



**Benemérita Universidad
Autónoma de Puebla**



**Facultad de Ingeniería Química
Colegio de Ingeniería Ambiental**

**BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN
ESQUEJES DE VAINILLA**

Tesis presentada para obtener el título de:

Licenciatura en Ingeniería Ambiental

Presenta:

Lluvia Eliza Palacios Tenorio

Director:

José Carlos Mendoza Hernández

Director externo:

Dra. Ma.del Carmen Ángeles González Chávez

Diciembre 2014

ÍNDICE GENERAL

Índice general	II
Diseño de la investigación	1
Planteamiento del problema	1
Justificación	2
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
Hipótesis	3
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	4
1.1 Importancia de la vainilla en México	5
1.2 Bacterias promotoras del crecimiento de plantas (BPCP)	5
1.2.1 Métodos directos de promoción del crecimiento de plantas	7
1.2.1.1 Nitrógeno (N), fósforo (P) y hierro (Fe)	7
1.2.1.2 Fitohormonas	8
1.2.2 Métodos indirectos de promoción de crecimiento de plantas	9
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	10
2.1 Ubicación del experimento	10
2.2 Diseño experimental	11
2.3 Análisis estadístico	12
2.4 Etapas del trabajo de campo	12
2.4.1 Preparación de esquejes	12
2.4.2 Desinfección de los esquejes	13
2.4.3 Plantación de esquejes	13

2.4.4	Preparación del inóculo	13
2.4.5	Inoculación de esquejes	14
2.4.6	Mediciones	14
2.4.7	Muestreo	15
2.5	Determinación de concentración de Fe, Cu, Mn, Zn, K, P, clorofila en laboratorio	16
2.5.1	Determinación de clorofila	16
2.5.2	Determinación de peso fresco, peso seco y área foliar	17
2.5.3	Determinación de Fe, Cu, Mn, Zn, K y P	18
2.5.3.1	Preparación de la muestra	18
2.5.3.2	Determinación de Fe, Cu, Mn y Zn	19
2.5.3.3	Determinación de P	20
2.5.3.4	Determinación de K	20
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		22
3.1	Longitud promedio de los brotes en esquejes de vainilla	22
3.2	Número de nudos y hojas en brotes	23
3.3	Número de raíces adventicias en brotes	24
3.4	Incremento promedio en la longitud de brotes	25
3.5	Peso fresco	26
3.6	Peso seco	27
3.7	Diferencia de pesos	28
3.8	Área foliar	29
3.9	Clorofila a, b y total	30
3.10	Concentración de Fe	31

3.11	Concentración de Zn	32
3.12	Concentración de Cu	33
3.13	Concentración de K	34
3.14	Concentración de Mn	35
3.15	Concentración de P	36
3.16	Número de raíces de suelo	37
3.17	Longitud promedio de raíces de suelo	38
	Conclusiones	39
	Bibliografía	40

Índice de figuras

Fig. 1 Localización del municipio de Cazonos de Herrera, imagen obtenida con Google Earth	10
Fig. 2 Selección y preparación de los esquejes de vainilla.	12
Fig. 3 Montaje final de los esquejes con sus tutores.	13
Fig. 4 Esquejes etiquetados con el lote, número de repetición, cepa bacteriana y clave	
Fig. 5 Inoculación de esquejes con la cepa correspondiente	14
Fig. 6 Brote en esqueje T6R10 inoculado con cepa <i>Enterobacter</i> sp. (N55C2) a) 10 cm de longitud en el día 33, b) 31.5 cm de longitud en esqueje en el día 50	15
Fig. 7 Enfermedades causadas por hongo en esquejes de vainilla a) Pudrición de tallo y b) marchitamiento en hoja de esquejes de vainilla afectados por hongo	15
Fig. 8. Botellas con 10 mL de acetona y muestras de hojas etiquetadas según el tratamiento y la repetición.	16
Fig. 9. Preparación de las muestras para determinación de clorofila. a) Arena de mar utilizada para facilitar el molido, b) vertido de las muestras en mortero, c) molido y d) filtración.	16
Fig. 10. Proceso de determinación de clorofila. a) Lectura de absorbancia del blanco (acetona 80%) b) vertido de los filtrados en celdas de vidrio, c) colocación de celdas en espectrofotómetro y d) registro de lecturas obtenidas con espectrofotómetro UV-Visible Cary 50.	18
Fig. 15 Espectrofotómetro de AA a llama Perkin Elmer AS 3100	19
Fig. 16 Fotómetro de llama JENWAY PFP7	21
Fig.17 Longitud de los brotes en esquejes de vainilla de cada tratamiento en diferentes periodos de tiempo.	22
Fig. 18 Número de nudos y hojas de los brotes en esquejes de vainilla según el tratamiento y días posteriores a la inoculación.	23
Fig. 19 Número de raíces adventicias en brotes de esquejes de vainilla según el tratamiento y días posteriores a la inoculación.	24

- Fig. 20 Incremento promedio en la longitud de los brotes en esquejes de vainilla inoculados con diferentes cepas bacterianas y sin inocular. 25
- Fig. 21 Peso fresco de los brotes en esquejes de vainilla según el tratamiento y finalizados los 162 días de observación. 26
- Fig. 22 Peso seco de los brotes en esquejes de vainilla según el tratamiento y finalizados los 162 días de observación. 27
- Fig. 23 Diferencia entre los pesos frescos y secos de los brotes en esquejes de vainilla según el tratamiento y finalizados los 162 días de observación. 28
- Fig. 24 Área foliar de los brotes en esquejes de vainilla según el tratamiento y finalizados los 162 días de observación. 29
- Fig. 25 Concentración de clorofila a, clorofila b y clorofila total en brotes de esquejes de vainilla en los diferentes tratamientos. 30
- Fig. 26 Concentración de Fe en brotes de esquejes de vainilla en los diferentes tratamientos. 31
- Fig. 27 Concentración de Zn en brotes de esquejes de vainilla en los diferentes tratamientos. 32
- Fig. 28 Concentración de Cu en brotes de esquejes de vainilla en los diferentes tratamientos. 33
- Fig. 29 Concentración de K en brotes de esquejes de vainilla en los diferentes tratamientos. 34
- Fig. 30 Concentración de Mn en brotes de esquejes de vainilla en los diferentes tratamientos.
- Fig. 31 Concentración de P en brotes de esquejes de vainilla en los diferentes tratamientos. 35
- Fig. 32 Número promedio de raíces de suelo en esquejes de vainilla según el tratamiento. 36
- Fig. 33 Longitud promedio de raíces de suelo en esquejes de vainilla según el tratamiento. 37

BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN ESQUEJES DE VAINILLA

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La vainilla es un cultivo de gran importancia económica y social en Veracruz, México. Regiones como Papantla se han dedicado por años a la producción y comercialización de la vainilla. Su uso en la elaboración de alimentos, bebidas, medicinas, cigarros, licores y perfumes han hecho de la vainilla una de las especias más caras y demandadas por el mercado internacional.

Según los datos proporcionados por la Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTATS, 2011), la vainilla es un producto destinado tradicionalmente al mercado externo, siendo los principales el estadounidense y el europeo. El valor de la producción de vainilla en México en 2009 fue de 3,01 millones de pesos y 82% de las exportaciones totales del país fueron absorbidas por Estados Unidos.

Diversos factores limitan el cultivo de la planta *Vanilla planifolia*, su producción local y posterior exportación, lo que coloca a México (sitio de origen) detrás de Madagascar e Indonesia como principales productores de la vainilla.

Esta baja competitividad de la vainilla mexicana y su disminución en la participación en el mercado internacional se atribuye a los siguientes factores: altos costos de producción debido a la baja polinización natural de la flor, enfermedades y plagas que generan bajos rendimientos del cultivo y competencia con saborizantes artificiales.

Sin embargo, la calidad ofrecida por la vainilla natural sigue siendo ampliamente buscada en el mercado, ejerciendo presión sobre los productores de vainilla para identificar aquellas posibles causas de la variación en la producción de la flor y el fruto, y

mejorar el rendimiento y productividad de los cultivos, aumentando al mismo tiempo la rentabilidad para el productor.

V.planifolia, como las demás orquídeas, necesita de ciertas condiciones ambientales para su adecuado desarrollo y crecimiento. En México, la región conocida como Totonacapancuenta con las condiciones ambientales adecuadas para el cultivo de la vainilla (intensidad de la luz solar, temperatura, humedad y altitud). La región del Totonacapan comprende principalmente municipios del norte de Veracruz, como Papantla, Poza Rica, Cazonos de Herrera, entre otros, siendo en total 15 municipios.

JUSTIFICACIÓN

Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas (BPCP) son aquellas que se encuentran en la rizósfera de diferentes especies vegetales y que mediante la solubilización de nutrientes, producción de fitohormonas y actuación como agentes de biocontrol naturales pueden generar impactos benéficos sobre el desarrollo y crecimiento de las plantas.

La capacidad de las BPCP de aumentar la disponibilidad de nutrientes como P y N, producir fitohormonas y reguladores del crecimiento son esenciales para la estimulación del desarrollo de éstas. Esta capacidad ha sido aprovechada en diferentes cultivos para aumentar su rendimiento. La cuantificación de estos parámetros nos permite entender como las bacterias benefician el crecimiento de las plantas.

De esta forma, la aplicación de inóculos bacterianos sobre plantas de vainilla permitirá conocer los efectos en el crecimiento de las plantas. Generar posibles soluciones a la disminución de la producción de vainilla en Totonacapan es de gran importancia, es por esto, que conocer los efectos a corto y largo plazo de la inoculación bacteriana en plantas de vainilla nos permitirá evaluar los cambios producidos en el desarrollo de éstas y generar posibles bases para una generación de técnicas más eficientes y con menores costos para la producción de vainilla. Pocos estudios se han hecho sobre la interacción de las rizobacterias y la orquídea *Vanillaplanifolia*, por lo que existe la oportunidad de

analizar estas interacciones y determinar su efecto en el crecimiento de plantas de vainilla.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto en el crecimiento de esquejes de vainilla inoculadas con bacterias promotoras del crecimiento aisladas y seleccionadas de la rizósfera de vainilla.

Objetivos específicos:

- Cuantificar el crecimiento de esquejes de vainilla inoculadas con BPCP.
- Analizar el efecto de las bacterias promotoras del crecimiento en la concentración de P, Fe, Mn, Zn, Cu y K en esquejes de vainilla.

HIPÓTESIS

- El crecimiento en los esquejes de vainilla será mayor en aquellos inoculados con bacterias promotoras del crecimiento que en esquejes de vainilla sin inocular.
- La absorción de nutrientes como P, Fe, Mn, Zn, Cu y K en esquejes de vainilla será mayor por la inoculación con las cepas bacterianas.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

Originaria de la región de México, *Vanillaplanifolia* es una orquídea trepadora apreciada globalmente por la vainilla. Este saborizante naturalmente obtenido de sus vainas tiene internacionalmente gran importancia económica (Divakaran *et al.*, 2006). Es la segunda especia más cara después del azafrán (Bythrow, 2005). Esta orquídea es nativa de México y creció únicamente en el país por más de dos siglos pues la introducción de esta planta en otras regiones no fue posible debido a la ausencia de agentes específicos de polinización (Sujatha y Bhat, 2010). Desde que los españoles se familiarizaron con el uso de la vainilla durante la conquista de México, la planta de vainilla se propagó a través de todo el mundo y ahora se cultiva en regiones tropicales como Madagascar, Uganda, Papúa Nueva Guinea, Indonesia, India e islas como Tahití (Palama *et al.*, 2010). Indonesia y Madagascar son los mayores productores de vainilla y contribuyen con 90% de la producción mundial. Estados Unidos es el mayor consumidor de vainilla seguido por Alemania, Francia, Canadá, Australia y Japón (Sujatha y Bhat, 2010).

El género *Vanilla* comprende alrededor de 110 especies, distribuidas en diferentes partes tropicales del mundo (Divakaran *et al.*, 2006). El principal obstáculo en el cultivo de la vainilla es la falta de polinización natural, es por eso, que para asegurar la producción de vainilla, en el periodo de floración se lleva a cabo la polinización manual, lo que implica una mayor inversión en mano de obra para el cultivo (Menchaca *et al.*, 2011). La combinación correcta de agua y nutrientes es un prerequisite para mayores rendimientos y obtención de alta calidad en los cultivos. La vainilla se apoya en la humedad del aire para recibir nutrientes, pero las raíces deben estar conectadas al suelo para que la planta sobreviva (Bythrow, 2005), de igual importancia es la sombra parcial (Sujatha y Bhat, 2010) y soporte que recibe esta planta.

1.1 Importancia de la vainilla en México

En México, el cultivo de esta especie representa importancia en el aspecto económico, social y ecológico. Los productores de vainilla enfrentan diversos retos incluyendo el cumplimiento de estándares oficiales y la producción de suficientes plantas para satisfacer la creciente demanda de vainas de vainilla (Tan et al., 2013). Aun cuando se tienen las condiciones climáticas y culturales para el cultivo y manejo de la vainilla, la producción no es suficiente para figurar en el mercado internacional. Esto debido a que existen diferentes factores que limitan la producción, entre ellos están las enfermedades, plagas, poca mecanización y escasa organización para la producción y comercialización del producto (Kelso et al., 2013). El cultivo tradicional de la vainilla se realiza a partir de segmentos cortados de tallo (clones), ocasionando que no se presente variación genética entre individuos. Esta práctica ha causado que las plantaciones sean susceptibles al ataque de plagas y enfermedades, en particular por la pudrición de la raíz causada por *Fusarium batatis* var. *vanillae* Tucker y la antracnosis causada por *Calosporavanillae* (Menchaca et al., 2011).

