

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla



Facultad de Ingeniería Química

Colegio de Ingeniería Ambiental



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

**Tesis presentada para obtener el título de:
Licenciatura en Ingeniería Ambiental**

Presenta:

Sara Iris Hernández Vargas.

Director:

José Carlos Mendoza Hernández

Director externo:

Dra. Ma.del Carmen Ángeles González Chávez

Diciembre 2014

ÍNDICE

Índice general	II
Diseño de la investigación	1
Planteamiento del problema	1
Justificación	3
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
Hipótesis	5
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	6
1.1 Importancia y descripción de la vainilla.	6
1.2 Bacterias promotoras del crecimiento de las plantas. (BPCP)	7
1.2.1 Actividad de BPCP	8
1.2.2 Promoción del crecimiento de las plantas	11
1.2.3 Mecanismos de acción entre BPCP y las plantas.	12
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	14
2.1 Ubicación del experimento	14
2.2 Diseño experimental	14
2.3 Etapas del trabajo de campo	15
2.3.1 Limpieza y medición de las plántulas de vainilla	15
2.3.2 Traspaso de plántulas a sustrato	16
2.3.3 Preparación del inóculo	16
2.3.4 Inoculación de plántulas de vainilla	17
2.3.5 Estandarización de pesos de las plántulas	17
2.3.6 Preparación de las muestras para laboratorio	20

2.4	Determinación de peso fresco, peso seco, área foliar, concentración de Fe, Cu, Mn, Zn, K, P y clorofila en laboratorio	21
2.4.1	Determinación de clorofila	21
2.4.2	Determinación de peso fresco, peso seco y área foliar	22
2.4.3	Determinación de Fe, Cu, Mn, Zn, K y P	23
2.4.3.1	Preparación de la muestra	23
2.4.3.2	Determinación de Fe, Cu, Mn y Zn	24
2.4.3.3	Determinación de P	26
2.4.3.4	Determinación de K	26
CAPÍTULO III. RESULTADOS		27
3.1	Longitud promedio de las plántulas de vainilla	27
3.2	Incremento de altura en las plántulas de vainilla	28
3.3	Incremento de altura total en las plántulas de vainilla	29
3.4	Número de nudos nuevos en plántulas de vainilla	30
3.5	Número de hojas en plántulas de vainilla	32
3.6	Número de raíces adventicias en plántulas de vainilla	33
3.7	Número de brotes en plántulas de vainilla	34
3.8	Peso fresco	35
3.9	Peso seco	36
3.10	Área foliar	37
3.11	Longitud de raíces de suelo	38
3.12	Clorofila a, b y total	39
3.13	Concentración de Fe	40
3.14	Concentración de Zn	41

3.15 Concentración de Cu	42
3.16 Concentración de Mn	43
3.17 Concentración de K	44
3.18 Concentración de P	45
Conclusiones	46
Bibliografía	47

BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN MICROPLÁNTULAS DE VAINILLA

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Entre las especies de orquídeas, la vainilla es una de las más importantes en el mercado nacional e internacional, derivado de los grandes beneficios que de ella se adquieren. La vainilla se utiliza en la elaboración de bebidas, postres, perfumes, licores, cigarros y medicinas. Es el saborizante de mayor uso a nivel mundial. (Elorza et al., 2007)

La vainilla es un cultivo del trópico húmedo de México con alto potencial de exportación, debido a su excelente calidad es uno de los productos más codiciados en el mercado internacional. (Sagarpa, 2011), el valor de la producción en 2009 fue de 3.01 millones de pesos y 82% de las exportaciones totales de vainilla de México fueron absorbidas por Estados Unidos (FAOSTATS, 2011). Sin embargo, aun cuando existen las condiciones climáticas y culturales del uso y manejo del cultivo, la producción en México no es suficiente para figurar en el mercado internacional. (Henry et al., 2012)

En el período comprendido de 2003 a 2009 la producción de México creció a una tasa de crecimiento media anual de -8,7 %, mientras que Madagascar a una de 17,9 %. Los datos anteriores sugieren una baja competitividad de la vainilla mexicana, su disminución de la participación en el mercado internacional y la caída de las exportaciones. (Gutiérrez y Almaráz, 2007). Este fenómeno se atribuye a dos factores: reducción de la superficie sembrada por el abandono de plantaciones, debido a la falta de rentabilidad para el productor y los bajos rendimientos por unidad de superficie, producto de una baja tecnificación de los vainillales. (Jaramillo et al., 2012)

El principal estado productor de vainilla es Veracruz, los municipios productores son: Papantla de Olarte, Martínez de la Torre, Gutiérrez Zamora, Tecolutla y Poza Rica de Hidalgo. Se estima que tan sólo la zona del Totonacapanque comprende a esta región produjo el 80% de la producción total de vainilla verde a nivel nacional en la cual el 89% de la población se dedica a la agricultura, 8% a la ganadería, 1% a la silvicultura y 2% actividades menores como pequeños negocios y diversos oficios. (Jaramillo et al., 2012); por tanto, este cultivo tiene impacto en aspectos económicos, sociales y ecológicos en las regiones de producción.

El cultivo de la vainilla (*Vanillaplanifolia*Andrew) enfrenta serias dificultades debido a problemas asociados a su propagación vegetativa, enfermedades, plagas, cambios climáticos, afectaciones de carácter biótico, ausencia de planificación de riegos y escasa organización en la producción y comercialización del producto, entre otros (Henry et al., 2012). De acuerdo con el Congreso Internacional de Vainilla de 2006, los productores indicaron que existen problemas en la cadena de producción de vainilla relacionados con: inadecuada validación y transferencia de tecnología por parte de instituciones de investigación, reducida tecnificación de los vainillales y ausencia de capacitación y asesoría a los productores en materia de fitomejoramiento y manejo del cultivo. (Barrera et al., 2009)

El desarrollo de la agricultura moderna se caracteriza por realizar recomendaciones tecnológicas que ignoran la heterogeneidad ambiental, cultural y socioeconómica de una determinada región, esto genera que el desarrollo agrícola no responda a las necesidades de los agricultores ni a los potenciales agrícolas locales. Por tanto, resulta imperativo generar un sincretismo de conocimiento que contribuya a la generación de tecnologías eficientes desde el punto de vista productivo y agroecológico, a fin de incrementar la productividad de los sistemas de producción de vainilla en la región del Totonacapan. (Barrera et al., 2009)

JUSTIFICACIÓN

En años recientes, se ha retomado el interés de utilizar bacterias promotoras de crecimiento en la producción de cultivos. La mayoría de los microorganismos se encuentran interactuando en la rizosfera (región del suelo alrededor de la raíz de la planta influenciada por su metabolismo), donde el ambiente es distinto del resto de la zona edáfica. Uno de los fenómenos importantes que se produce en la rizosfera es la presencia de una gran variedad de sustancias orgánicas, como aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, derivados de ácidos nucleicos, factores de crecimiento y enzimas que, directa o indirectamente, tienen influencia positiva o negativa sobre los microorganismos que ahí habitan. (Díaz et al., 2001)

Entre los organismos rizosféricos con efecto positivo en el desarrollo de las plantas se encuentran bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), (Chávez et al., 2011) o PGPBs (del inglés *Plant Growth Promoting Bacteria*), incluye numerosos microorganismos que viven en el suelo y se asocian con distintas especies vegetales, facilitando o incrementando su crecimiento. La utilización de estos microorganismos en las prácticas agrícolas puede constituir una alternativa válida para incrementar la productividad de los cultivos en un esquema de producción sustentable y amigable con el medio ambiente. (Ahmet et al., 2010)

Estas bacterias asociativas son consideradas promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) por su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas, a través de mecanismos como fijación biológica de nitrógeno, producción de sustancias reguladoras del crecimiento, solubilización de minerales y nutrientes, incremento en el volumen de la raíz e inducción de resistencia sistémica a patógenos, entre otros (Rodríguez et al., 2013). Uno de los mecanismos clave de las BPCV para facilitar el desarrollo vegetal es la disminución de los niveles de etileno, que inhiben la elongación radical, por la acción de la enzima 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa. (Chávez et al., 2011).

