicillium griseofulvum</i> )
<b>PROT</b>	75MA194 ( <i>Serratia</i> sp.), 174MA251 (Complejo <i>Bacillus cereus</i> ), 77SEP29 (Complejo <i>Bacillus cereus</i> ), 71MA226 (Complejo <i>Bacillus cereus</i> )
<b>FBN</b>	20SEP14 ( <i>Pseudomonas koreensis</i> ), 21SEP15 ( <i>Pseudomonas koreensis</i> ), 33MA221 ( <i>Pseudomonas koreensis</i> )



**Tabla 4.4.** Pruebas bioquímicas evaluadas para la caracterización de bacterias aisladas de la rizosfera de plantas de vainilla.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS												
CÓDIGO	MEDIO	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	NITRATO	LISINA	TSI	CITRATO	UREA	MOV (SIM)	INDOL (SIM)	KOH	CATALASA	OXIDASA
20SEP14	FBN	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	K/K	+	-	+	-	+	+	+
21SEP15	FBN	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	K/K	+	-	+	-	+	+	+
33MA221	FBN	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	K/K	+	-	+	-	+	+	+
40MA190	PSM	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	K/K	+	-	+	-	+	+	+
75MA194	PSM	<i>Serratia</i> sp.	+	+	K/A	+	-	+	-	+	+	-
71MA226	PROT	<i>Bacillus cereus</i>	+	-	K/A	-	-	+	-	-	+	-
77SEP29	PROT	<i>Bacillus cereus</i>	+	-	K/A	-	-	+	-	-	+	-
174MA251	PROT	<i>Bacillus cereus</i>	+	-	K/A	-	-	+	-	-	+	-

**Tabla 4.5.** Características morfológicas de las colonias bacteriales aisladas de la rizosfera de plantas de vainilla.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS										
CÓDIGO	MEDIO	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	DILUCIÓN	GRAM	COLOR	FORMA	DIÁMETRO (mm)	SUPERFICIE	BORDE	BRILLO
20SEP14	FBN	<i>Pseudomonas koreensis</i>	10 <sup>-5</sup>	Bacilo (-)	Blanco/gris	redonda	2	lisa	liso	brillante
21SEP15	FBN	<i>Pseudomonas koreensis</i>	10 <sup>-4</sup>	Bacilo (-)	Crema	redonda	1	lisa	liso	brillante
33MA221	FBN	<i>Pseudomonas koreensis</i>	10 <sup>-5</sup>	Bacilo (-)	Transparente	redonda	2	lisa	liso	brillante
40MA190	PSM	<i>Pseudomonas koreensis</i>	10 <sup>-4</sup>	Bacilo (-)	Amarilla/crema	redonda	0.5	lisa	liso	brillante
75MA194	PSM	<i>Serratia</i> sp.	10 <sup>-5</sup>	Bacilo (-)	Blanca/centro rojo	redondeada	2	plana	liso	cremosa
71MA226	PROT	Complejo <i>Bacillus cereus</i>	10 <sup>-5</sup>	Bacilo (+)	Blanco/crema	redonda	2	lisa	liso	brillante
77SEP29	PROT	Complejo <i>Bacillus cereus</i>	10 <sup>-4</sup>	Bacilo (+)	Centro blanca/borde claro	irregular	6	plana	irregular	opaca
174MA251	PROT	Complejo <i>Bacillus cereus</i>	10 <sup>-5</sup>	Bacilo (+)	Blanco/crema	irregular	6	plana	irregular	opaca

**Tabla 4.6.** Resumen comparativo de los resultados coloniales y de la serie bioquímica realizada con el aislamiento 40MA190 con respecto a la descripción original de la especie *Pseudomonas koreensis*.

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b><i>Pseudomonas koreensis</i></b>	<b>40MA190</b>
<i>Oxidasa</i>	+	+
Reducción de nitrato	-	-
<i>Lisina descarboxilasa</i>	ND	+
<i>Lecitinasa</i>	V*	ND**
Hidrolisis de Tween 80	+	ND
<i>Catalasa</i>	+	+
<i>Ureasa</i>	V	-
Indol	-	-
Acidez a partir de glucosa	-	-
Asimilación de citrato	+	+
Gram	-	-
Morfología de colonias	Circular, blanco-amarillo	Circular, blanco, crema-amarillo

\*V: resultados variables; \*\* ND: No definido

**Tabla 4.7.** Resumen comparativo de los resultados de la prueba API 20NE realizada con el aislamiento 40MA190 con respecto a la descripción original de la especie *Pseudomonas koreensis*.