1.2 Bacterias promotoras del crecimiento de plantas (BPCP)

La interacción de las bacterias con las plantas ha despertado gran interés; ya que pueden ser benéficas, dañinas o neutras y pueden influenciar significativamente el crecimiento de la planta, su desarrollo y productividad (Nadeem et al., 2014). La capacidad de los microorganismos de estimular la germinación y el desarrollo de plantas, promover la absorción de nutrientes y reducir la necesidad de fertilizantes químicos tanto como sea posible (Egamberdiyeva, 2007), ha sido adaptada a diversos cultivos de importancia agrícola e industrial (Tsavkelova et al., 2007). Sin embargo, existe poca investigación relacionada con la mejora de la calidad y productividad de los cultivos, basada en uso de inóculos bacterianos (Kumar et al., 2013).

Las ventajas obtenidas de tales interacciones se deben principalmente a la habilidad de las bacterias de fijar N, antibiosis, mejorar la nutrición mineral y de agua de la planta, producir fitohormonas e incrementar el volumen de la raíz (Tsavkelova et al., 2007), mecanismos que promueven directamente el crecimiento de las plantas. Los

microorganismos que producen estos compuestos benéficos se conocen como bacterias promotoras del crecimiento (BPCP) y se encuentran principalmente en la rizósfera, rizoplano y filoplano (Loredo-Osti et al., 2004). La rizósfera contiene una comunidad microbiana rica, incluyendo hasta 10^{10} bacterias por gramo de suelo y abarcando una gran variedad de grupos taxonómicos (Vargas et al., 2001). Las poblaciones bacterianas presentes en este ambiente son relativamente diferentes a aquellas encontradas en los alrededores, debido a la presencia de exudados radicales (Nadeem et al., 2014). Los exudados son la fuente de carbón más abundante en el suelo y su composición cambia junto con el sistema radical, de acuerdo a la etapa de desarrollo de la planta y de los genotipos. De igual manera, la raíz emite señales que atraen a poblaciones microbianas, especialmente a aquellas capaces de metabolizar los exudados y proliferar en este hábitat microbiano (Vargas et al., 2001). Diferencias en los exudados radicales, la rizodeposición en diferentes zonas y la etapa de crecimiento de la planta son factores que afectan a las poblaciones bacterianas (Farina et al., 2012).

El éxito en la introducción de BPCP depende de su establecimiento y persistencia a lo largo de la estación de crecimiento de la raíz. El desarrollo del sistema radical afecta significativamente a las poblaciones bacterianas del suelo por la disponibilidad de una fuente de carbono, derivada de compuestos orgánicos liberados por la raíz (Loredo-Osti et al., 2004). Estos compuestos consisten en ácidos orgánicos, azúcares, vitaminas, aminoácidos, nucleósidos y carbohidratos (Vargas et al., 2001). Las bacterias demandan también nutrientes minerales, como: Mo, Fe, Ca, Ky Mg, requieren N, pH óptimo para su crecimiento y condiciones favorables de humedad (Loredo-Osti et al., 2004). En la interacción planta-bacteria, las vitaminas pueden influenciar la proliferación de BPCP dentro y alrededor del sistema radical. La producción de vitaminas por las plantas, incluyendo biotina, niacina, piroloquinolinaquinona, ácido pantoténico y tiamina, puede facilitar el crecimiento bacteriano y la síntesis de diversos compuestos (Palacios et al., 2014). Además de la capacidad de colonización, el éxito en la utilización de microorganismos promotores del crecimiento vegetal reside en el estudio de cepas compatibles y específicas a los diversos cultivos y a las condiciones ambientales prevalecientes (Peña y Reyes, 2007).

1.2.1 Métodos directos de promoción del crecimiento de plantas

1.2.1.1 Nitrógeno (N), fósforo (P) y hierro (Fe)

Grandes cantidades de fertilizantes químicos se usan para reemplazar el N y P del suelo, pero pueden ser caros y contaminar el ambiente. Se ha estimado que la eficiencia del fertilizante aplicado es igual o menor a 50% para el N y menor a 10% para P (Turan et al., 2014). Entre los diferentes mecanismos que involucra la mejora del crecimiento de las plantas, la fijación de N biológico es vital y se lleva a cabo por rizobacterias. Aunque, el N₂ se encuentra en la atmósfera en un 78%, no está disponible para el crecimiento de las plantas. El N₂ atmosférico se convierte en formas utilizables para las plantas mediante la fijación biológica de N₂ (FBN) la cual transforma el N a amoníaco (NH₃) mediante microorganismos fijadores de N que usan un complejo enzimático conocido como nitrogenasa (Ahemad and Kibret, 2013). Las BPCP, endófitas o rizosféricas son críticas para el reciclaje de nutrientes, salud de la planta y el mantenimiento de la fertilidad de suelos. Varias bacterias endófitas fijadoras de N, llamadas bacterias endófitas diazótroficas, pueden vivir en los tejidos de las plantas sin causar daño visible a la planta huésped, y, por el contrario, promover el crecimiento de la planta (Montañez et al, 2012).

El P es el segundo nutriente importante limitante del crecimiento después del N, es esencial para el crecimiento, desarrollo de las plantas y es parte de procesos como la fotosíntesis, transferencia de energía, transducción de señales y respiración (Batra et al., 2014). Se encuentra ampliamente en suelos en forma orgánica e inorgánica, a niveles de 400-1200 mg kg⁻¹ de suelo. Las principales reservas de P son rocas y otros depósitos, como apatita y otros minerales primarios (Rodríguez y Fraga, 1999). Con la adición de fosfatos en forma de fertilizante en suelos se pueden formar complejos con Al, Fe o Ca y de esta forma, no están disponibles para la planta (Rodríguez y Fraga, 1999; Ahemad and Kibret, 2013). Los compuestos inorgánicos insolubles de fósforo [Ca₃(PO₄)₂] no están totalmente disponibles para las plantas, pero pueden convertirse, por bacterias solubilizadoras de P, en fosfatos di y monobásicos, formas asimilables para las raíces de las plantas (Vargas et al., 2001). Comúnmente, la solubilización de P inorgánico ocurre

como consecuencia de la acción de enzimas (fosfatasas, fitasas, fosfonatasas y C-P liasas) y de ácidos orgánicos (lactato, malato, oxalato, acetato, succinato, citrato, etc.) sintetizados por las BPCP (Ahemad and Kibret, 2013; Behera et al., 2014). Asimismo, algunas BPCP tienen la capacidad de producir sideróforos, compuestos quelantes de Fe de bajo peso molecular, que tienen afinidad por el Fe y actúan como solubilizadores de éste (mineral/orgánico) bajo condiciones limitadas. Las bacterias productoras de sideróforos tienen mayor afinidad hacia el Fe comparadas con algunos microorganismos patógenos, previniendo así su crecimiento (Ahemad and Kibret, 2013).

1.2.1.2 Fitohormonas

Mediante la producción de reguladores del crecimiento, las BPCP pueden también provocar cambios en el crecimiento de las plantas. Las fitohormonas consisten en auxinas (AIA), citoquininas, giberelinas y etileno, producidas por poblaciones microbianas naturales del suelo (Günes et al., 2013). La producción microbiana de AIA es en la mayoría de los casos dependiente del triptofano y se realiza a través de diferentes vías incluyendo aquellas que funcionan en las plantas (Tsavkelova et al., 2007). El AIA es responsable por la división, ampliación y diferenciación de las células de las plantas y tejidos; tiene una función importante en la formación de la raíz y el xilema. La biosíntesis de auxinas es extensa entre las bacterias asociadas al suelo y a plantas. Su producción es una característica determinante tanto para las BPCP como para los patógenos (Tsavkelova et al., 2007). Bajas concentraciones de AIA pueden estimular la elongación de raíces primarias, mientras que niveles altos de AIA estimulan la formación de raíces laterales, disminuyen la longitud de raíces primarias e incrementan la formación de pelos radicales. Las citoquininas estimulan la división celular de las plantas, controla la diferenciación del meristemo radical, induce la proliferación de pelos radicales, pero inhibe la formación de raíces laterales y elongación de raíces primarias. El etileno es otra fitohormona clave, que inhibe la elongación de la raíz y el transporte de auxinas, promueve la senescencia y abscisión de varios órganos, y conduce a la maduración de frutos (Vacheron et al., 2013).

1.2.2 Métodos indirectos de promoción de crecimiento de plantas

Las BPCP ayudan en la supresión de enfermedades mediante varios modos de acción como antagonismo, competencia por espacio y nutrientes, inducción de la resistencia sistemática (Chithrashree et al., 2011) y producción de compuestos antimicrobianos (Silva et al., 2012). La resistencia sistemática inducida (RSI) se define como un fenómeno mediante el cual una planta exhibe mayor nivel de resistencia a la infección por patógenos después de una estimulación apropiada por bacterias no patógenas (Elsharkawy et al., 2012), y está mediada por las vías reguladas por el ácidojasmónico y el etileno (Gutiérrez y Almaráz, 2007). La RSI se desarrolla como resultado de la colonización de las raíces de una planta por ciertas cepas de BPCP (Harish et al., 2009) y mayor resistencia se expresa a algún patógeno (Harish et al., 2008). Los mecanismos de promoción del crecimiento por las BPCP son complejos e incluye cambios, tanto en el balance microbiano de la rizósfera, como cambios en la fisiología de la planta huésped (Harish et al., 2009). Estos cambios generan reacciones tempranas y fuertes contra patógenos y ataques de parásitos. Esta resistencia puede persistir por largos periodos (Nawrocka y Malolepsza, 2013), convirtiéndose en una estrategia prometedora para el control de enfermedades en plantas (Elsharkawy et al., 2012).

La capacidad para colonizar las raíces es una condición indispensable para que una bacteria se considere como una verdadera BPCP, siendo por tanto esa capacidad un primer paso y un rasgo crucial para la selección de los inóculos microbianos para utilizarse como biofertilizantes, bioplaguicidas, fitoestimuladores o biorremediadores (Peña y Reyes, 2007).

CAPÍTULO II

Metodología

2.1 Ubicación del experimento

El experimento se ubicó en Cazones de Herrera, municipio del estado de Veracruz. Se localiza en la zona norte del Estado, en las coordenadas 20° 42' latitud norte y 97° 18' longitud oeste, a una altura de 10 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con Tuxpan, al este con el Golfo de México, al sur con Papantla, al suroeste con Poza Rica de Hidalgo y al oeste con Tihuatlán como se muestra en la Fig. 1. Tiene clima cálido subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad (48%), cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (35%) y cálido subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (17 %). Temperatura promedio de 25 °C y una precipitación media anual de 2 000 mm.

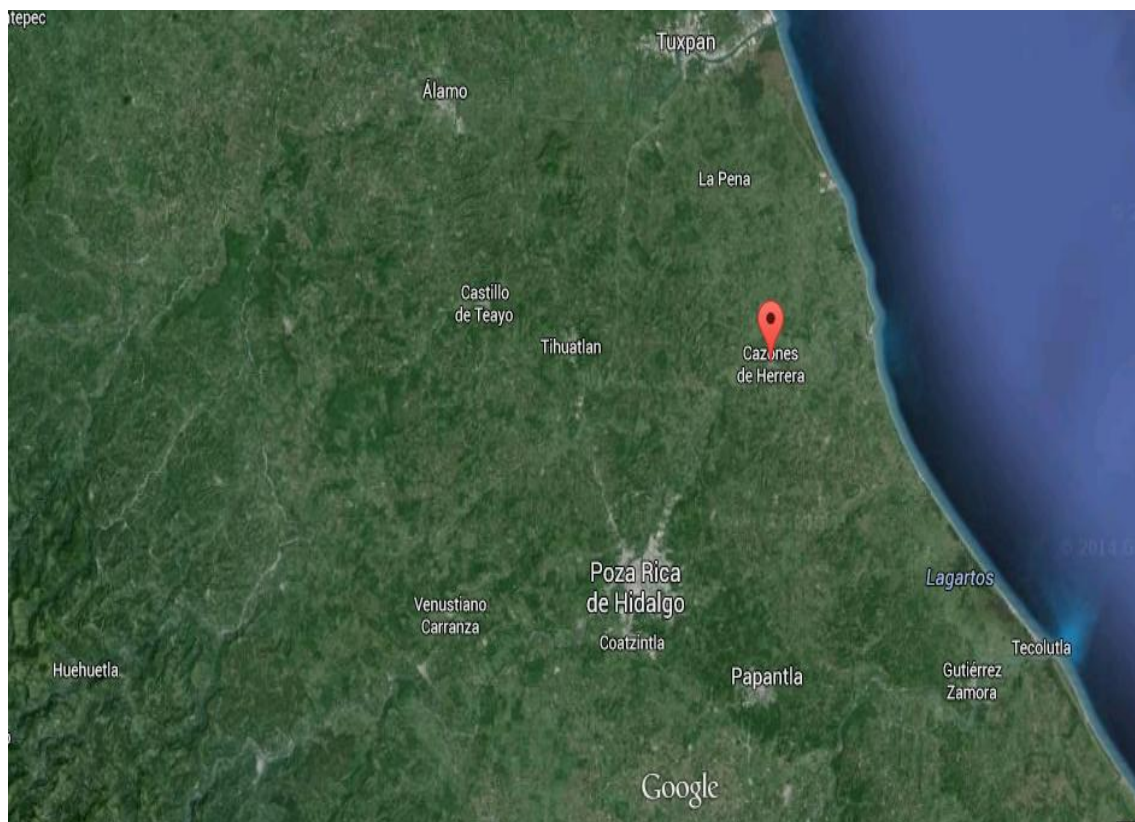


Fig. 1 Localización del municipio de Cazones de Herrera, imagen obtenida con Google Earth.

2.2Diseño experimental

Se realizó un sistema con 11 lotes y 10 repeticiones cada uno. El lote 1 corresponde a las plantas de testigo, sin inoculación con bacterias. Los lotes 2-11 se inocularon con 10 cepas bacterianas diferentes aisladas y seleccionadas de cultivos de vainilla. Se ocuparon 110 unidades experimentales como se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Diseño de experimentos aplicado en el proyecto de investigación.