Los cultivos inoculados con BPCV generan cierta resistencia a sequía, salinidad o deficiencia nutricional debido al aumento del desarrollo radical a través de las fitohormonas (auxinas y citocininas) que tienen efectos positivos en las plantas. La comprensión adicional de los mecanismos fundamentales empleados por estas bacterias probablemente acelerará la aceptación de estos organismos como complementos adecuados y eficaces para la agricultura práctica.

Numerosos reportes informan que la incorporación de estas bacterias a las semillas o plántulas favorece el desarrollo del cultivo, (Rodríguez et al., 2013) siendo pocos los relacionados con las orquídeas en particular con la orquídea *Vanilla planifolia* por lo que representa una oportunidad de estudio para determinar sus interacciones y efectos positivos en el crecimiento y desarrollo de los cultivos de vainilla.

La inoculación con estas bacterias en los cultivos de vainilla ubicados en Cazones de Herrera, Veracruz, permitirá analizar las interacciones bacteria-planta y observar los efectos en el crecimiento de las plantas, con la finalidad de que se puedan usar para mejorar el rendimiento y aumentar la productividad de *Vanilla planifolia*.

OBJETIVOS.

Objetivo general: Evaluar el efecto del crecimiento en las microplántulas de vainilla inoculadas con bacterias promotoras de crecimiento seleccionadas de la rizosfera de vainilla.

Objetivos específicos:

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

HIPÓTESIS

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

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES.

El género *Vanilla* incluye 110 especies de orquídeas distribuidas en diferentes regiones tropicales del mundo; *V. planifolia* A. y *V. tahitiensis* son las especies de mayor importancia económica, la primera es la más conocida y es la referente cuando se habla de vainilla. (Henry et al., 2012)

La vainilla (*Vanillaplanifolia* A.) es originaria de la zona norte del estado de Veracruz, México (ASERCA, 2002). Las plantas de vainilla crecen mejor en las regiones tropicales húmedas. El sol directo puede provocar daños en su follaje, pero también el exceso de sombra es perjudicial para la planta, por lo que esta planta crece generalmente entre las sombras de los árboles, los cuales reducen cerca de la mitad de la intensidad del sol. En condiciones de sequía la planta puede morir fácilmente. En cultivos comerciales, también se pueden utilizar mallas artificiales para crear las condiciones correctas de luz para su crecimiento. (Castro y García, 2007)

1.1 Importancia y descripción de la vainilla.

Por décadas, la vainilla ha sido la principal fuente de ingresos en la zona de Papantla, la región vainillera más importante de México por sus características de clima y suelo necesarias para su desarrollo, (Carmona, 2013) ya que es uno de los saborizantes y aromatizantes de mayor demanda y alto precio en el mercado debido a su uso, el cual se distribuye en diversas y variadas industrias, que van desde la alimentación, pasando por la licorera, refresquera, farmacéutica, cosmética, tabacalera, hasta llegar incluso, a la industria artesanal. (Soto et al., 2006)

La vainilla tiene una alta cotización internacional, ya que su producto puede alcanzar entre 130 y 200 dólares por Kilogramo de vainilla beneficiada. Durante su ciclo productivo es una fuente importante de empleo rural, principalmente en la etapa de floración, debido a que la polinización se realiza manualmente,

generando fuertes cantidades de jornales anuales por hectárea. Adicionalmente se emplea mano de obra en el “beneficiado” del fruto verde (deshidratado, sudado y asoleado) para el desarrollo de los compuestos aromáticos y para su comercialización. (Hernández, 2000)

Las etapas de crecimiento del cultivo de *V. planifolia* y su determinación dependen del manejo cultural y particularmente del tipo de encauzamiento de las guías en crecimiento. La longevidad del cultivo depende del mantenimiento y puede ser 3 a 10 años. Las plantaciones comerciales en México tienen vida promedio de 5 años, de los cuales los primeros tres son de desarrollo vegetativo y los otros dos son de producción. (Curti, 1995; Sánchez, 1992).

Particularmente, *Vanillaplanifolia* es una planta perenne herbácea y trepadora. Por lo general, su tallo es de color verde, suave y succulento formado por entrenudos de 10 a 15 cm de largo con hojas alternas gruesas y cerosas de 15 a 18 cm de largo y 5 a 7 cm de ancho. (Soto, 2006) Es hermafrodita, sus flores miden alrededor de 5 cm y son de color blanco con un tono ligeramente amarillo verdoso. Presenta dos tipos de raíces, las que brotan de los nudos introducidos en la tierra, denominadas primarias, y las secundarias o adventicias que brotan de los nudos de la parte aérea las cuales se sujetan del tutor y su crecimiento es hacia el suelo de donde obtienen nutrientes de la materia orgánica. (Hopkings et al., 2004)

Su cultivo contribuye a mejorar la fertilidad y conservación del suelo, ya que esta orquídea está asociada a árboles vivos que utilizan como tutores que aportan materia orgánica al suelo y evita la erosión, a la vez que permite la reforestación y conservación de la vegetación nativa (Hernández, 2000)

1.2 Bacterias promotoras del crecimiento de las plantas.

Desde la elaboración del concepto de la rizosfera por Lorenz Hiltner en 1904, muchos estudios han reportado que el ambiente del suelo unido al sistema de raíces correlaciona la abundancia y la actividad microbiana debido a la presencia de los microorganismos en los exudados y depósitos de las raíces, de esta forma inicia una relación de beneficio mutuo. (Stéphane et al., 2009; Ahmad

et al., 2006). Se ha sugerido que un gramo de suelo típico contiene aproximadamente 9×10^7 bacterias, 4×10^6 actinomicetos, 2×10^5 hongos, 3×10^4 algas, 5×10^3 protozoos y 3×10^1 nematodos. El número de estos organismos en cualquier suelo, en comparación a otro pueden variar en gran medida. (Stéphane et al., 2009).

Es bastante común que la concentración de bacterias que se encuentra alrededor de las raíces de las plantas, es decir, en la rizosfera, es mucho mayor que la concentración bacteriana en el resto del suelo (10-1000 veces), debido a la presencia de grandes cantidades de azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos en los exudados de raíces, y la capacidad de estos compuestos para actuar como fuente alimentaria bacteriana. (Simons et al., 1996; Shores et al., 2005)

Actualmente es de vital interés estudiar la microbiota del suelo asociada a las raíces de las plantas con la finalidad de obtener estrategias que mejoren la productividad agrícola procurando la no contaminación del ambiente, asimismo evitando el uso de minerales en exceso como lo son los fertilizantes químicos los cuales alteran el equilibrio del suelo y el ecológico, esto ha creado una gran importancia en el estudio de la interacción bacterias-planta (Reyes et al., 2008; Read, 1998)

1.2.1 Actividad de BPCP

La interacción entre bacterias del suelo y raíces de las plantas puede ser clasificada como beneficioso, perjudicial o neutral para la planta, y, a veces el efecto de una bacteria en particular puede variar el cambio de las condiciones del suelo. (Glick, 2014). La actividad de los microorganismos promotores de crecimiento vegetal en general se inicia con mecanismos de quimiotaxis que están relacionados con la presencia de flagelos, quimiorreceptores y sistemas de regulación codificados genéticamente. Estos factores tienen gran importancia sobre la habilidad de colonizar la rizósfera y mantener la comunicación entre las células de la raíz con los microorganismos presentes en el suelo (Landa et al., 2002; Mavrodi et al., 2006).