<b>Prueba API20NE</b>	<b><i>Pseudomonas koreensis</i></b>	<b>40MA190</b>
Reducción de nitrato	-	-
Producción de indol	-	-
Acidificación a partir de glucosa	-	-
<i>Arginina dihidrolasa</i>	+	+
<i>Ureasa</i>	V*	-
Hidrolisis de esculina	ND**	-
Hidrolisis de gelatina	+	+
<i>B-galactosidasa</i>	ND	-
Asimilación de glucosa	+	+
Asimilación de arabinosa	+	+
Asimilación de manosa	+	+
Asimilación de manitol	+	+
Asimilación de N-acetil-glucosamina	+	+
Asimilación de maltosa	-	-
Asimilación de gluconato	+	+
Asimilación de caprato	+	+
Asimilación de adipato	-	+
Asimilación de malato	+	+
Asimilación de citrato	+	+
Asimilación de fenil-acetato	-	-
<i>oxidasa</i>	+	+

\*V: resultados variables; \*\* ND: No definido

**Tabla 4.8.** Resumen comparativo de los resultados coloniales y de la serie bioquímica realizada con el aislamiento 75MA194 con respecto a diferentes especies del género *Serratia*.

<b>Prueba</b>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. plymuthica</i>	<i>S. fonticola</i>	<b>75MA194</b>
Producción de pigmento	V*	V	-	+
Producción de indol	-	-	-	-
<i>Ureasa</i>	-	-	-	-
Gas a partir de glucosa	-	-	+	-
<b>Producción de ácido a partir de:</b>				
L-Arabinosa	-	+	+	ND**
Lactosa	V	+	+	-
D-Melibiosa	-	+	+	ND
D-raffinosa	V	+	+	ND
D-Rhamnosa	-	-	V	ND
D-Sorbitol	+	v	+	ND
Sacarosa	+	+	-	ND
D-Xilosa	-	+	V	ND
<i>Lisina descarboxilasa</i>	+	-	+	+
<b>Utilización de fuentes de carbono:</b>				
L-Arabinosa	-	+	+	ND
D-Arabitól	-	-	+	ND
L-Arabitól	+	-	+	ND
Betaina	-	v	-	ND
Dulcitol	-	-	+	ND
Meso-erythritol	v	-	+	ND
Maltitol	-	+	V	ND
D-Melibiosa	-	+	+	ND
L-Rhamnosa	-	-	+	ND
D-Sorbitol	+	v	+	ND
Sacarosa	+	+	-	ND

\*V: resultados variables; \*\* ND: No definido

**Tabla 4.9.** Diferenciación de especies del complejo *Bacillus cereus* (Fuente: Logan y Vos, 2009).

<b>Característica</b>	<b><i>B. antracis</i></b>	<b><i>B. cereus</i></b>	<b><i>B. thuringiensis</i></b>
Movilidad	-	+	+
Colonias rizoides	-	-	-
Cristales parasporales	-	-	+
<b>Producción de ácido a partir de:</b>			
Glicerol	-	+	+
Glicogeno	+	+	+
Salicina	-	V	V
Almidón	+	+	+
<i>Arginina dihidrolasa</i>	-	v	+
Utilización de citrato	V *	+	+
Reducción de nitrato	+	V	+
Degradación de tirosina	-	+	+

\*V: resultados variables

**Tabla 4.10.** Comparación de la cepa 71MA226 hallada en este estudio con las características descritas en el Manual de Bergey's para las diferentes especies del complejo *Bacillus cereus*.

<b>Característica</b>	<b><i>B. anthracis</i></b>	<b><i>B. cereus</i></b>	<b><i>B. thuringiensis</i></b>	<b>71MA226</b>
Reducción de nitrato	+	v	+	+
<i>Lisina descarboxilasa</i>	-	-	+	-
Utilización de citrato	V*	+	+	+
Acido a partir de glucosa (anaeróbicamente)	+	+	+	+
<i>Ureasa</i>	V	V	-	-
<i>Catalasa</i>	+	+	+	+
<i>Oxidasa</i>	ND**	-	-	-