LOTE	1		2		3		4		5	
	TESTIGO		Bacteriumendo symbiont (N60C1)		Enterobactercloacae (K59C1)		Citrobacterfreundii (K55C1)		Bacteriumendo symbiont (M54C1)	
REPETICIONES	1	6	11	16	21	26	31	36	41	46
	2	7	12	17	22	27	32	37	42	47
	3	8	13	18	23	28	33	38	43	48
	4	9	14	19	24	29	34	39	44	49
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
LOTE	6		7		8		9		10	
	Enterobacter sp.(N55C2)		Pantoeaagglomerans (N53C1)		Serratiamarcescens (N39C2)		Bacteriumsp. (N2C1)		Bacteriumendo symbiont (K20C1)	
REPETICIONES	51	56	61	66	71	76	81	86	91	96
	52	57	62	67	72	77	82	87	92	97
	53	58	63	68	73	78	83	88	93	98
	54	59	64	69	74	79	84	89	94	99
	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
LOTE	11									
	Citrobacterfreundii (M53C1)									
REPETICIONES	101	106								
	102	107								
	103	108								
	104	109								
	105	110								

Las variables cuantificadas fueron la longitud del brote, número de hojas, número de nudos, número de raíces adventicias, número de brotes y posteriormente peso fresco, peso seco, área foliar, longitud de raíz, clorofila a, clorofila b, clorofila total, Cu, Fe, Mn, Zn, K y P.

2.3 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza ANOVA de un factor con la prueba de Tukey-Kramery una confiabilidad de $\alpha < 0.05$, con el programa SPSS.

2.3 Etapas del trabajo de campo

2.3.1 Preparación de los esquejes

Con base en el diseño de experimentos definido previamente, se visitó el vivero Cazones, ubicado en Cazones de Herrera, Veracruz para establecer el experimento con esquejes de vainilla. En el vivero se seleccionaron aquellos esquejes con yemas en buenas condiciones, se cortaron para obtener una longitud promedio entre 75 y 85 cm y se eliminaron las hojas basales para la posterior plantación de los primeros nudos del esqueje como se muestra en la Fig. 2.



Fig. 2 Selección y preparación de los esquejes de vainilla.

2.3.2 Desinfección de los esquejes

Para la eliminación del hongo *Fusarium* los esquejes se sumergieron en una solución de fungicida agrícola CAPTAN con una concentración de 0.5 g L⁻¹.

2.3.3 Plantación de esquejes

Para la plantación se llenaron bolsas negras de 25 cm de ancho x 35 cm de alto al 50% con sustrato Miracle-Gro húmedo. Se colocaron tutores para darle sostén a cada uno de los esquejes y una vez colocados, se llenaron por completo las bolsas con sustrato. Se seleccionó un área con sombra y aireación suficientes para garantizar el crecimiento de las plantas, como se observa en la Fig. 3.



Fig. 3 Montaje final de los esquejes con sus tutores.

2.3.4 Preparación del inóculo

Las bacterias seleccionadas se crecieron en tubos con caldo Luria Bertani (LB) a 30°C durante 24h a 800 rpm. Posteriormente se realizó un crecimiento masivo en 400 mL de caldo LB en matraz Erlenmeyer a 30°C durante 24h y agitación a 800 rpm. Las bacterias se separaron mediante centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos, finalmente el pellet se resuspendió en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4 y ajustó a 0.5 A a 600nm.

2.3.5 Inoculación de esquejes

La inoculación se llevó a cabo con 10 diferentes cepas bacterianas ajustadas a 0.5 A. Se etiquetaron los esquejes según el tratamiento, cepa y número de repetición (Fig. 4). Se tomaron mediciones iniciales: altura (cm), número de hojas y presencia/ausencia de hongo.

Los esquejes se inocularon con 50 mL de la suspensión bacteriana ajustada, realizando hoyos de aproximadamente 15 cm en el sustrato cerca del tallo (Fig. 5). Al día siguiente, se regaron los esquejes con 100 mL de agua cada uno.



Fig. 4 Esquejes etiquetados con el lote, número de repetición, cepa bacteriana y clave.

Fig. 5 Inoculación de esquejes con la cepa correspondiente.

2.3.6 Mediciones

Cada 15 días se tomaron las siguientes mediciones en esquejes: largo del brote, raíces adventicias nuevas, hojas nuevas y nudos nuevos. En la Fig. 6 se muestra un brote en el esqueje 51 inoculado con la cepa *Enterobacter* sp. (N55C2) del cual se registraron las características previamente mencionadas. Asimismo, se reportaron las plantas en las que se observó la presencia de hongo, ya sea en hojas o tallo.



Fig.6 Brote en esqueje T6R10 inoculado con cepa *Enterobacter* sp. (N55C2) a) 10 cm de longitud en el día 33, b) 31.5 cm de longitud en esqueje en el día 50.

2.3.7 Muestreo

Después de 162 días de observación y registro de mediciones en campo, se tomaron diferentes muestras de cada tratamiento para posteriores evaluaciones. Al finalizar la etapa de trabajo de campo el número de esquejes se redujo a 89 unidades debido a la presencia de hongo en las plantas de vainilla, en la Fig. 7 se puede observar el daño causado en diferentes partes de los esquejes de vainilla por hongo.



Fig. 7 Enfermedades causadas por hongo en esquejes de vainilla a) Pudrición de tallo y b) marchitamiento en hoja de esquejes de vainilla afectados por hongo.

2.4 Determinación de concentración de Fe, Cu, Mn, Zn, K, P, clorofila en laboratorio

2.4.1 Determinación de clorofila

Con una perforadora se tomaron 4 discos de diferentes hojas en tres esquejes de cada tratamiento. Las muestras se colocaron en frascos de 30 mL con 10 mL de acetona 80% como se muestra en la Fig. 8 y se almacenaron en oscuridad a -20°C por 42 horas.



Fig. 8. Botellas con 10 mL de acetona y muestras de hojas etiquetadas según el tratamiento y la repetición.

Las muestras se vertieron en un mortero de Ágata y utilizando arena de mar se molieron hasta obtener una mezcla homogénea, se filtraron para separar los restos de arena y partículas en suspensión (Fig. 9).



Fig.9. Preparación de las muestras para determinación de clorofila. a) Arena de mar utilizada para facilitar el molido, b) vertido de las muestras en mortero, c) molido y d) filtración.

De cada filtrado se colocó aproximadamente 1 mL en celdas de vidrio y con un espectrofotómetro UV-Visible Cary 50 se leyeron las absorbancias en las siguientes longitudes de onda: 662 y 645 nm para clorofila a y b, y 652 nm para clorofila total. Se midió la absorbancia de un blanco con acetona 80%, como se muestra en la Fig. 10.

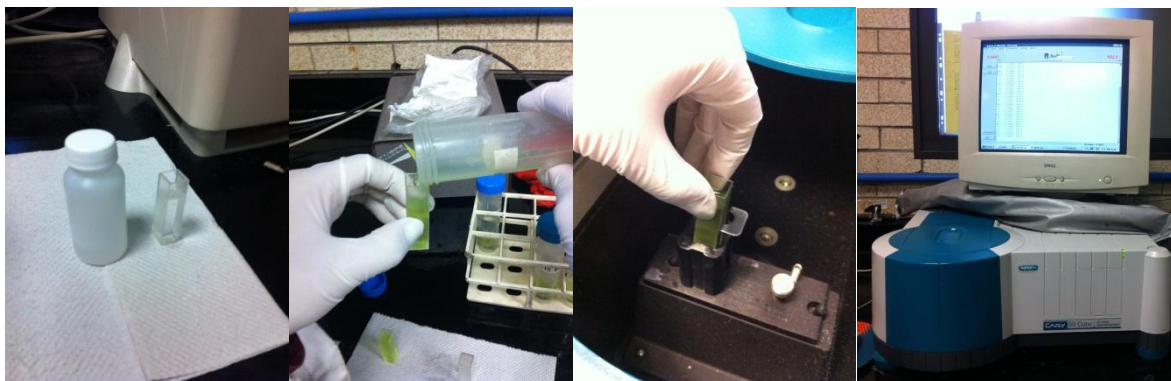


Fig.10. Proceso de determinación de clorofila. a) Lectura de absorbancia del blanco (acetona 80%) b) vertido de los filtrados en celdas de vidrio, c) colocación de celdas en espectrofotómetro y d) registro de lecturas obtenidas con espectrofotómetro UV-Visible Cary 50.

$$\text{Clorofila } a = 11.75A_{662} - 2.350A_{645}$$

$$\text{Clorofila } b = 18.61A_{645} - 3.960A_{662}$$

$$\text{Clorofila total} = 27.8A_{652}$$

En donde:

A_{662} = absorbancia a una longitud de onda de 662 nm

A_{645} = absorbancia a una longitud de onda de 645 nm

A_{652} = absorbancia a una longitud de onda de 652 nm

2.4.2 Determinación de peso fresco, peso seco y área foliar.

Se almacenaron en bolsas de papel 4 hojas por cada esqueje (89 unidades). Se pesaron y se registraron los datos. Se midió el área foliar de cada hoja en un Medidor de Área Foliar (Fijo) LI-3100C (Fig. 11). Las hojas se cortaron en pedazos pequeños, se colocaron en sobres de papel perforados y se secaron a 65°C por 24 horas, como se muestra en la

Fig. 12. Una vez que el material se secó, se molieron las muestras en mortero de Ágata, y se pesaron (Fig. 13).

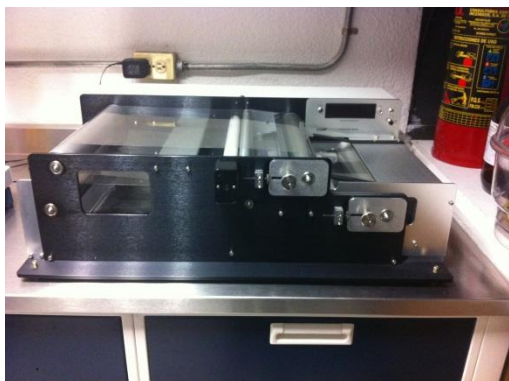


Fig. 11 Medidor de Área Foliar LI-3100C



Fig. 12 Secado de muestras acomodadas en sobres de papel



Fig. 13 Molido de muestras secas en mortero de Ágata.

2.4.3 Determinación de Fe, Cu, Mn, Zn, K y P

2.4.3.1 Preparación de la muestra

Del material seco y molido se colocaron 0.25 g de cada repetición en tubos de vidrio de 50 mL. Se añadió 1 mL de H_2O_2 a cada muestra y posteriormente se agregaron 4 mL de mezcla binaria ($HClO_4:H_2SO_4$, relación 1:4) bajo campana extractora de gases agitando suavemente hasta que cesó la formación de espuma. Se colocaron los tubos en la plancha y se calentó a ebullición hasta obtener la decoloración total de la solución. Se filtró cada solución con papel filtro Whatman No.42 y se aforó a 25 mL con agua desionizada, los filtrados se pasaron a frascos de 30 mL con tapa. El proceso de preparación de muestrasse observa en la Fig. 14.



Fig. 14 Preparación de muestras para determinación de nutrientes. a) Vaciado de las muestras en tubos de vidrio, b) tubos con muestras, c) mezcla binaria, d) adición de mezcla binaria y H_2O_2 a muestras, e) colocación de tubos en plancha, f) aforación a 25 mL y g) filtrado de las muestras.

2.4.3.2 Determinación de Fe, Cu, Mn y Zn

Se leyeron directamente en el extracto obtenido los elementos Cu, Fe, Mn y Zn en un espectrofotómetro de absorción atómica a llama Perkin Elmer AS 3100 (Fig. 15) a 325, 248, 279 y 213 nm respectivamente.



Fig. 15 Espectrofotómetro de AA a llama Perkin Elmer AS 3100

El factor de dilución utilizado fue el siguiente:

$$\text{Factor de dilución} = \frac{25\text{mL}}{1000\text{mL}} \times \frac{1000\text{g}}{0.25\text{g}}$$

$$\text{Cu } \text{mg kg}^{-1} = \text{Factor de dilución} \times A_{325}$$

$$\text{Fe } \text{mg kg}^{-1} = \text{Factor de dilución} \times A_{248}$$

$$\text{Mn } \text{mg kg}^{-1} = \text{Factor de dilución} \times A_{279}$$

$$\text{Zn } \text{mg kg}^{-1} = \text{Factor de dilución} \times A_{213}$$

En donde:

A_{325} = Absorbancia a la longitud de onda 325 nm

A_{248} = Absorbancia a la longitud de onda 248 nm

A_{279} = Absorbancia a la longitud de onda 279 nm

A_{213} = Absorbancia a la longitud de onda 213 nm

2.4.3.3 Determinación de P

Se tomaron 2 mL de cada extracto, se agregaron 2 mL de solución de metavanadato de amonio y 6 mL de agua destilada. Se agitó y dejó en reposo durante 20 min para el desarrollo del color amarillo. Se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro UV-Visible Cary 50 a 470 nm utilizando un blanco como referencia. Se elaboró una curva de calibración con soluciones de concentración y absorbancia conocidas: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ppm y 0, 0.075, 0.092, 0.111, 0.125, 0.142, 0.158, 0.174 y 0.190% de absorbancia respectivamente.

2.4.3.4 Determinación de K

Se realizó una dilución de los extractos de 1:100 para la determinación de K y se leyeron las transmitancias en un Fotómetro de llama JENWAY PFP7 como se muestra en la Fig. 16. Se elaboró una curva de calibración con soluciones de concentración y transmitancias

conocidas: 0, 5, 10, 15, 20, 25 ppm y 0, 20, 42, 61, 81, 100% de transmitancia respectivamente.



Fig. 16 Fotómetro de llama JENWAY PFP7

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron gráficas de barra con las medias y desviaciones estándar de los parámetros y tratamientos evaluados. Para el tiempo se hicieron bloques según los días en que se realizaron las mediciones, siendo el día cero la inoculación. Los gráficos realizados se compararon con los resultados obtenidos en el análisis de varianza (ANOVA).