Las bacterias asociadas con la planta de manera beneficiosa desempeñan un papel clave en el apoyo y / o el aumento de salud y el crecimiento de las plantas (Dawwam et al., 2013), estas bacterias se les denomina como promotoras del crecimiento de plantas (PGPB) orizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR). (Kibret, 2013)

En años recientes, se ha retomado el interés de utilizar bacterias promotoras de crecimiento en la producción de cultivos. Estas bacterias se han aplicado a semillas, tubérculos o raíz, y son capaces de colonizar las raíces de las plantas y estimular el crecimiento y rendimiento de cultivos (Chanway et al., 1989)

Las PGPB pueden estimular el crecimiento de plantas a través de la movilización de nutrientes en los suelos, produciendo numerosos reguladores del crecimiento vegetal, aumentar el rendimiento y la protección de las plantas contra los fitopatógenos mediante el control o la inhibición de ellos, mejorar la estructura del suelo y biorremediar los suelos contaminados mediante el secuestro de las especies de metales pesados tóxicos y compuestos xenobióticos degradantes así como reducir el estrés biótico o abiótico de la planta, sin conferir patogenicidad.

Las bacterias alojadas cerca de / en las raíces de las plantas (rizobacterias) son más versátiles en la transformación, la movilización y la solubilización de los nutrientes en comparación con las de los suelos. (Kibret, 2013)

En este sentido, diversas estimaciones de la cantidad de carbono fijo fotosintéticamente que se exuda por las raíces de diversas plantas van desde 5% hasta 30% (Glick, 2014) y el P orgánico en el suelo varía de 30% a 50% del fósforo total en la mayoría de los suelos, esta fracción está formada principalmente por la forma orgánica más estable de P.

Después de N, el P es el nutriente más limitante para el crecimiento de las plantas, incluso en suelos fértiles, la concentración de P en la solución del suelo no es mayor que 10 μM a pH 6,5. En respuesta de las plantas a esta deficiencia de P tienden a aumentar su disponibilidad, la absorción, y la eficiencia de uso.

La actividad microbiana es una de las vías más importantes para solubilizar el P en suelos, las PGPB pueden solubilizar fosfatos con eficacia y mejorar la absorción de P en suelos pobres, (Nico et al., 2012) por lo tanto, son microorganismos dominantes capaces de tomar formas no disponibles para la planta y transformarlas, hasta la obtención de formas asimilativas para las células vegetales que derivan en el reciclado de los nutrientes del suelo y, en consecuencia, son cruciales para la fertilidad del suelo. (Camelo et al., 2011)

En la actualidad, los enfoques biológicos para mejorar la producción de cultivos están ganando una fuerte posición entre agrónomos y ambientalistas siguiendo el sistema de gestión de nutrientes de las plantas integradas.

En este contexto, existe una rigurosa investigación con un mayor impulso a explorar rizobacterias que poseen rasgos nuevos como los potenciales de desintoxicación de metales pesados, la degradación o tolerancia de plaguicidas, tolerancia a la salinidad, el control biológico de fitopatógenos e insectos junto con el crecimiento normal de la planta; la promoción de propiedades tales como, fitohormonas, sideróforos, 1-aminociclopropano-1-carboxilato y la producción de amoníaco, la actividad nitrogenasa, solubilización de fosfato, etc. (Fischer et al., 2003; Bashan et al., 2002).

En la actualidad se están utilizando las BPCP como bio-inoculantes, sin embargo, en muchos fallan para los efectos deseados cuando se aplica en el campo debido a inconsistencias en la respuesta de la planta a la inoculación; esto podría ser debido a la insuficiencia de la rizosfera y/o la colonización de la planta que se encuentran directamente relacionados con la concentración del inóculo. Se ha determinado que el nivel óptimo del inóculo en semillas y plántulas es alrededor de 10^5 - 10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), cuando es superior los efectos son inhibitorios, mientras que dosis bajas no causan efecto. (Bashan et al., 2004; Saubidet et al., 2002). Debido a esto no sólo los mecanismos responsables de la promoción del crecimiento de plantas tienen que ser investigados, también se requiere un conocimiento profundo de todas las etapas de la colonización de plantas por BPCP. (Stéphane et al., 2009).

1.2.2 Promoción del crecimiento de las plantas.

Siguiendo la rizosfera y la colonización rizoplano, algunos microorganismos transmitidos del suelo, pueden entrar en las raíces y establecer subpoblaciones. (Dawwam et al, 2013). Distintas comunidades microbianas se han encontrado en diversos órganos de la planta tales como raíces, tallo, hojas, flores, así como frutas y semillas o incluso durante el desarrollo de la planta que indica las diferentes capacidades de cepas bacterianas para colonizar varios compartimentos de plantas.(Stéphane et al., 2009).

Las bacterias que facilitan el crecimiento de la planta pueden hacerlo ya sea mediante la unión a la superficie exterior de la planta, tales como las raíces (el rizo-esfera) o las hojas (la filosfera), o pueden habitar en las superficies interiores de la planta formando una relación con endófitos y éstas pueden hacerlo de manera directa o indirecta.

La promoción del crecimiento de las plantas de manera indirecta se produce cuando estas bacterias disminuyen o evitan algunos de los efectos perjudiciales de un agente patógeno de la planta (por lo general un hongo) por cualquiera de uno de varios mecanismos. (Castro y García, 2007) mencionan que las plagas y enfermedades que más afectan a la planta son: 1) Pudrición de la raíz (*Fusarium batatis*); 2) Marchitamiento (*F. Oxiporum*); 3)Mancha de la vainilla (*Colletrotrichumvanillae*); 4) Gusano peludo (*Plusia aurífera*) y algunos gasterópodos (caracoles y babosas).

La promoción directa de crecimiento de las plantas por bacterias promotoras del crecimiento de las plantas en general, implica facilitar la adquisición de los recursos de nutrientes desde el medio ambiente, incluyendo el nitrógeno fijo, hierro y fosfato, o en la modulación específica del crecimiento de las plantas mediante la alteración de los niveles de hormonas de plantas, tales como auxinas, citoquininas y etileno. (Glick, 2014).

1.2.3 Mecanismo de acción entre BPCP y las plantas.

La hormona etileno, que se encuentra en todas las plantas superiores, es un modulador importante del crecimiento normal y desarrollo de la planta, así como una función clave en la respuesta de las plantas a una amplia gama de tensiones.

Una variedad de procesos de la planta involucran al etileno incluyendo la nodulación de las leguminosas, el enraizamiento de esquejes, así como la interacción de una planta con hongos micorrícicos beneficiosos. Dentro de cualquier planta en particular, la síntesis de etileno se ve afectada por un número de diferentes factores, incluyendo la temperatura, la luz, la gravedad, la nutrición, la presencia y el nivel de otras hormonas de las plantas, y la presencia de diversos tipos de estrés biológico al que la planta tal vez esté sometida.