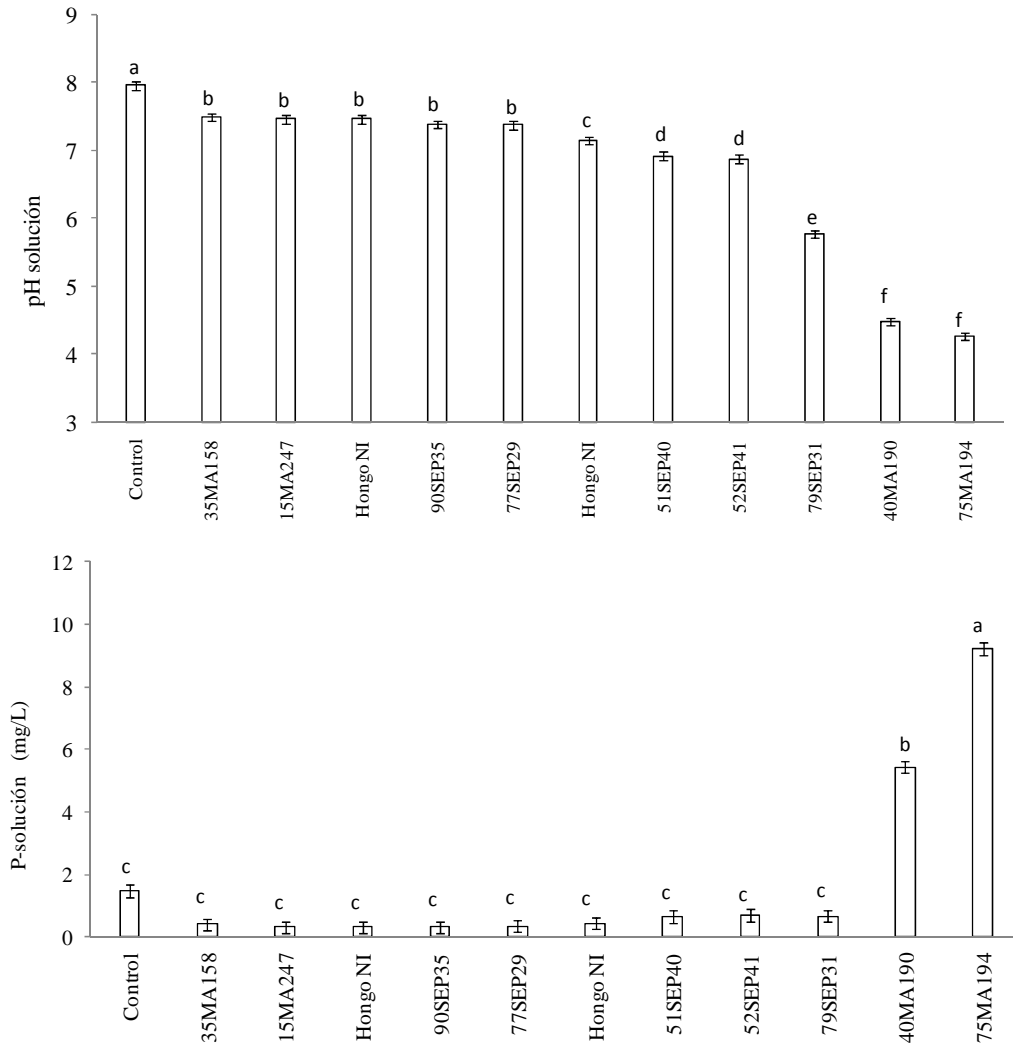
\*V: resultados variables; \*\* ND: No definido