3.1 Longitud promedio de los brotes en esquejes de vainilla

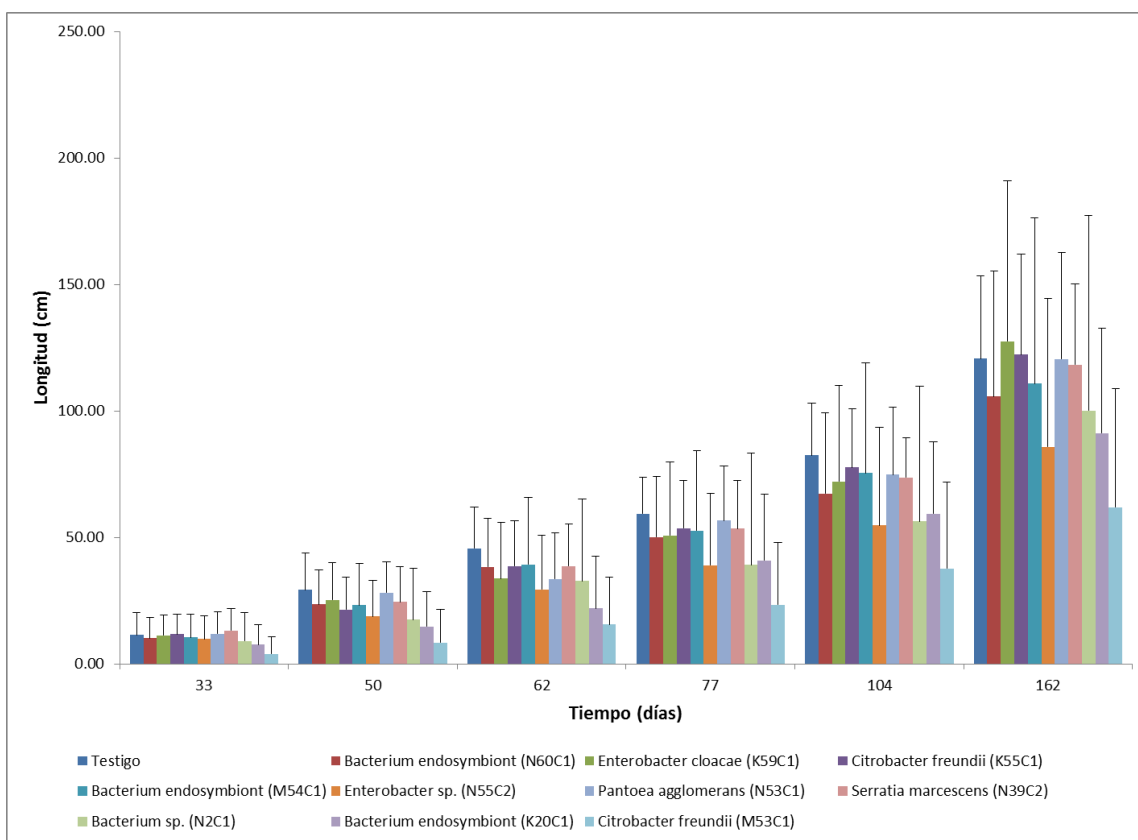


Fig.17 Longitud de los brotes en esquejes de vainilla de cada tratamiento en diferentes periodos de tiempo.

En la Fig. 17 se muestra un gráfica comparativa ente la longitud promedio de los brotes en los 11 lotes durante 162 días de observación. Se puede observar que los brotes en esquejes de vainilla del Tratamiento 1 (testigo) presentaron valores más altos comparados con los brotes de los tratamientos restantes hasta los 104 días después de la inoculación.

Durante las mediciones del día 162 se observó un aumento de 5.79% y 1.4% en la longitud de los brotes de esquejes inoculados con las cepas *Enterobacter cloacae* (K59C1) y *Citrobacter freundii* (K55C1) respectivamente, comparados con el control. El análisis estadístico ANOVA no mostró diferencias significativas entre las longitudes de los tratamientos durante los 162 días de observación.

3.2 Número de nudos y hojas en brotes

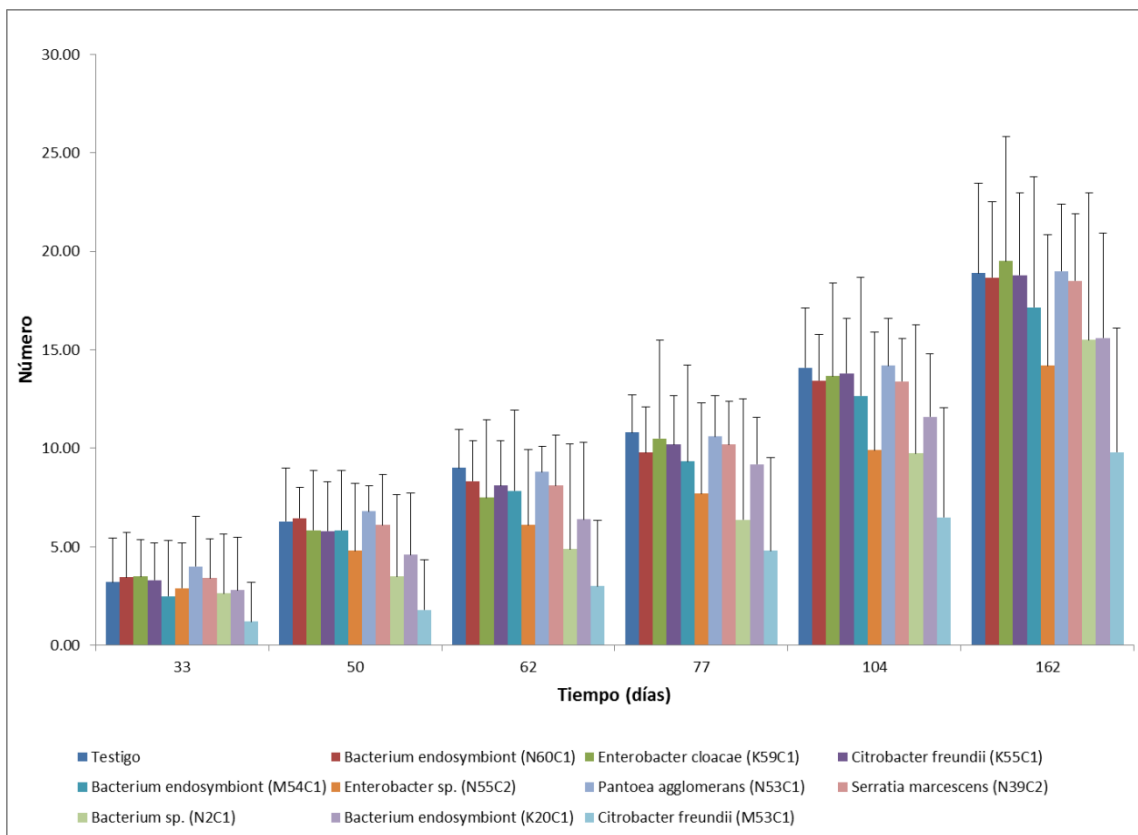


Fig.18 Número de nudos y hojas de los brotes en esquejes de vainilla según el tratamiento y días posteriores a la inoculación.

En la Fig. 18 se comparó el número de nudos y hojas totales en los brotes de los esquejes de vainilla en cada tratamiento. En las mediciones registradas durante los primeros 50 días en el lote inoculado con *Pantoea agglomerans* (N53C1) se observaron valores más altos comparados con el testigo. En las mediciones registradas en los días 62 y 77 el testigo presentó los valores más altos y el día 104 el lote inoculado con *Pantoea agglomerans* (N53C1) mostró nuevamente una ventaja sobre el testigo. En el día

162 los brotes en esquejes del lote 3 inoculados con la cepa *Enterobactercloacae* (K59C1) presentaron en promedio un número más alto de nudos y hojas comparados con el testigo. Con el análisis estadístico ANOVA no se encontraron diferencias significativas entre los esquejes inoculados y el testigo.

3.3 Número de raíces adventicias en brotes

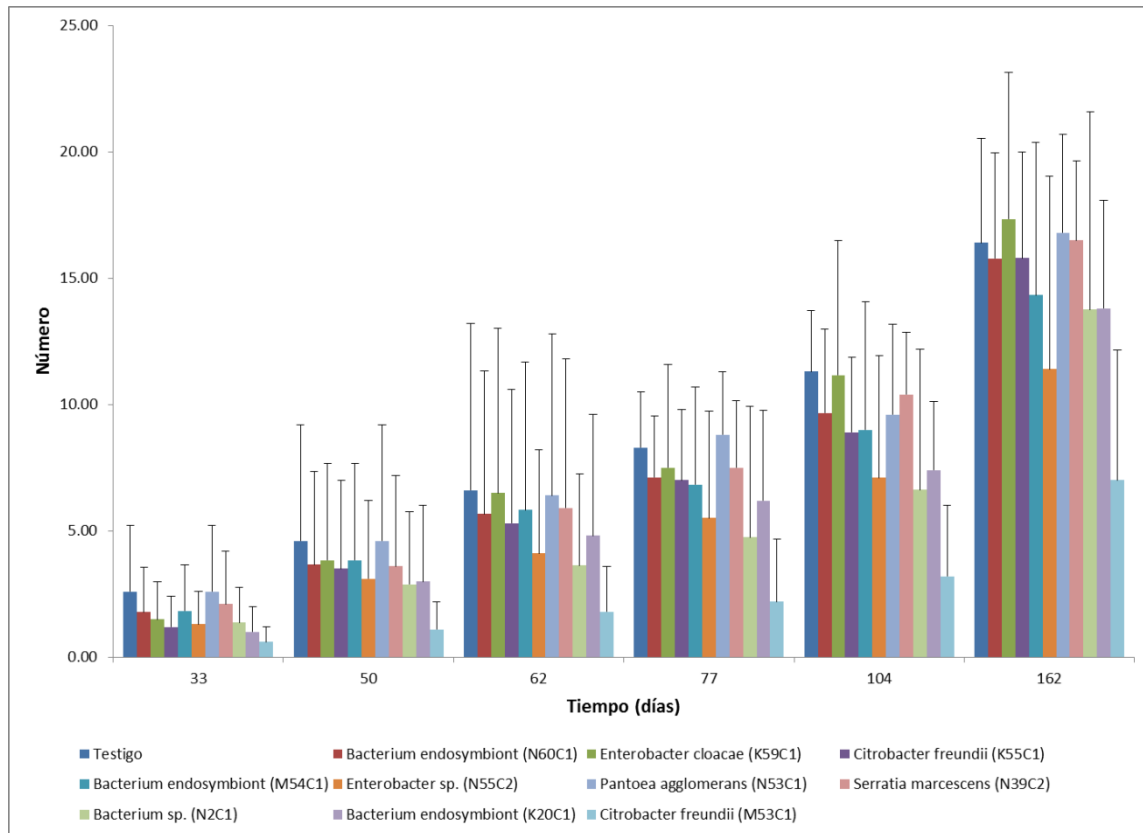


Fig. 19 Número de raíces adventicias en brotes de esquejes de vainilla según el tratamiento y días posteriores a la inoculación.

En la Fig. 19 se observa que el número de raíces adventicias en los tratamientos inoculados no superaron los valores registrados por el testigo durante los primeros 104 días. En las mediciones del día 162 el lote con el valor más alto registrado fue el inoculado con *Enterobactercloacae* (K59C1), sin embargo no se encontraron diferencias significativas.

3.4 Incremento promedio en la longitud de brotes

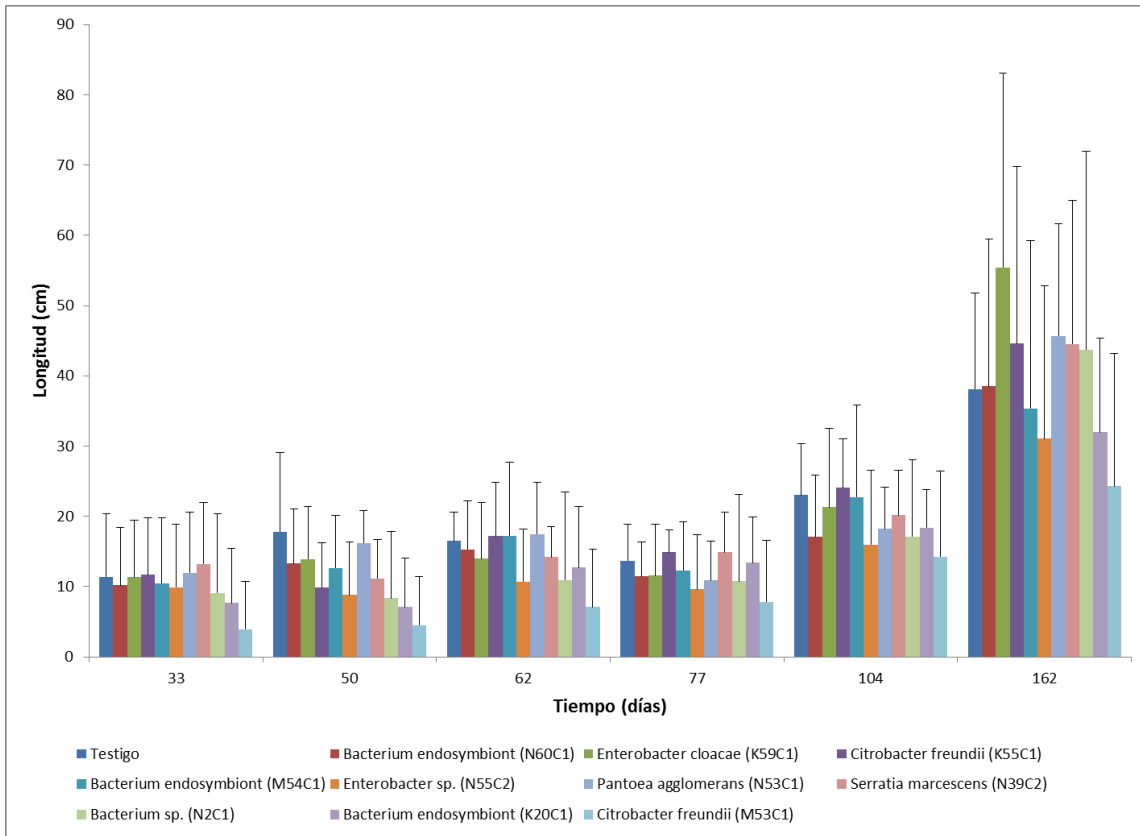


Fig. 20 Incremento promedio en la longitud de los brotes en esquejes de vainilla inoculados con diferentes cepas bacterianas y sin inocular.