En cuanto a la respuesta de la planta al estrés, se forma un mayor nivel de etileno típicamente en respuesta a la presencia de metales, productos químicos orgánicos e inorgánicos, temperaturas extremas, demasiado o muy poco de agua, luz ultravioleta, daños por insectos, daños por nematodos, fitopatógenos (tanto hongos y bacterias), y el daño mecánico. (Glick, 2014). La presencia de etileno en la planta a altas concentraciones puede provocar la inhibición del crecimiento o incluso la muerte, por lo tanto es importante la función que desempeña el rasgo bacteriano que contiene la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa debido a que es responsable de la eliminación del precursor de etileno en la planta, ACC, y amoníaco en α -cetobutirato. Al disminuir los niveles de ACC en las plantas, los microorganismos productores de ACCdesaminasa disminuyen los niveles de etileno facilitando la producción vegetal. (Glick, 2014). El impulsor para la formación de ACC en la planta es la enzima ACCsintasay su transcripción es promovida por la fitohormona (AIA), ésta es sintetizada y secretada por las bacterias en respuesta a la presencia de triptófano y otras moléculas pequeñas en los exudados de la raíz, algunos de los cuales se recoge por la planta.

Este AIA, junto con el sintetizado de manera endógena por la planta puede afectar a las plantas de maneras diferentes. Se puede estimular la proliferación celular de la planta y / o alargamiento de las células de la planta. En este caso, AIA actúa para estimular la síntesis de etileno en la planta, AIA también actúa para soltar las paredes celulares de la planta, facilitando la elongación celular y el aumento de la exudación de la raíz. (Glick, 2014)

Con las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas que segregan tanto AIA y sintetizan ACCdesaminasa, los niveles de etileno en la planta no se elevan a la misma medida que cuando las plantas interactúan con las bacterias que segregan AIA pero no sintetizan ACCdesaminasa. El resultado neto de esta relación entre AIA y ACCdesaminasa es que mediante la reducción de los niveles de etileno de la planta, ACCdesaminasa facilita la estimulación del crecimiento de las plantas por AIA.

Como resultado, las plantas que crecen en asociación con ACCdesaminasa de bacterias promotoras del crecimiento vegetal generalmente tienen raíces más largas y brotes y son más resistentes a la inhibición del crecimiento por una variedad de etileno inducido por estrés.

Las bacterias que contienen ACCdesaminasa son relativamente comunes en el suelo, después de haber sido encontrado en una amplia gama de entornos de todo el mundo. De hecho, se ha sugerido que, "La capacidad de *Pseudomonasputida* GRI2-2 para hidrolizar ACC en el suelo, puede proporcionar una ventaja competitiva sobre otros microorganismos de la rizosfera, ya que puede utilizar ACC como fuente de nitrógeno." (Glick, 2014).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA.

2.1 Ubicación del experimento

El estudio se realizó en invernadero situado en Cazonos de Herrera, es un municipio ubicado en el estado de Veracruz, colinda al norte con el municipio de Tuxpan y el Golfo de México; al este con el Golfo de México y el municipio de Papantla; al sur con el municipio de Papantla; al oeste con los municipios de Papantla, Tihuatlán y Tuxpan. Su clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad (48%), cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (35%), cálido subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (17%) siendo su rango de temperatura de 24-26°C y de precipitación 1400-1600 mm.

2.2 Diseño experimental

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

Las variables cuantificadas fueron la longitud de la plántula, 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.

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.

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

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
LOTE 1 Control(Buffer de fosfatos)	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	1.10
LOTE 2 Cepa N60C1(<i>Bacterium endosymbiont</i>)	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.9	2.10
LOTE 3 Cepa K59C1(<i>Enterobacter cloacae</i>)	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.5	3.7	3.8	3.9	3.10
LOTE 4 Cepa K55C1(<i>Citrobacter freundii</i>)	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	4.7	4.8	4.9	4.10
LOTE 5 Cepa M54C1(<i>Bacterium endosymbiont</i>)	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	5.6	5.7	5.8	5.9	5.10
LOTE 6 Cepa N55C2(<i>Enterobacter sp.</i>)	6.1	6.2	6.3	6.4	6.5	6.6	6.7	6.8	6.9	6.10
LOTE 7 Cepa N53C1(<i>Pantoea agglomerans</i>)	7.1	7.2	7.3	7.4	7.5	7.6	7.7	7.8	7.9	7.10
LOTE 8 Cepa N39C2(<i>Serratia marcescens</i>)	8.1	8.2	8.3	8.4	8.5	8.6	8.7	8.8	8.9	8.10
LOTE 9 Cepa N2C1(<i>Bacterium sp.</i>)	9.1	9.2	9.3	9.4	9.5	9.6	9.7	9.8	9.9	9.10
LOTE 10 Cepa K20C1(<i>Bacterium endosymbiont</i>)	10.1	10.2	10.3	10.4	10.5	10.6	10.7	10.8	10.9	10.10
LOTE 11 Cepa M53C1(<i>Citrobacter freundii</i>)	11.1	11.2	11.3	11.4	11.5	11.6	11.7	11.8	11.9	11.10

2.3 Etapas del trabajo de campo.

2.3.1 Limpieza y medición de las plántulas de vainilla.

Las 110 plántulas de vainilla contenidas con agar en tubos de ensaye se extrajeron y limpiaron con agua destilada quitando el agar hasta eliminarlo por completo, posteriormente se colocaron sobre una superficie plana para eliminar el excedente de agua. Se llevaron a cabo las siguientes mediciones: número de raíces adventicias y de suelo, longitud de tallo y número de hojas, se registraron los resultados.

2.3.2 *Traspaso de plántulas a sustrato.*

El sustrato Miracle-Gro estéril se hidrató sobre un contenedor agregándole agua de pozo y mezclando hasta humedecer evitando que llegue a escurrir, en seguida se colocaron 60 gramos del mismo en cada uno de los tubetes.

Posteriormente se realizó un espacio en el centro del tubete introduciendo y sacando un lápiz de tal forma que tengan 8 cm de profundidad, dentro del cual se colocaron las plántulas asegurándose que las raíces de suelo queden cubiertas y la plántula de forma vertical; en algunos casos fue necesario utilizar un soporte para evitar que la plántula se deforme.

Se roció con fungicida (Captan 0.5g/L) al sustrato contenido en los tubetes antes y después de traspasar la plántula ya que permite prevenir, destruir o controlar cualquier plaga.

Los tubetes se etiquetaron enumerándolos del 1 al 110 respectivamente y se colocaron en gradillas de manera alternada, por lo que cada una de ellas contenía 25 tubetes en total. Con la finalidad de simular las condiciones ambientales de un invernadero se colocó plástico en la superficie de las gradillas con soportes de bambú en las esquinas.

Las cinco gradillas se acomodaron en una superficie plana la cual se encontraba a 75cm de altura del nivel del suelo bajo árboles de bambú ya que ésta área cumplía con las condiciones de sombra y aireación necesarias para su desarrollo y protección, las 5 gradillas se dejaron aclimatar por un periodo de 15 días.

2.3.3 *Preparación del inóculo.*

Las 10 diferentes cepas bacterianas seleccionadas previamente de la rizósfera donde se encuentra la vainilla crecieron en tubos con caldo Luria Bertani 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 a 800 rpm. Las bacterias se separaron mediante centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos, el

pellet se resuspendió en buffer de fosfatos con pH 7.4 a una concentración de 0.1 molar y se ajustó a 0.5 A a 600nm, que corresponde aproximadamente a 1×10^9 bacterias/mL.