## FIGURAS

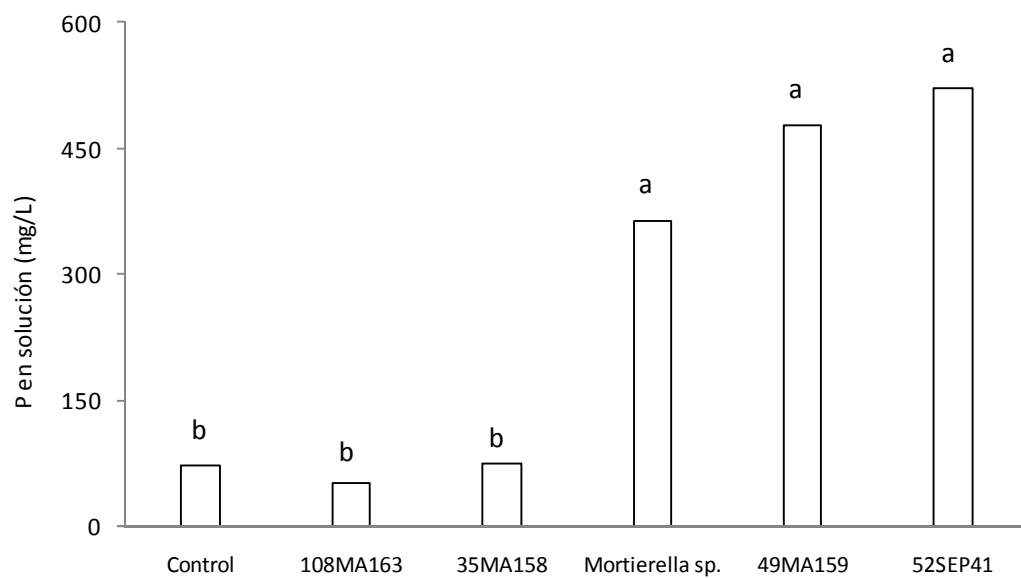


**Figura 4.1.** Aspecto de la cámara usada para evaluar la producción microbiana de CO<sub>2</sub>. Nótese en el interior la caja de Petri con el medio de cultivo (carboximetil-celulosa como fuente de C) y el beaker con NaOH que actúa como trampa del CO<sub>2</sub>.

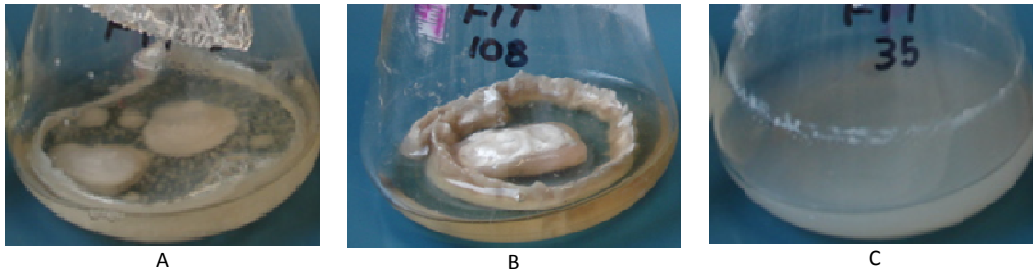




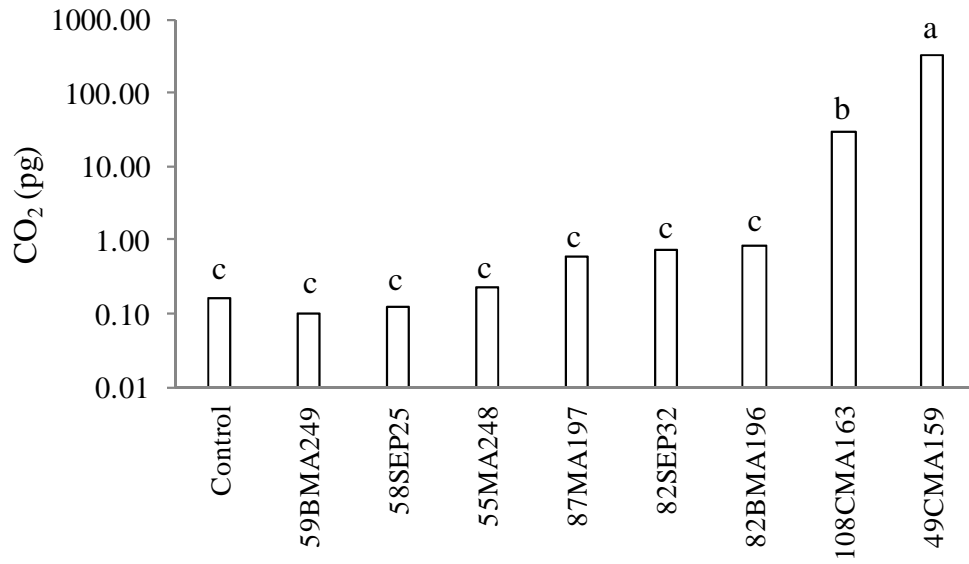
**Figura 4.2.** pH (arriba) y concentración de P en solución (abajo) en el medio inoculado con diferentes microorganismos aislados de la rizosfera de vainilla. La fuente de P fue roca fosfórica. Letras diferentes en cada columna indican que hay diferencias significativas (prueba de Duncan,  $P < 0.05$ ).