En la Fig. 20 se puede observar que el incremento en la longitud de brotes en lotes inoculados, durante los primeros 50 días, no superó el incremento del testigo. En el día 62 los incrementos registrados para los lotes inoculados con *Citrobacterfreundii*(K55C1), *Bacteriumendosymbiont* (M54C1) y *Pantoeaagglomerans*(N53C1) fueron superiores al testigo. Durante los días 77 y 104 el lote inoculado con *Citrobacterfreundii* (K55C1) registró los valores más altos y en el día 162 la longitud de los brotes en esquejes inoculados con la cepa *Enterobactercloacae* (K59C1) presentó un incremento superior al testigo. No se observaron diferencias significativas con la prueba ANOVA.

3.5 Peso fresco

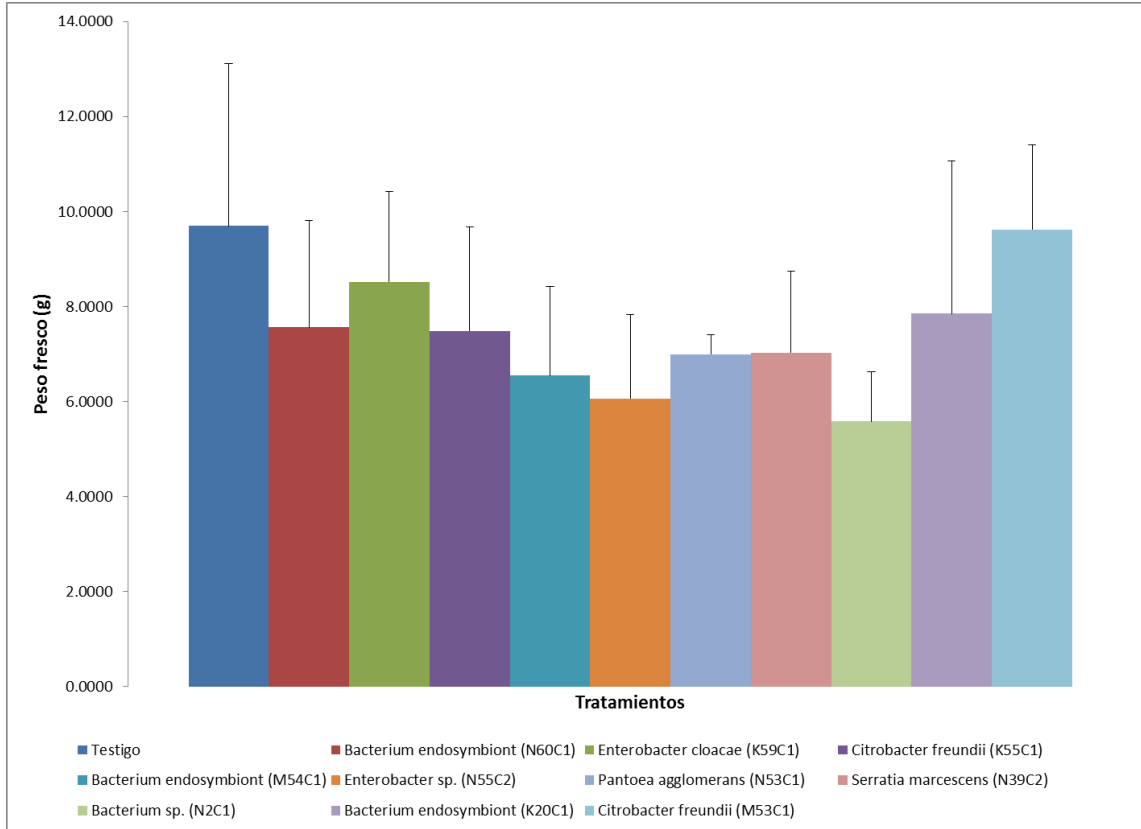


Fig. 21 Peso fresco de los brotes en esquejes de vainilla según el tratamiento y finalizados los 162 días de observación.

Como se puede observar en la Fig. 21 el testigo presentó el promedio de peso fresco más alto y no se registraron diferencias significativas con el análisis de varianza ANOVA entre los lotes inoculados con cepas bacterianas y el testigo.

3.6 Peso seco

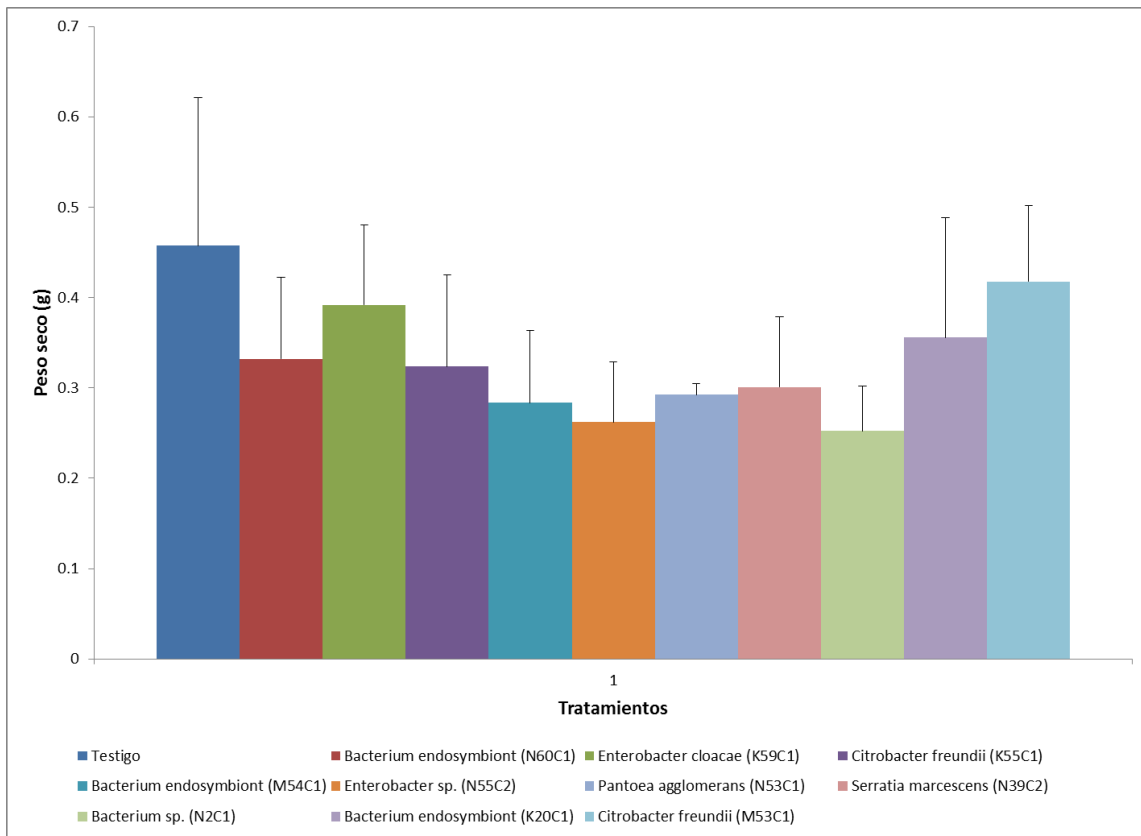


Fig. 22 Peso seco de los brotes en esquejes de vainilla según el tratamiento y finalizados los 162 días de observación.

En la Fig. 22 los valores de peso seco registrados para los lotes inoculados no superaron el peso seco obtenido con el testigo, no se registraron diferencias significativas con el análisis de varianza ANOVA.

3.7 Diferencia de pesos

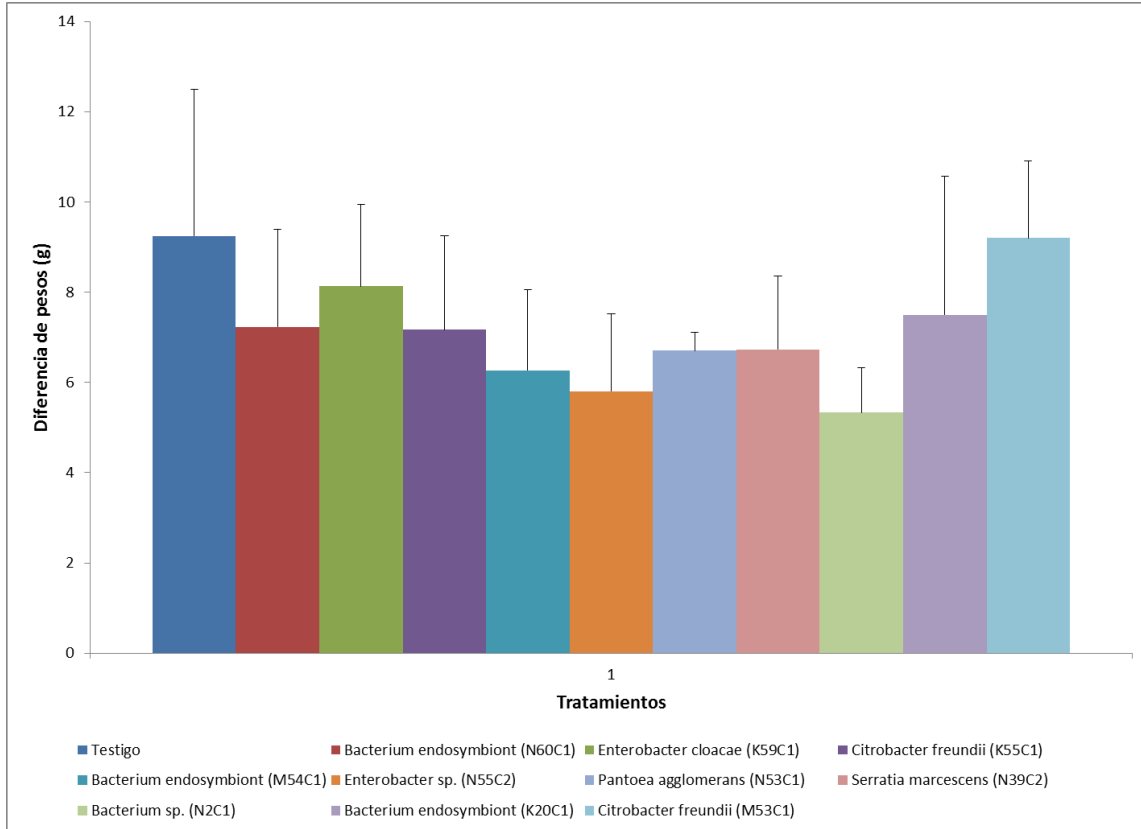


Fig. 23 Diferencia entre los pesos frescos y secos de los brotes en esquejes de vainilla según el tratamiento y finalizados los 162 días de observación.

En la Fig. 23 se puede observar que la diferencia de pesos en el testigo tuvo un valor más alto comparado con los valores registrados por los lotes inoculados. No se registraron diferencias significativas con el análisis de varianza ANOVA.

3.8 Área foliar

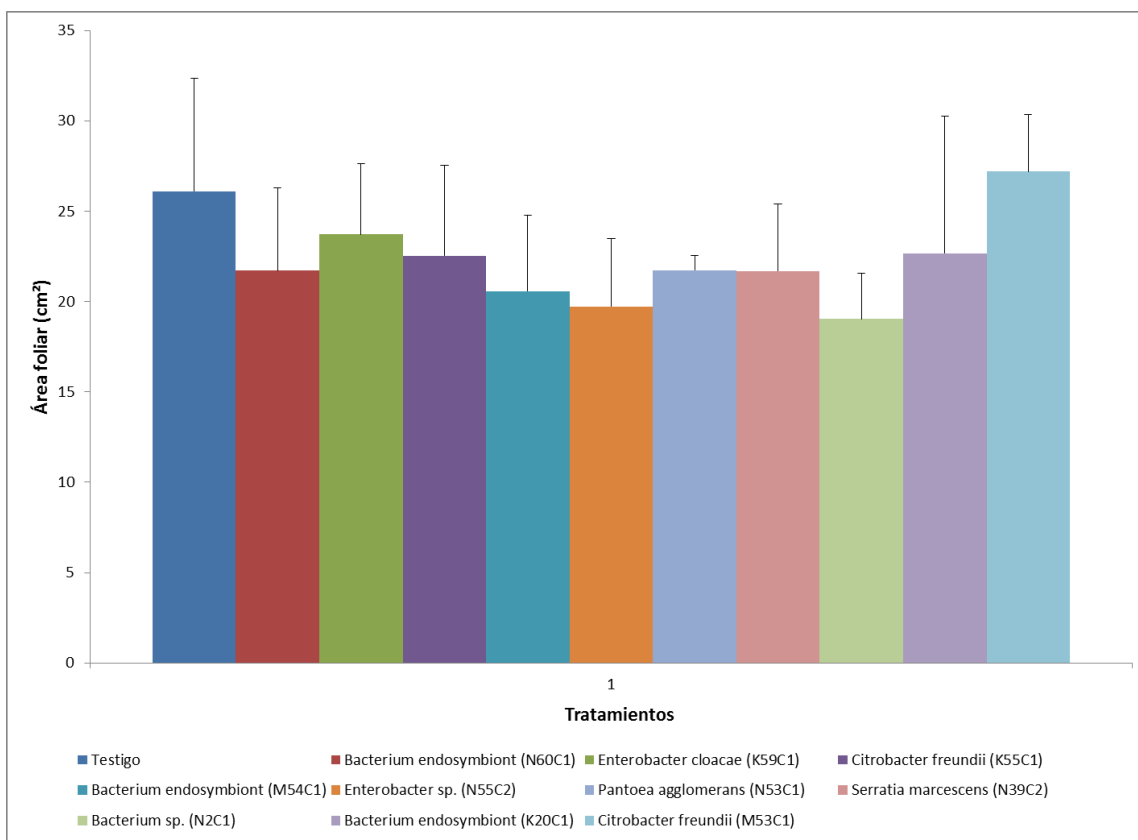


Fig. 24 Área foliar de los brotes en esquejes de vainilla según el tratamiento y finalizados los 162 días de observación.