2.3.4 Inoculación de plántulas de vainilla.

Después del periodo de aclimatación se les retiró el soporte que se les colocó al iniciopara su aclimatación, se hicieron las mediciones de acuerdo a los parámetros antes mencionados a excepción de las raíces de suelo evitando tener contacto con las plántulas con el fin de prevenir algún daño o contaminación a la misma, dichas mediciones se realizaron cada 15 días. Los tubetes se etiquetaron de acuerdo al tipo de bacteria, tratamiento y número de repetición respectivamente.

Las plántulas se inocularon con 10 mL de la suspensión bacteriana, alrededor de la raíz de cada plántula, 10 repeticiones por cada cepa, reservando un testigo de 10 repeticiones al cual se le agregó buffer de fosfatos de acuerdo con el diseño experimental elaborado con anticipación.

2.3.5 Estandarización de pesos de las plántulas

Pasando 6 horas de su inoculación, los tubetes con plántula y sustrato se pesaron con la finalidad de comparar la cantidad de agua que contenía cada una de ellas.

Se acomodaron nuevamente en el área destinada para su desarrollo y se les colocó un dispositivo el cuál tomó lectura de las condiciones de humedad y temperatura en las que se encontraban las plántulas de vainilla.

Después de 12 horas, las plántulas se volvieron a pesar con el propósito de confirmar los pesos para conocer la cantidad de agua que necesita cada una de ellas y poder estandarizar a 100 gr. De acuerdo a la relación 1g/mL, se agregó la mitad de los mililitros faltantes para alcanzar los 100 g según los pesos registrados para cada plántula y al término de una hora se agregaron los mililitros restantes, el agua se agregó con una pipeta estéril en las orillas del sustrato para evitar posibles escurrimientos de agua que pudiesen llegar a generar una pérdida de inóculo.



Plántulas en tubo de ensaye con agar



Extraer plántula



Quitar agar



Ecurrir



Colocar sustrato en tubetes



Humedecer sustrato estéril



Registrar datos



Hacer mediciones



Realizar espacio para plántula (8cm)



Rociar fungicida



Sembrar plántula



Colocar soporte para las que lo necesitan



Cubrir con plástico



Colocar soportes de palos de bambú en las cuatro esquinas de las gradillas



Rociar fungicida



Acomodarlas en área de aclimatación

15 días



Inocular

6 horas



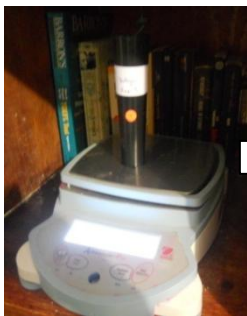
Tomar 10 mL suspensión bacteriana



Etiquetar



Retirar plástico y hacer mediciones



Pesar



Dispositivo de lectura

12 hrs



Agregar mitad de agua

1 hora



Acomodar en área prevista



Mililitros restantes de agua

2.3.6 Preparación de las muestras para laboratorio.

Después de 162 días de observación y registro de mediciones en campo, el número de plántulas de vainilla se redujo a 96 unidades experimentales debido a la presencia de hongo en las plantas de vainilla

Al finalizar la etapa de trabajo de campo se hicieron recolectas de todas las unidades experimentales con 4 repeticiones cada una (44 plántulas), las plántulas se extrajeron de los tubetes contenidos en sustrato y se enjuagaron. Se dejaron escurrir para quitar el exceso de agua y registrar el número y longitud de cada una de las raíces de suelo. Posteriormente se separó el tallo, hojas y raíces adventicias de las raíces de suelo y se almacenaron en bolsas de papel.



2.4 Determinación de peso fresco, peso seco, área foliar, concentración de Fe, Cu, Mn, Zn, K, P y clorofila en laboratorio

2.4.1 Determinación de clorofila.

Con una perforadora se tomaron 3 discos de diferentes hojas por plántula de las repeticiones que no se extrajeron para analizar en laboratorio y tenían hojas suficientes para tomar la cantidad requerida. Las muestras se colocaron en frascos de 30 mL con 10mL de acetona al 80% y se almacenaron en obscuridad a -20°C por 42 horas. 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. De cada filtrado se colocó aproximadamente 1 mL en celdas de vidrio y con un espectrofotómetro se leyeron las absorbancias en las siguientes longitudes de onda: 662,645 y 652 nm para clorofila a, b y clorofila total respectivamente. Se midió la absorbancia de un blanco que contenía 30 mL de acetona al 80%.

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

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

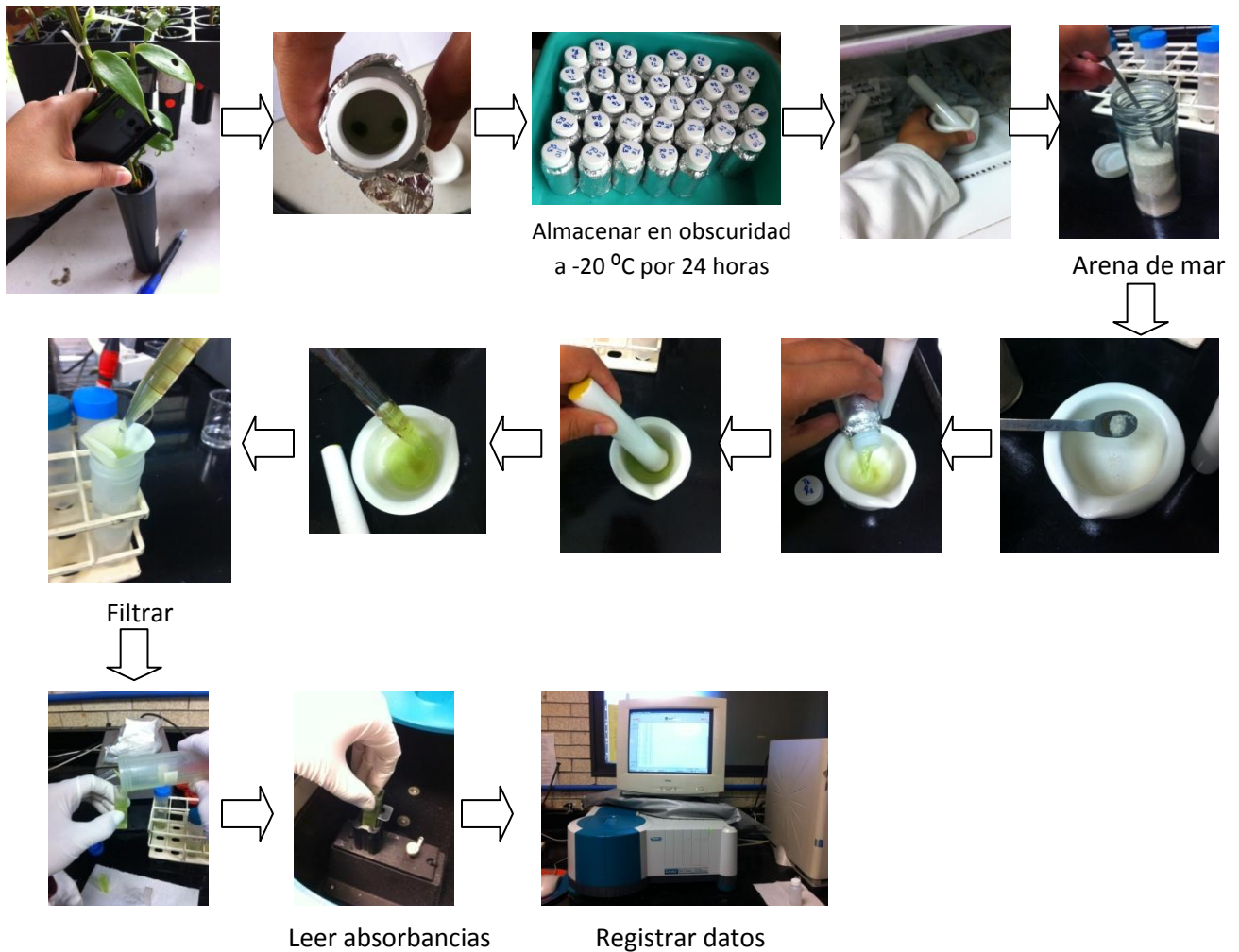
$$\text{Clorofila total} = 27.8A_{652}$$