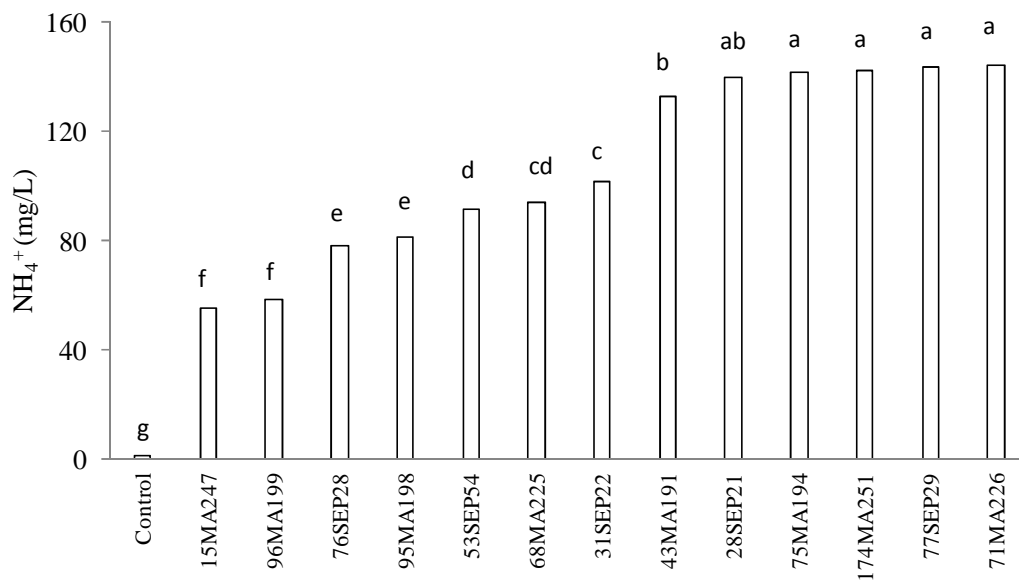
**Figura 4.3.** Concentración de P en solución en el medio inoculado con diferentes microorganismos aislados de la rizosfera de vainilla. La fuente de P utilizada fue fitato de sodio. Letras diferentes en cada columna indican que hay diferencias significativas (prueba de Duncan,  $P \leq 0.05$ ).



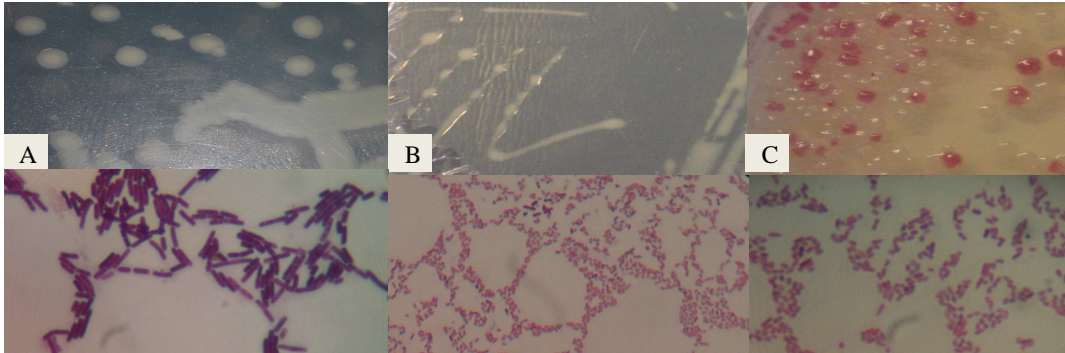
**Figura 4.4.** Apariencia de la biomasa de los hongos evaluados en el medio de crecimiento cuya fuente fue fitato de sodio. Nótese el buen crecimiento de 52SEP41 (A) y 108MA163 (B) y el pobre desarrollo de 35MA158 (C).



**Figura 4.5.** Producción de CO<sub>2</sub> como resultado de la inoculación de un medio con diferentes microorganismos aislados de la rizosfera de vainilla. La fuente de C fue carboximetil-celulosa. Letras diferentes en cada columna indican que hay diferencias significativas (prueba de Duncan,  $P \leq 0.05$ ).