En la Fig. 24 se graficó el área foliar promedio para cada lote. En el testigo y el lote inoculado con la cepa *Citrobacterfreundii* (M53C1) se observaron valores similares de área foliar (9.2 cm²) finalizados los 162 días de observación. No se encontraron diferencias significativas con el análisis estadístico ANOVA.

3.9 Clorofila a, b y total.

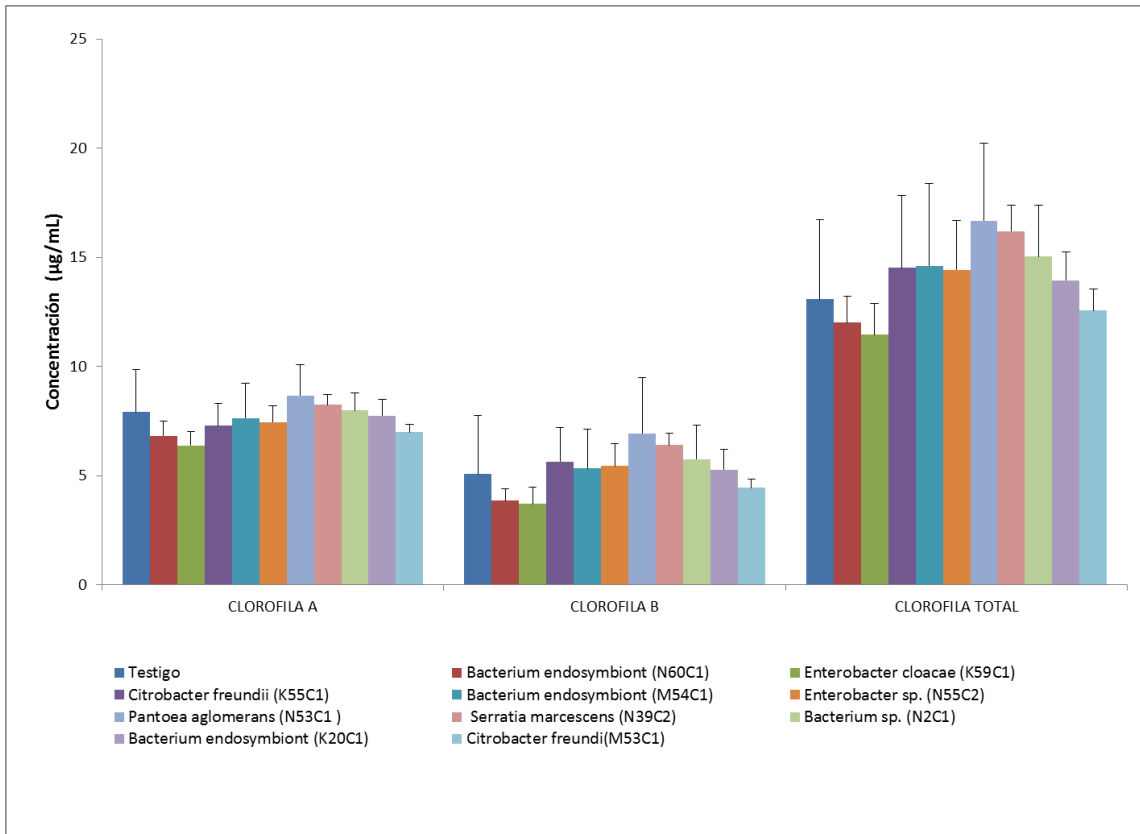


Fig. 25 Concentración de clorofila a, clorofila b y clorofila total en brotes de esquejes de vainilla en los diferentes tratamientos.

En la Fig. 25 se muestra que los valores de clorofila a en los lotes inoculados con las cepas *Pantoeaagglomerans* (N53C1), *Serratiamarcescens* (N39C2) y *Bacteriumsp.* (N2C1) fueron más altos comparados con el testigo. Los lotes inoculados con *Citrobacterfreundii* (K55C1), *Bacteriumendosymbiont* (M54C1), *Enterobactersp.* (N55C2), *Pantoeaagglomerans* (N53C1), *Serratiamarcescens* (N39C2), *Bacteriumsp.* (N2C1) y *Bacteriumendosymbiont* (K20C1) presentaron valores de clorofila b más altos comparados con el testigo. Nuevamente para la clorofila total los lotes inoculados con *Citrobacterfreundii* (K55C1), *Bacteriumendosymbiont* (M54C1), *Enterobactersp.* (N55C2), *Pantoeaagglomerans*(N53C1), *Serratiamarcescens*(N39C2), *Bacteriumsp.* (N2C1) y *Bacteriumendosymbiont* (K20C1) presentaron valores de clorofila total más altos comparados con el testigo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas con el ANOVA.

3.10 Concentración de Fe

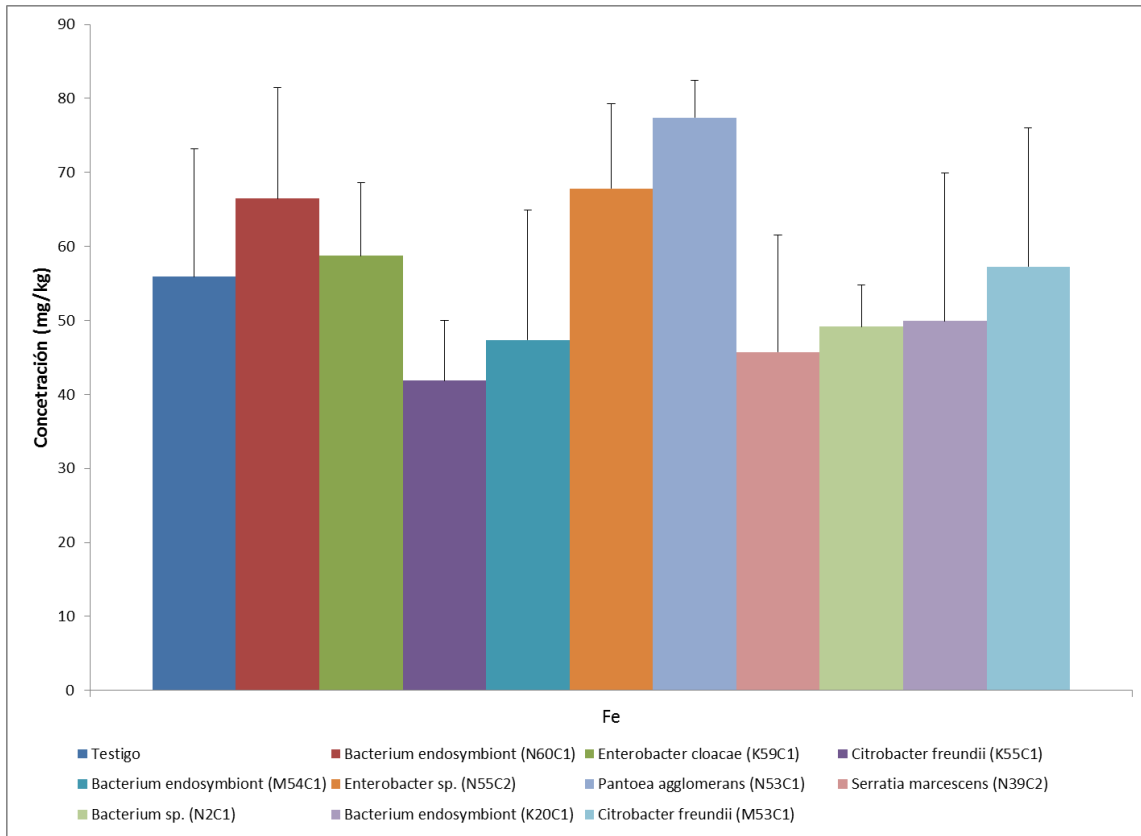


Fig. 26 Concentración de Fe en brotes de esquejes de vainilla en los diferentes tratamientos.

Aunque los tratamientos inoculados con las cepas *Bacteriumendosymbiont* (N60C1), *Enterobactercloacae* (K59C1), *Enterobactersp.* (N55C2) y *Pantoeaagglomerans* (N53C1) registraron concentraciones de Fe (mg kg^{-1}) más altas comparados con el testigo, como se puede observar en la Fig. 26, no se encontraron diferencias significativas con la prueba estadística ANOVA.

3.11 Concentración de Zn

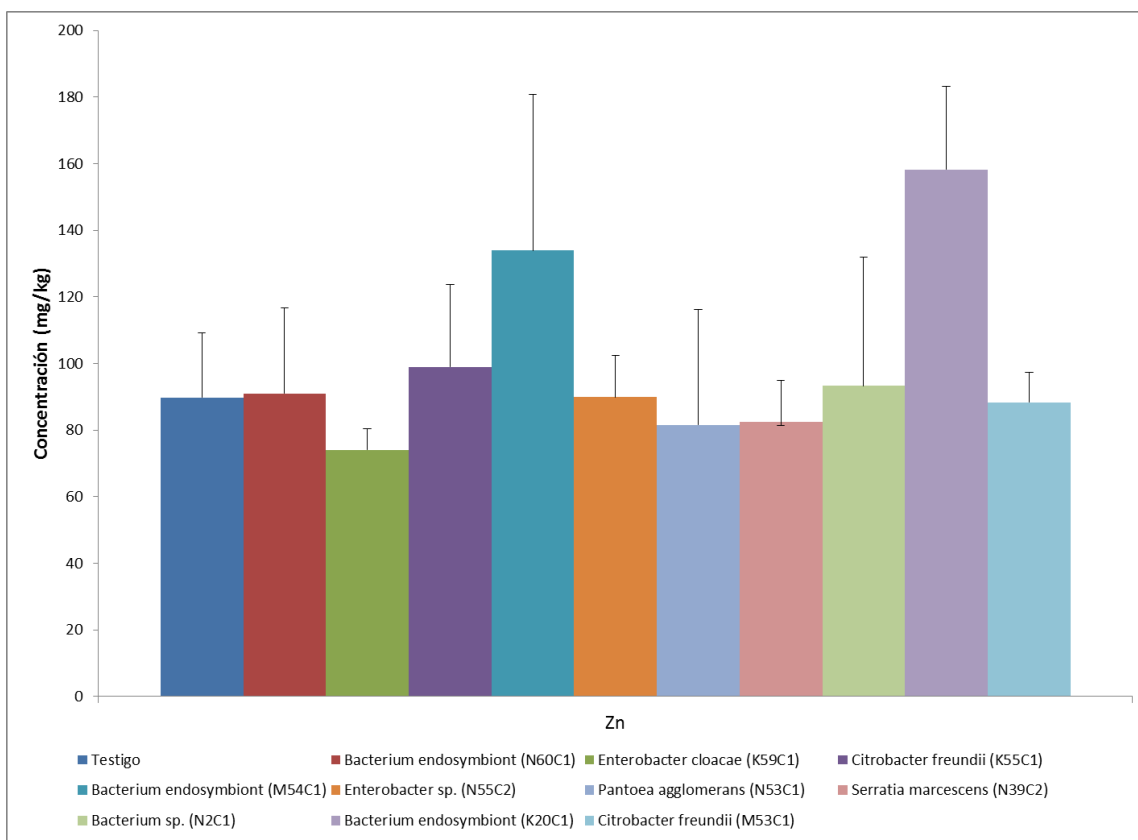


Fig. 27 Concentración de Zn en brotes de esquejes de vainilla en los diferentes tratamientos.

Para la concentración de Zn (mg kg^{-1}), los tratamientos inoculados con las cepas *Bacterium endosymbiont* (M54C1) y *Bacterium endosymbiont* (K20C1) mostraron diferencias significativas $p < 0.05$ comparados con el testigo. Las concentraciones registradas para estos lotes fueron mayores que aquellas determinadas en el testigo como se muestra en la Fig. 27.

3.12 Concentración de Cu

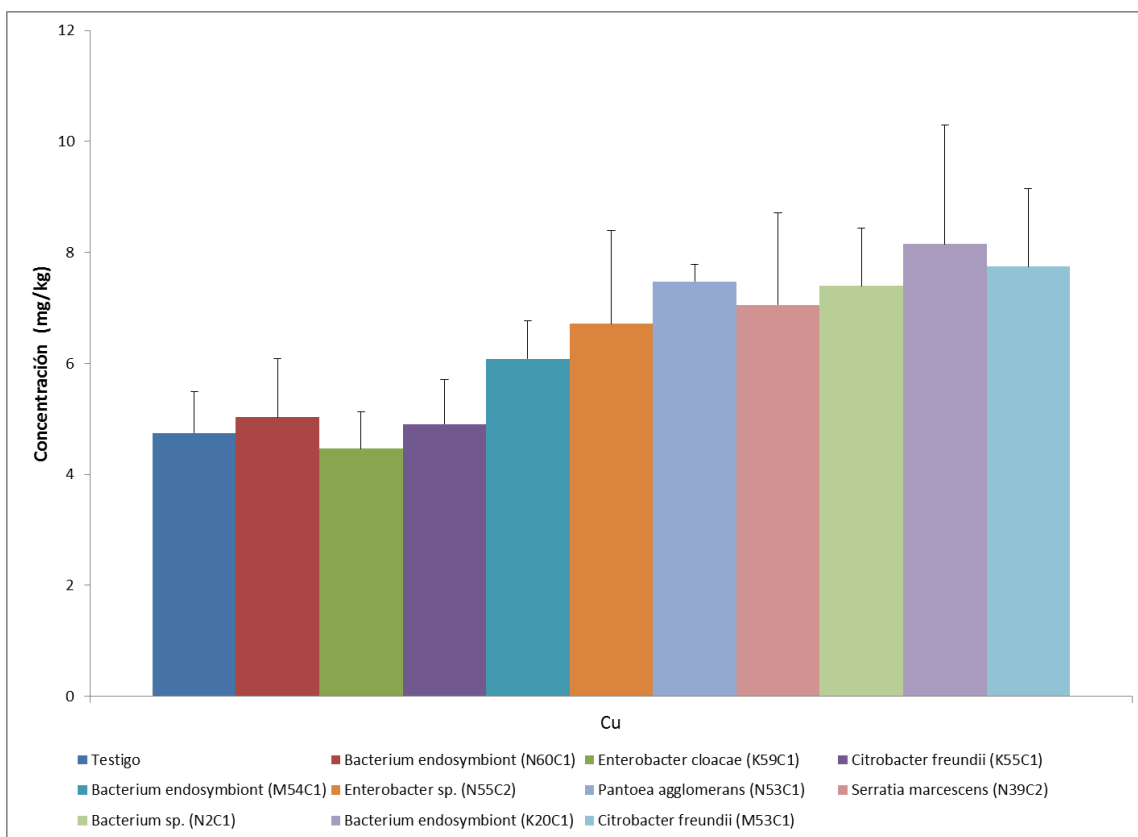


Fig. 28 Concentración de Cu en brotes de esquejes de vainilla en los diferentes tratamientos.