En donde:

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

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

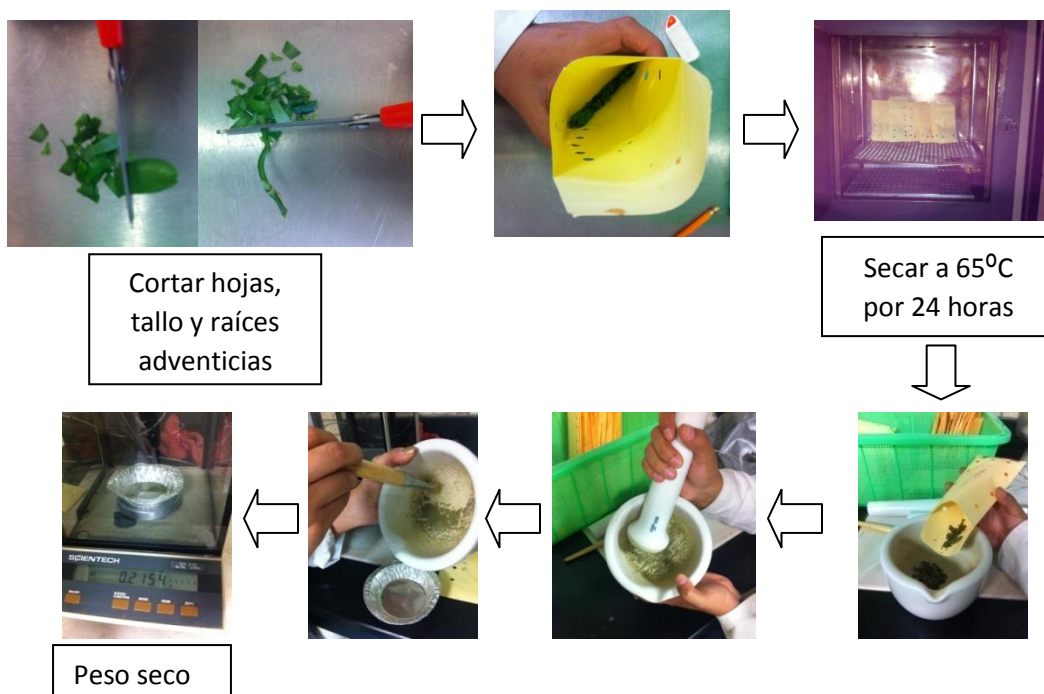
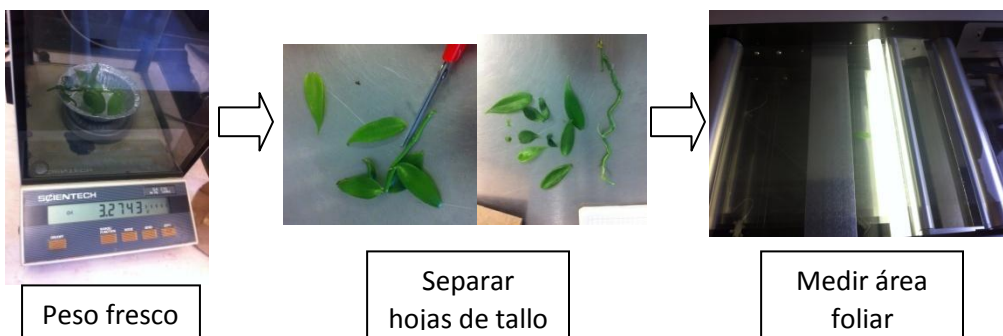
A_{652} = Absorbancia a una longitud de onda 652 nm



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

Las muestras contenidas en bolsas de papel se pesaron y se registraron los datos. Se midió el área foliar de cada hoja en un Medidor de Área Foliar (Fijo) LI-3100C separando hojas y tallo de cada plántula.

Las hojas, tallo y raíces adventicias se cortaron en pequeños pedazos, se colocaron en sobres de papel perforados y se secaron a 65°C por 24 horas. Una vez que el material se secó, se molieron en mortero de Ágata y se pesaron.