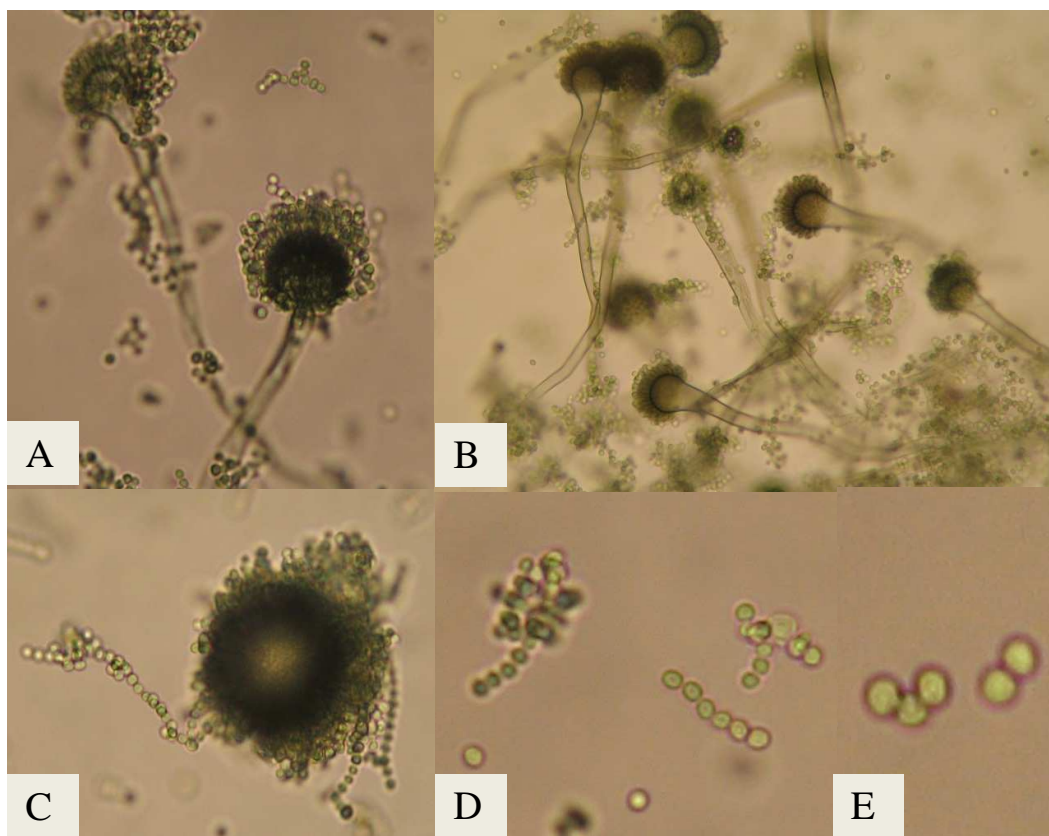
**Figura 4.6.** Concentración de amonio en el medio inoculado con diferentes microorganismos aislados de la rizosfera de vainilla. La fuente de N fue caseína. Letras diferentes en cada columna indican que hay diferencias significativas (prueba de Duncan,  $P \leq 0.05$ ).



**Figura 4.7.** Colonias (arriba) y micromorfología (abajo) de las bacterias (A) Complejo *Bacillus cereus*, (B) *Pseudomonas koreensis* y (C) *Serratia* sp.