Los valores determinados para la concentración de Cu (mg kg^{-1}) fueron mayores en los lotes inoculados con la cepas *Enterobactersp.* (N55C2), *Pantoeaagglomerans* (N53C1), *Serratiamarcescens* (N39C2), *Bacteriumsp.* (N2C1), *Bacteriumendosymbiont* (K20C1) y *Citrobacterfreundii* (M53C1) comparados con el testigo como se puede observar en la Fig. 28. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre estos tratamientos con la prueba ANOVA.

3.13 Concentración de K

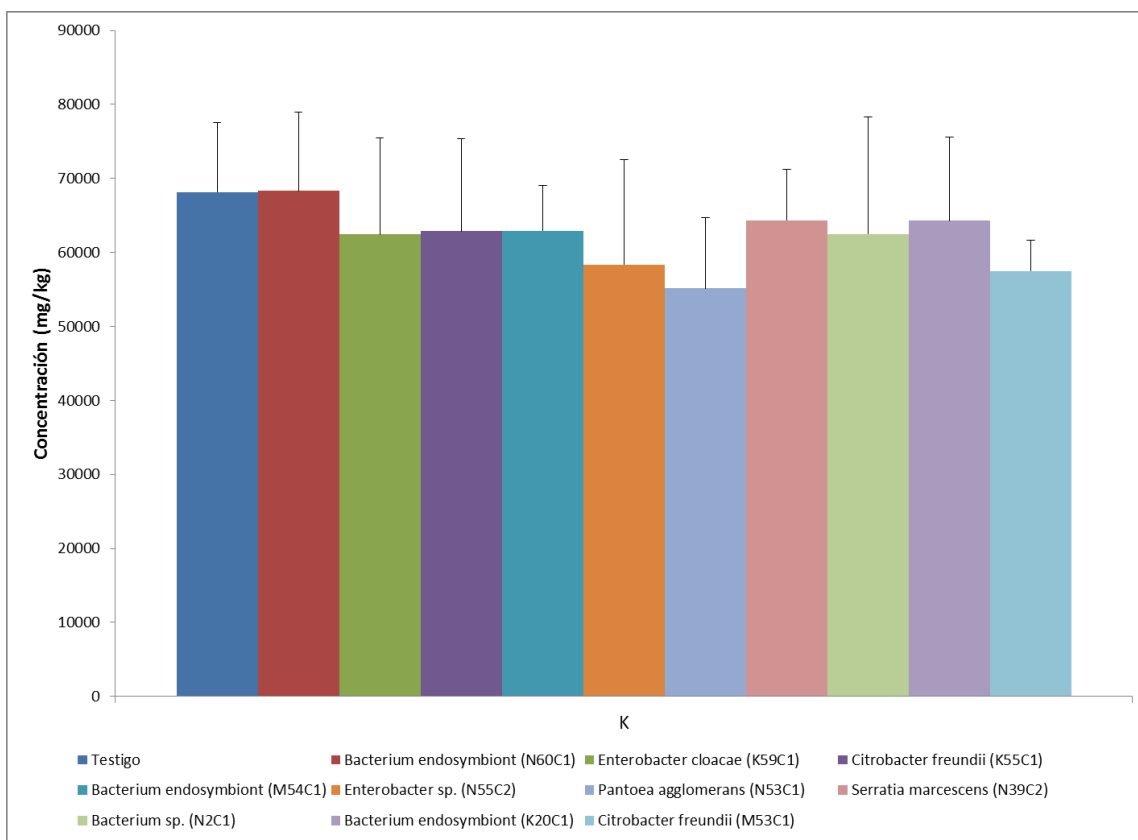


Fig. 29 Concentración de K en brotes de esquejes de vainilla en los diferentes tratamientos.

Como se puede observar en la Fig. 29 la concentración de K (mg kg^{-1}) fue similar para el testigo y el lote inoculado con las cepa *Bacteriumendosymbiont* (N60C1), sin embargo la no se encontraron diferencias significativas con la prueba ANOVA. Las concentraciones registradas por los lotes inoculados con *Enterobactercloacae* (K9C1), *Citrobacterfreundii* (K55C1), *Bacteriumendosybiont* (M54C1), *Enterobactersp.* (N55C2), *Pantoeaagglomerans* (N53C1), *Serratiamarcescens* (N39C2), *Bacterimsp.* (N2C1), *Bacteriumendosymbiont*(K20C1) no superaron el valor obtenido con el testigo.

3.14 Concentración de Mn

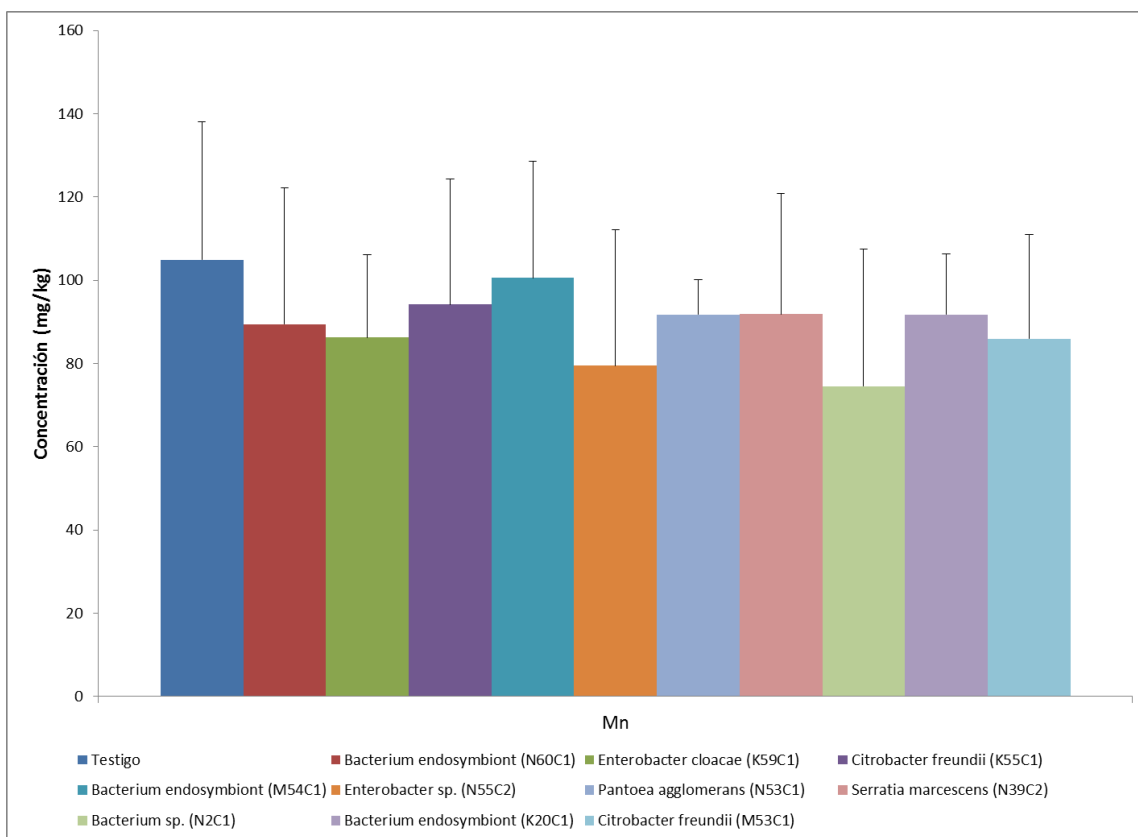


Fig. 30 Concentración de Mn en brotes de esquejes de vainilla en los diferentes tratamientos.

En la Fig. 30 se observa la concentración de Mn (mg kg^{-1}) obtenida para cada tratamiento. El testigo mostró el valor de Mn más alto dentro de los 11 tratamientos. No se encontraron diferencias significativas con la prueba ANOVA.

3.15 Concentración de P

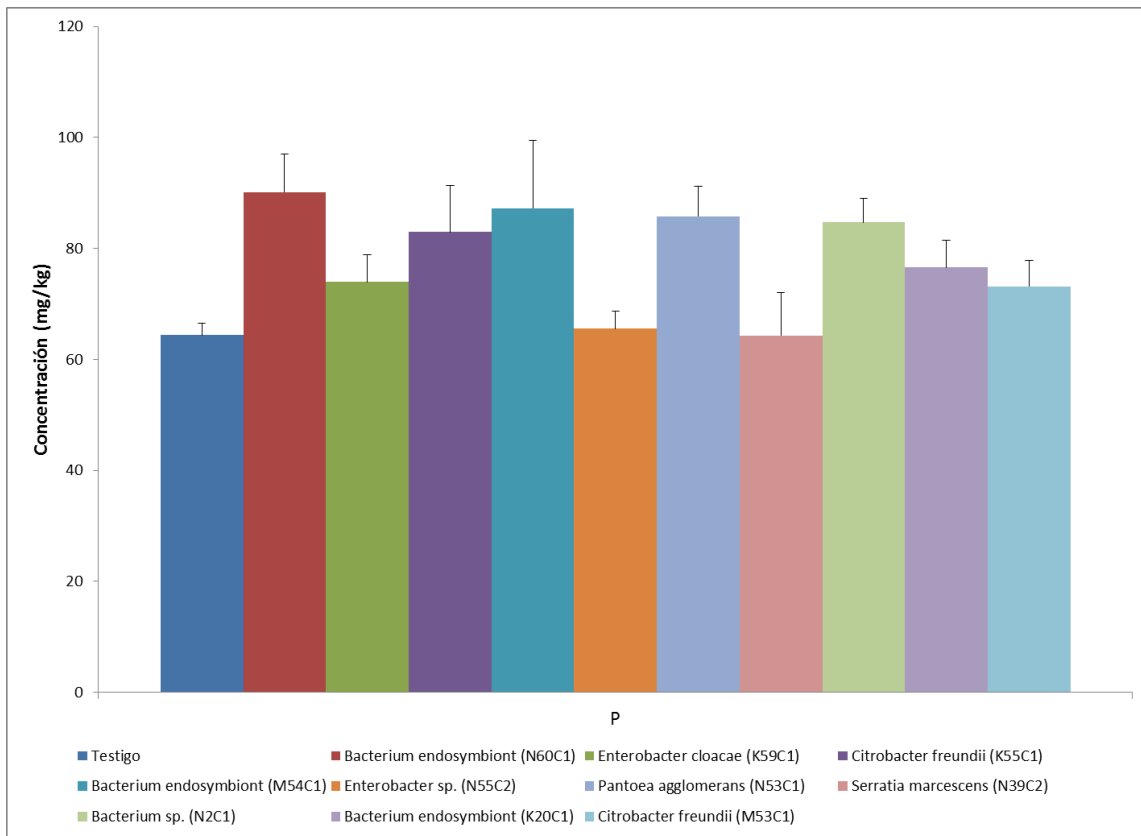


Fig. 31 Concentración de P en brotes de esquejes de vainilla en los diferentes tratamientos.

La comparación de la concentración de P (mg kg^{-1}) se muestra en la Fig. 31, los tratamientos con las cepas *Bacterium endosymbiont* (N60C1), *Citrobacter freundii* (K55C1), *Bacterium endosymbiont* (M54C1), *Pantoea agglomerans* (N53C1), *Bacterium sp.* (N2C1) y *Bacterium endosymbiont* (K20C1) tuvieron concentraciones mayores comparados con el testigo. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre estos tratamientos y el testigo con la prueba ANOVA.