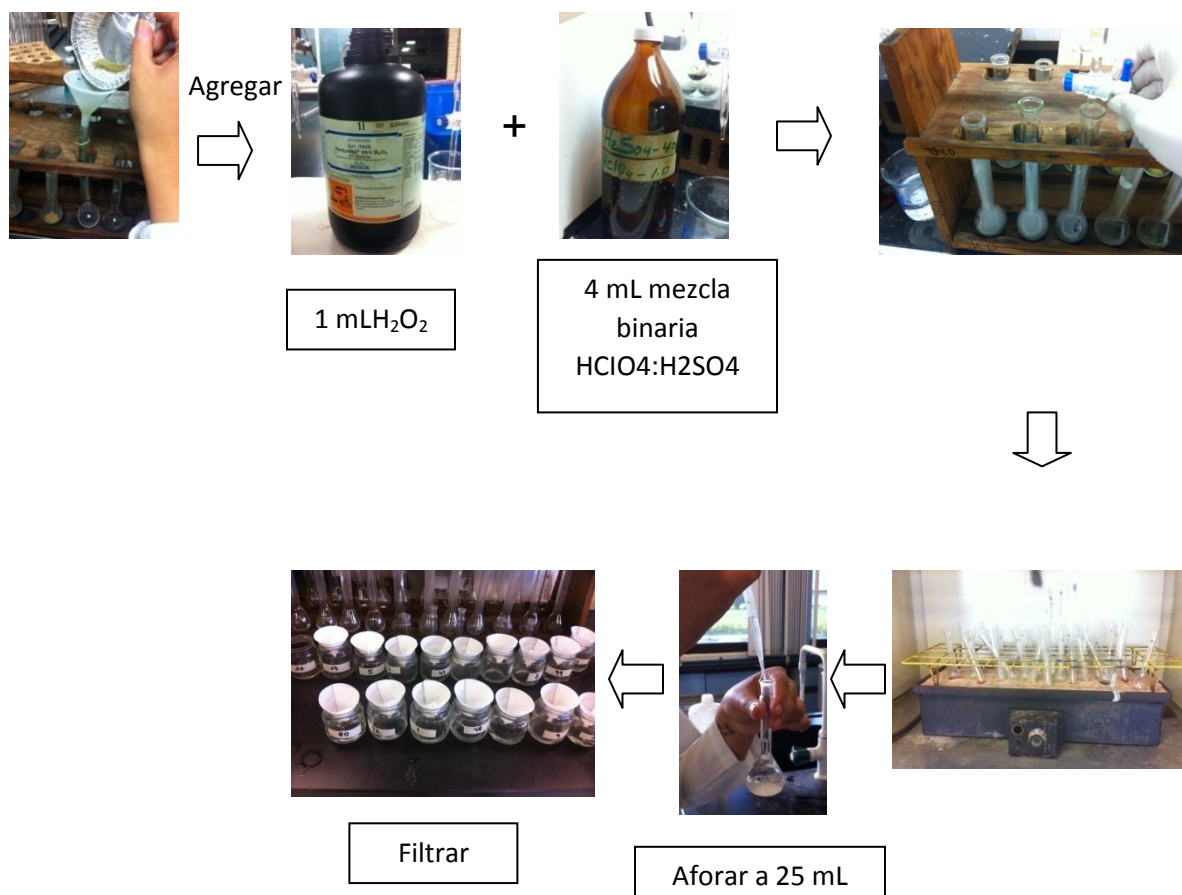


2.4.3 Determinación de Fe, Cu, Mn, Zn, K y P.

2.4.3.1 Preparación de la muestra

Las 4 muestras por tratamiento se juntaron en pares obteniendo 22 muestras en total y alcanzar los 0.25g en tubos de vidrio de 50 mL. Se añadió 1 mL de H_2O_2 y posteriormente se agregaron 4 mL de mezcla binaria ($HClO_4:H_2SO_4$ relación 1:4) a cada tubo bajo campana extractora de gases agitando suavemente hasta que terminó 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 aforó a 25 mL con

agua desionizada en matraces de aforación, se filtró cada solución con papel filtro Whatman No. 42 y los filtrados se pasaron tubos de 30mL con tapa.



2.4.3.2 Determinación de Cu, Fe, Mn y Zn.

Se leyeron directamente en el extracto obtenido los elementos menores Cu, Fe, Mn y Zn en un espectrofotómetro de absorción atómica a 325, 248, 279 y 213 nm respectivamente.

El factor de dilución utilizado fue el siguiente:

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

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

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

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

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

En donde:

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

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

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

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



Espectrofotómetro
de absorción atómica



Soluciones para calibrar Cu, Fe, Mn y Zn

2.4.3.3 Determinación de P.

Se tomaron 2 mL de cada extracto y se agregaron 2 mL de solución de metavanadato de amonio con 6 mL de agua destilada. Se agitó y se dejó en reposo durante 20 minutos para el desarrollo del color amarillo. Se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro UV a 470nm 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, 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, se leyeron las transmitancias en un Flamómetro. 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.



Flamómetro

CAPÍTULO III

RESULTADOS.

Los cambios que se presentaron en las plántulas de vainilla durante los días de medición después de la inoculación así como los valores obtenidos en los análisis de laboratorio en relación con el testigo y los tratamientos inoculados con las diferentes cepas bacterianas se muestran y explican de manera detallada en las siguientes figuras, las cuales muestran las gráficas con los datos y desviaciones estándar en los distintos días de medición. Los gráficos realizados se compararon con los resultados obtenidos en el análisis de varianza (ANOVA).

3.1 Longitud promedio de las plántulas de vainilla.

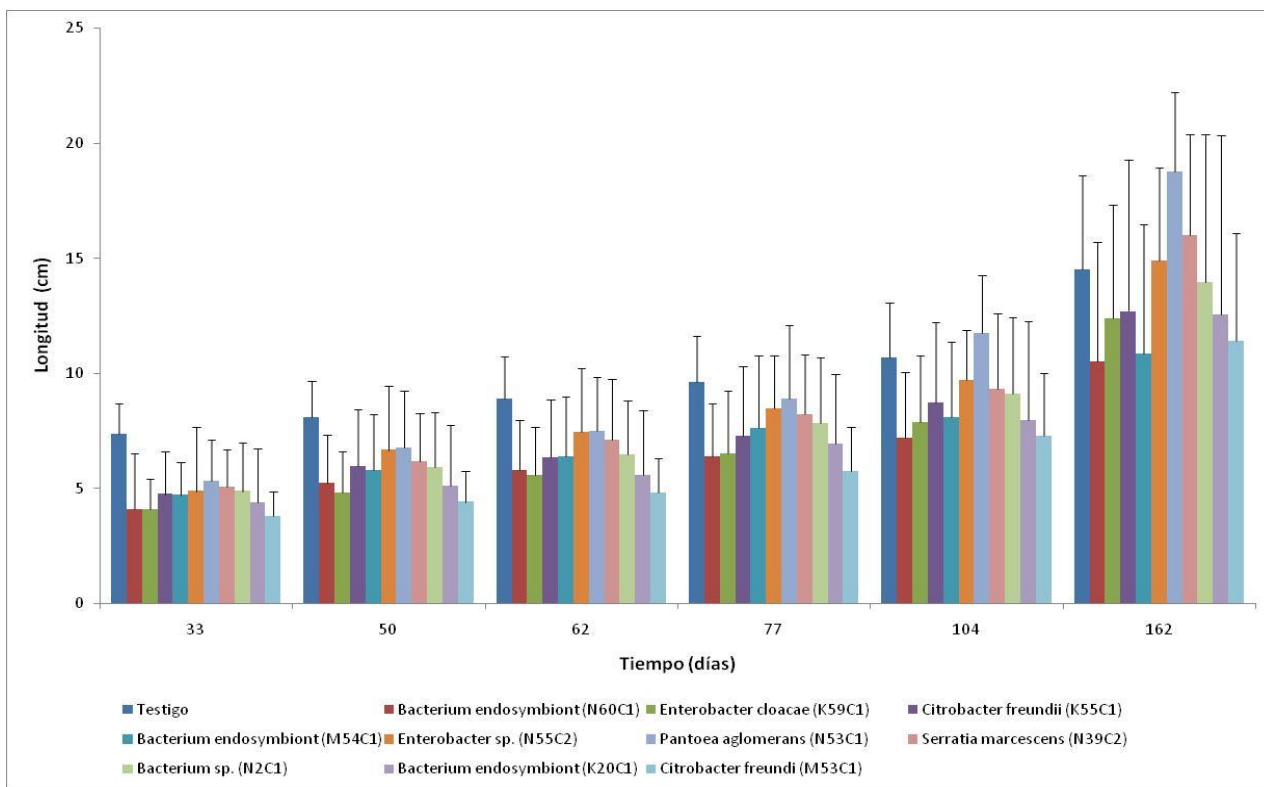


Figura 1. Longitud de las plántulas de vainilla en los días posteriores a la inoculación.

En la figura 1 observamos que la longitud de las plántulas durante en el periodo de 33 al 77 días después de la inoculación se comporta de manera similar tanto en las plántulas inoculadas como en el control donde el valor del testigo es más alto que

los demás tratamientos, a partir de los 104 días se puede observar un aumento las plántulas inoculadas con *Pantoea aglomerans* (N53C1) y a los 162 días este efecto también se observa en las inoculadas con *Enterobactersp.* (N55C2) y *Serratia marcescens* (N39C2), sin encontrarse diferencias significativas.