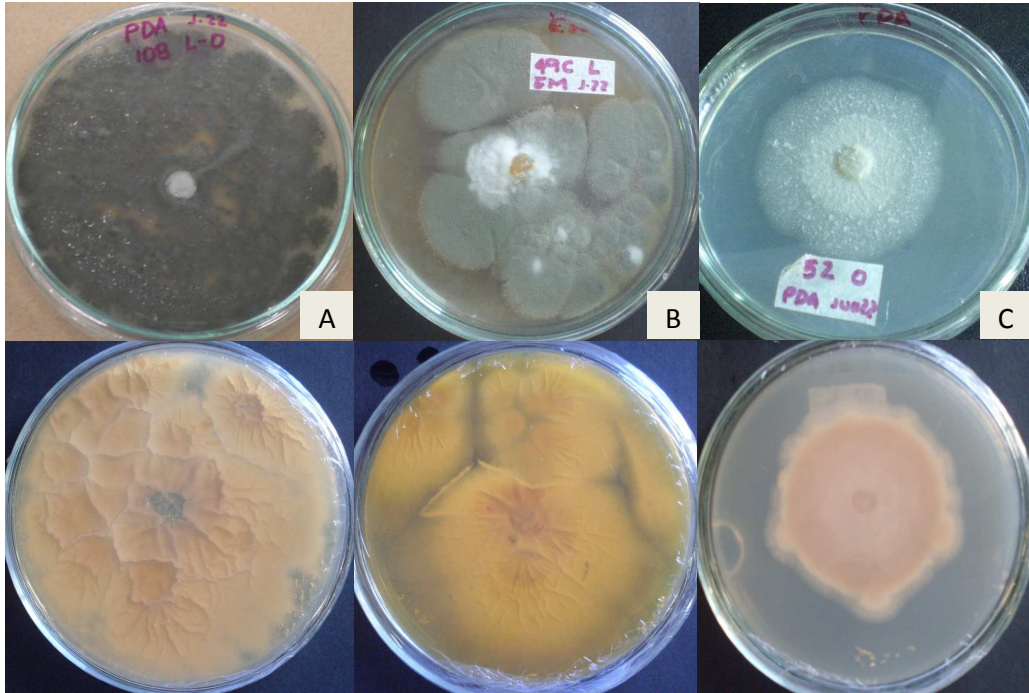


**Figura 4.8.** Colonias de *Bacillus* creciendo en Agar Mossel. Nótese el halo creciendo al rededor de las colonias lo cual indica la producción de lecitinasa.

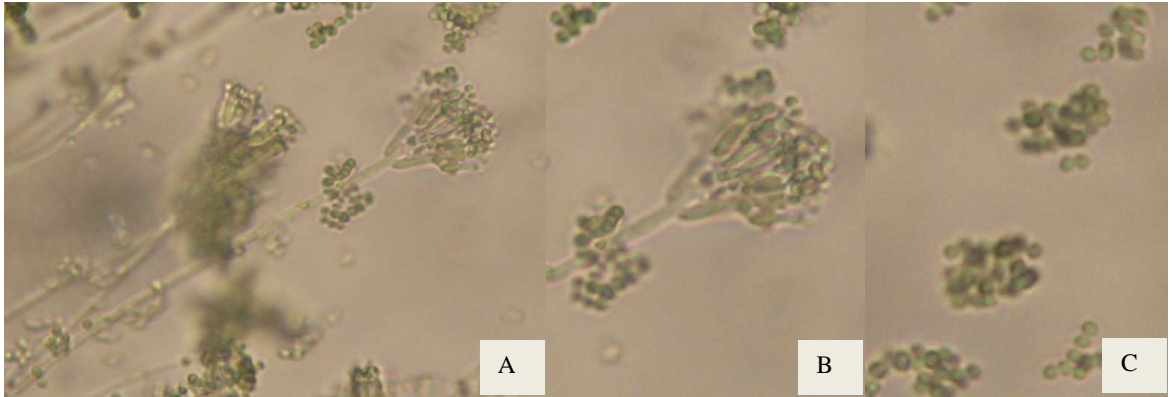


**Figura 4.9.** Características micromorfológicas del hongo *Aspergillus fumigatus*. (A) Conidióforos y vesículas (800X), (B) Agrupación de conidióforos (400X), (C) Detalles de las vesículas y esterigmas (1000X), (D) y (E) Conidias (1000X y 1200X).