3.16 Número de raíces de suelo

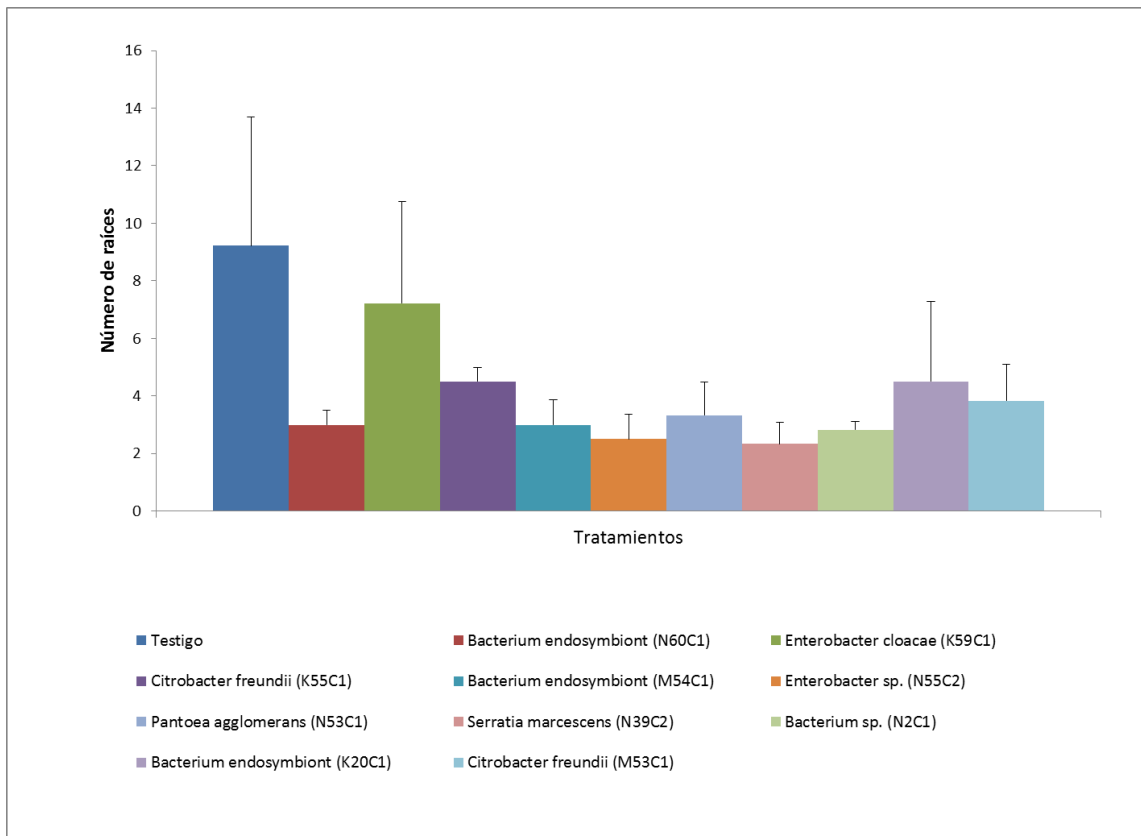


Fig. 32 Número promedio de raíces de suelo en esquejes de vainilla según el tratamiento.

El testigo tuvo en promedio un número de raíces de suelo más alto comparado con los tratamientos inoculados, como se observa en la Fig. 32. No se observaron diferencias significativas con la prueba ANOVA.

3.17 Longitud promedio de raíces de suelo

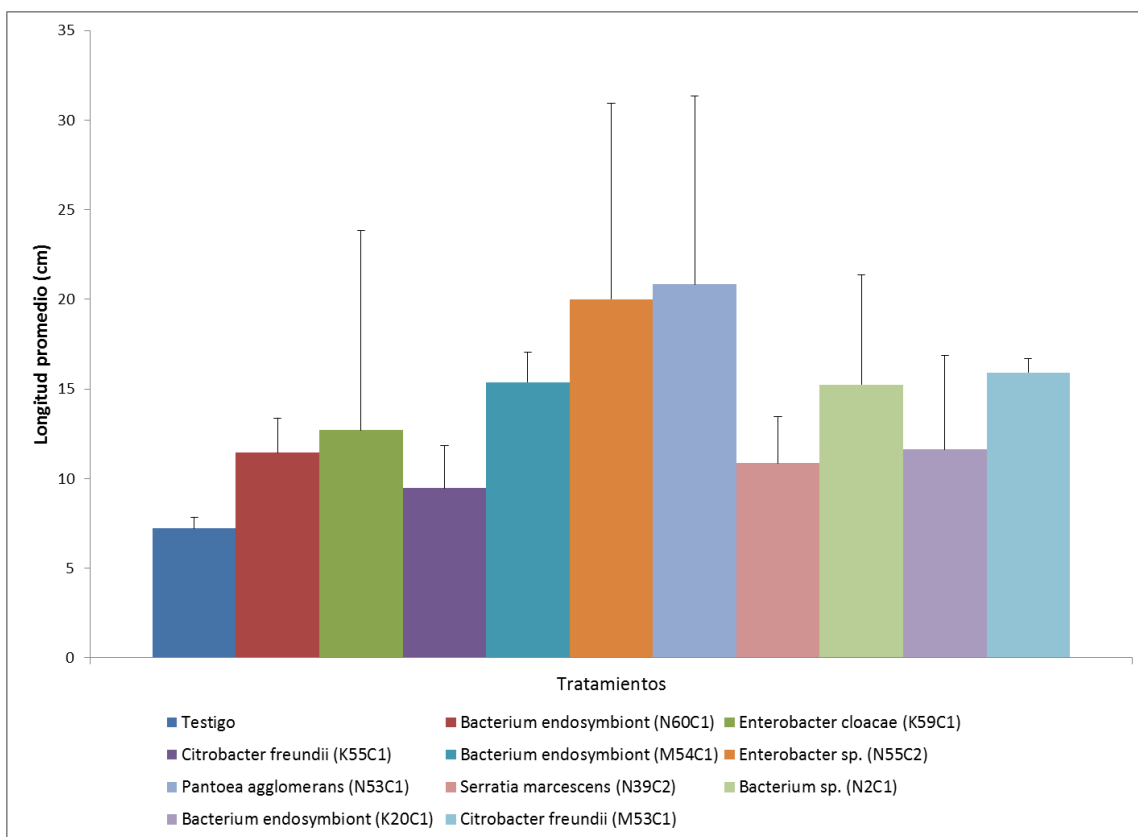


Fig. 33 Longitud promedio de raíces de suelo en esquejes de vainilla según el tratamiento.

Aunque se observaron longitudes en raíces de suelo superiores en los tratamientos 2-11 inoculados comparados con el testigo como se observa en la Fig. 33, no se encontraron diferencia significativas con la prueba ANOVA.

CONCLUSIONES

La concentración de P (mg kg^{-1}) en los tratamientos con las cepas *Bacteriumendosymbiont* (N60C1), *Citrobacterfreundii* (K55C1), *Bacteriumendosymbiont* (M54C1), *Pantoeaagglomerans* (N53C1), *Bacteriumsp.* (N2C1) y *Bacteriumendosymbiont* (K20C1) tuvieron concentraciones mayores comparados con el testigo. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre estos tratamientos y el testigo con la prueba ANOVA.

Los valores determinados para la concentración de Cu (mg kg^{-1}) fueron mayores en los lotes inoculados con la cepas *Enterobactersp.* (N55C2), *Pantoeaagglomerans* (N53C1), *Serratiamarcescens* (N39C2), *Bacteriumsp.* (N2C1), *Bacteriumendosymbiont* (K20C1) y *Citrobacterfreundii* (M53C1) comparados con el testigo. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre estos tratamientos con la prueba ANOVA

BIBLIOGRAFÍA

1. Egamberdiyeva, D., 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Appliedsoilecology* 36 (2007) 184–189.
2. Kumar, M., Prasanna, R., Bidyarani, N., Babu, S., MishraKumar, B., Kumar, A., Adak, A., Jauhari, S., Yadav, K., Singh, R., KumarSaxena, A., 2013. Evaluating the plant growth promoting ability of thermotolerant bacteria and cyanobacteria and their interactions with seedspice crops. *ScientiaHorticulturae* 164 (2013) 94–101.
3. Sujatha, S., Bhat, R., 2010. Response of vanilla (*Vanilla planifolia* A.) intercropped in arecanut to irrigation and nutrition in humid tropics of India. *AgriculturalWater Management* 97 (2010) 988–994.
4. Bythrow, J.D., 2005. Historical perspective: Vanilla as a Medicinal Plant. *SeminIntegr Med* 3:129-131.
5. Menchaca, R.A., Ramos, J.M., Moreno, D., Luna, M., Mata, M., Vázquez, L.M., Lozano, M.A., 2011. Germinación *in vitro* de híbridos de *Vanillaplanifoliay V. pompona*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XIII (1) 80-84.
6. Kelso, H., Reyes, D., Cruz, M.I., Villegas, I., Rodríguez, B., Pascual, F., Mamadou, K., Magaña, F., Huerta, I., 2013. Beneficiado semi-mecanizado de vainilla. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias.* Vol. 22, No. Esp. (diciembre, pp. 38-40).
7. Tan, B. C., Chin, C. F., Alderson, P., 2013. Effects of sodium nitroprusside on shoot multiplication and regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant* 49:626–630.
8. Palama, T. L., Fock, I., Choi, Y. H., Verpoorte, R., Kodja, H., 2010. Biological variation of *Vanilla planifolia* leaf metabolome. *Phytochemistry* 71 (2010) 567–573.
9. Divakaran, M., NirmalBabu, K., Peter, K. V., 2006. Conservation of *Vanilla* species, *in vitro*. *ScientiaHorticulturae* 110 (2006) 175–180.
10. Tsavkelova, E., Cherdyntseva, T. A., Yu, S., Shestakov, A. I., Botina, S. G., 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. *ArchMicrobiol* (2007) 188:655–664.
11. Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A., Botina, S. G., Netrusov, A. I., 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *MicrobiologicalResearch* 162 (2007) 69—76.

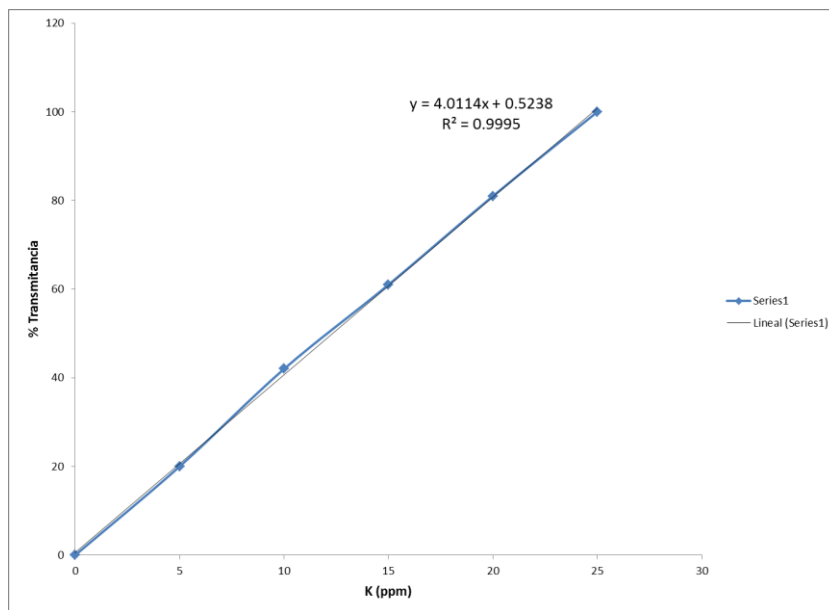
12. Nadeem, S. M., Ahmad, M., Ahmad Zahir, Z., Javaid, A., Ashraf, M., 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances* 32 (2014) 429–448.
13. Loredó-Ostí, C., López-Reyes, L., Espinosa-Victoria, D., 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *TERRA Latinoamericana* 22 (2) 225-239.
14. Farina, R., Beneduzi, A., Ambrosini, A., De Campos, S., Brito-Lisboa, B., Wendisch, V., Vargas, L. K., Passaglia, L., 2012. Diversity of plant growth-promoting rhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. *Applied Soil Ecology* 55 (2012) 44–52.
15. Palacios, O., Bashan, Y., De Bashan, L., 2014. Proven and potential involvement of vitamins in interactions of plants with plant growth-promoting bacteria—an overview. *Biol Fertil Soils* 50, 415–432
16. Turan, M., Ekinci, M., Yildirim, E., Günes, A., Karagöz, K., Kotan, R., Dursun, A., 2014. Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. *Turk J Agric For* 38, 327-333.
17. Ahemad, M., Kibret, M., 2013. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science* 26, 1–20.
18. Güneş, A., Turan, M., Güllüce, M., Sahin, F., 2013. Nutritional content analysis of plant growth-promoting rhizobacteria species. *European Journal of Soil Biology* 60, 88-97.
19. Montañez, A., Rodríguez, A., Barlocco, C., Beracochea, M., Sicardi, M., 2012. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. *Applied Soil Ecology* 58, 21– 28
20. Batra, N., Walia, M., Goyal, S., 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their application in plant growth. *Legume Res.*, 37 (1): 72 – 78.
21. Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17, 319–339.
22. Vargas, P., Cerrato, R., Suárez, J., González, G., 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *TERRA* 19 (4), 327-335.
23. Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 4:356, 1-20.

-
24. Silva, H., Tozzi, J., Terrasan, C., Bettiol, W., 2012. Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust. *Biological Control* 63, 62–67.
 25. Chithrashree, Udayashankar, A.C., Nayaka, S., Reddy, M.S., Srinivas, C., 2011. Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonasoryzae*pv. *Oryzae*. *Biological Control* 59, 114–122.
 26. Elsharkawy, M., Shimizu, M., Takahashi, H., Hyakumachi, M., 2012. Induction of systemic resistance against *Cucumber mosaic virus* by *Penicilliumsimplicissimum* GP17-2 in *Arabidopsis* and tobacco. *PlantPathology* 61, 964–976
 27. Gutiérrez, G., Almaráz, R., 2007. Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 13(2): 157-162.
 28. Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Balasubramanian, P., Samiyappan, R., 2009. Induction of defense-related proteins by mixtures of plant growth promoting endophytic bacteria against *Banana bunchy top virus*. *Biological Control* 51, 16–25.
 29. Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Saravanakumar, D., Soorianathasundaram, K., Samiyappan, R., 2008. Biohardening with Plant Growth Promoting Rhizosphere and Endophytic bacteria induces systemic resistance against *Banana bunchy top virus*. *Appliedsoilecology* 39, 187–200.
 30. Nawrocka, J., Malolepsza, U., 2013. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control* 67, 149–156.
 31. Peña, H., Reyes, I., 2007. Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *INTERCIENCIA* 32 (8), 560-565.

ANEXOS

ANEXO I. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINACIÓN DE K

K (ppm)	% Transmitancia
0	0
5	20
10	42
15	61
20	81
25	100



ANEXO II. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINACIÓN DE P

P (ppm)	% Absorbancia
0	0
1	0.075
2	0.092
3	0.111
4	0.125
5	0.142
6	0.158
7	0.174
8	0.190