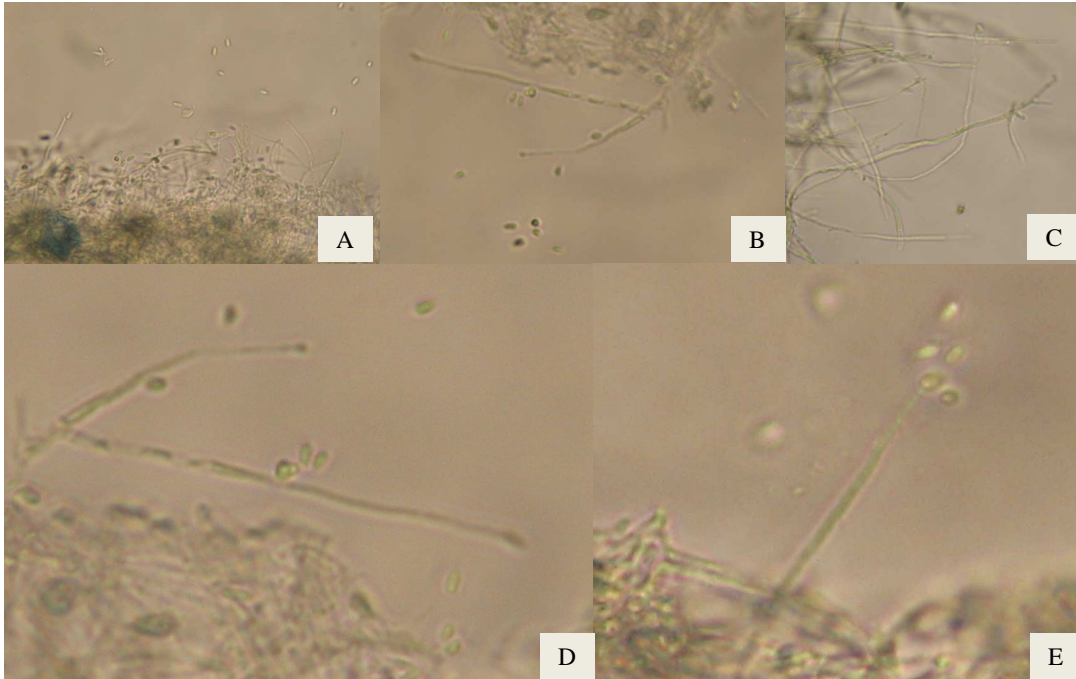




**Figura 4.10.** Colonias de los hongos (A) *Aspergillus fumigatus*, (B) *Penicillium griseofulvum* y (C) *Plectosphaerella cucumerina*. Arriba: dorso; Abajo: reverso.



**Figura 4.11.** Características micromorfológicas del hongo *Penicillium griseofulvum*. (A) y (B) Conidióforos con verticilios (800X y 1200X), (C) Conidias (1200X).



**Figura 4.12.** Características micromorfológicas del hongo *Plectosphaerella cucumerina*. (A) Micelio y conidias (400X), (B) Conidióforos (800X), (C) Agregación de hifas (800X), (D) y (E) Detalles de conidióforos y conidias individuales y en cabezas (1200X).

## CONCLUSIONES

- El proceso de aislamiento de microorganismos en los medios de cultivo selectivos para los diferentes grupos funcionales, permitió visualizar una alta diversidad y abundancia de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla.
- Con base en los morfotipos de las colonias creciendo en los medios de cultivo selectivos, se purificaron en total 109 cepas microbiales, distribuidas en 25 aislamientos de FBN, 6 de FIT, 20 de PSM, 30 de PROT y 28 de CEL (9 hongos y 100 bacterias).
- Los métodos moleculares utilizados para la identificación taxonómica de los microorganismos aislados de la rizosfera de las plantas de vainilla y su evaluación mediante pruebas bioquímicas *in vitro*, permiten afirmar que:
  - Los solubilizadores de fosfato inorgánico más efectivos correspondieron a dos bacterias, una filogenéticamente relacionada con el género *Serratia* y la otra identificada como *Pseudomonas koreensis*.
  - El solubilizador de fosfato orgánico más eficiente fue un hongo de la especie *Plectosphaerella cucumerina*.
  - Los microorganismos celulolíticos más eficientes fueron los hongos *Penicillium griseofulvum* y *Aspergillus fumigatus*.
  - Los microorganismos proteolíticos/amonificantes más eficientes fueron identificados como bacterias del complejo *Bacillus cereus* y *Serratia* sp.
  - Entre los microorganismos fijadores asimbióticos de nitrógeno sobresalieron tres cepas de *Pseudomonas koreensis*, que crecieron rápida

y abundantemente en el medio selectivo, siendo además confirmada la presencia del gen *nifH*, responsable de esta actividad metabólica.

- La caracterización morfológica de los hongos y las pruebas bioquímicas realizadas a las bacterias más eficientes dentro de cada grupo funcional evaluado, corroboró la identificación molecular.
- Los protocolos utilizados permitieron detectar un buen número de microorganismos con alto potencial para ser usados como biofertilizantes. La efectividad que estos microorganismos puedan tener sobre la nutrición y el crecimiento de las plantas de vainilla (u otras plantas) deberá ser evaluado experimentalmente.