3.2 Incremento de altura en las plántulas de vainilla.

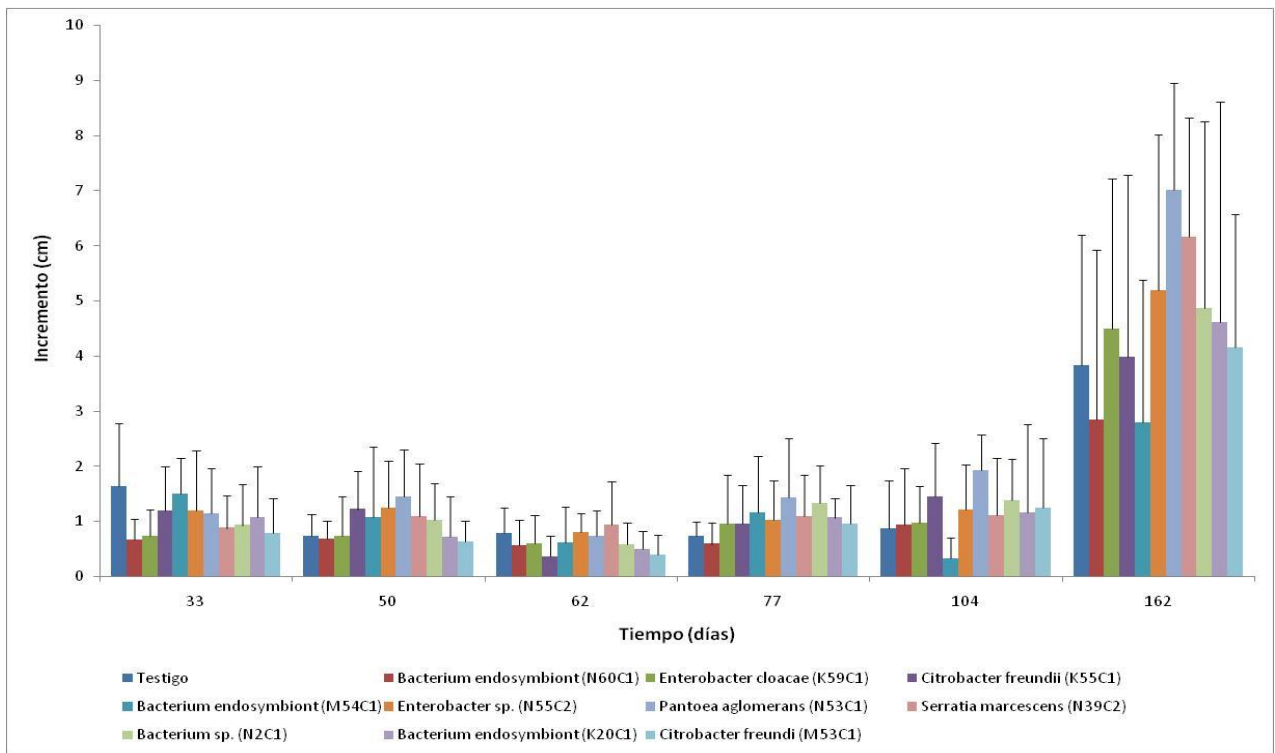


Figura 2. Incremento de altura en las plántulas de vainilla durante los días posteriores a la inoculación.

De acuerdo a los valores obtenidos del incremento como se muestra en la figura 2 a los 33 días de medición en el testigo se tienen valores más altos que el de los tratamientos con inóculo. A los 50 días las plántulas del testigo tuvieron valores más bajos que las plántulas inoculadas con las bacterias *Enterobacter cloacae* (K59C1), *Citrobacter freundii* (K55C1), *Bacterium endosymbiont* (M54C1), *Enterobacter sp* (N55C2), *Pantoea aglomerans* (N53C1), *Serratia marcescens* (N39C2) y *Bacterium ps* (N2C1), los valores del testigo fueron más altos que *Bacterium endosymbiont* (N60C1) y *Bacterium endosymbiont* (K20C1). En la siguiente medición de los 62 días después de la inoculación los valores de las

plántulas con las cepas *Enterobacter sp.* (N55C2) y *Serratia marcescens* (N39C2) tuvieron valores más altos que el testigo a diferencia de los demás tratamientos los cuales fueron menores. A los 77 días de medición el efecto de las cepas sobre las plántulas fue favorable en el incremento respecto del testigo a excepción de *Bacterium endosymbiont* (N60C1) y a los 104 días el comportamiento es similar siendo ahora la cepa *Bacterium endosymbiont* (M54C1) con un efecto desfavorable en el incremento. A los 162 días las plántulas inoculadas con las cepas *Bacterium endosymbiont* (N60C1) y *Bacterium endosymbiont* (M54C1) reflejaron un efecto menor que el testigo, para todos los demás tratamientos el efecto es más elevado.

3.3 Incremento de altura total en las plántulas de vainilla.

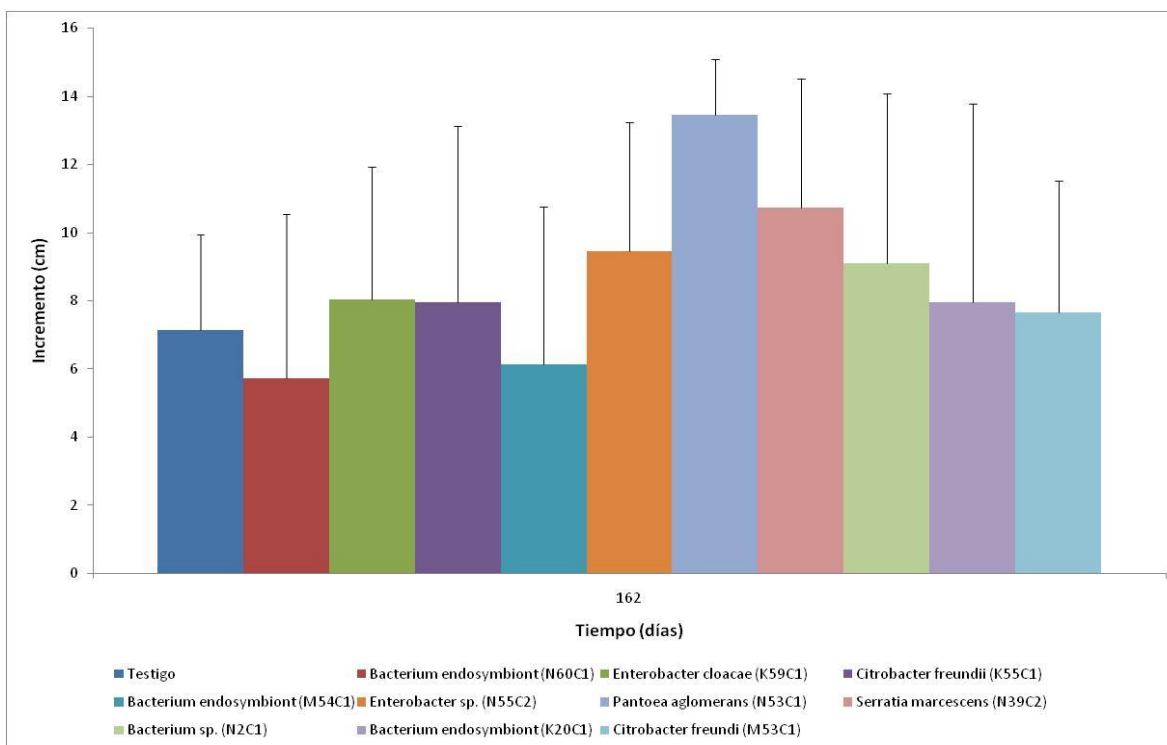


Figura 3. Incremento de altura total en las plántulas de vainilla en los días de medición después de la inoculación según los tratamientos.

De acuerdo con la figura 3 en el incremento de altura entre las plántulas inoculadas y el testigo se puede observar un mayor incremento en *Pantoea agglomerans* (N53C1), con una diferencia significativa $p < 0.05$ con respecto al

testigo. El incremento de altura más bajo fue en *Bacterium endosymbiont* (N60C1) mientras que el más alto fue en *Serratia marcescens* (N39C2) ambos sin diferencias significativas.

3.4 Número de nudos nuevos en las plántulas de vainilla.

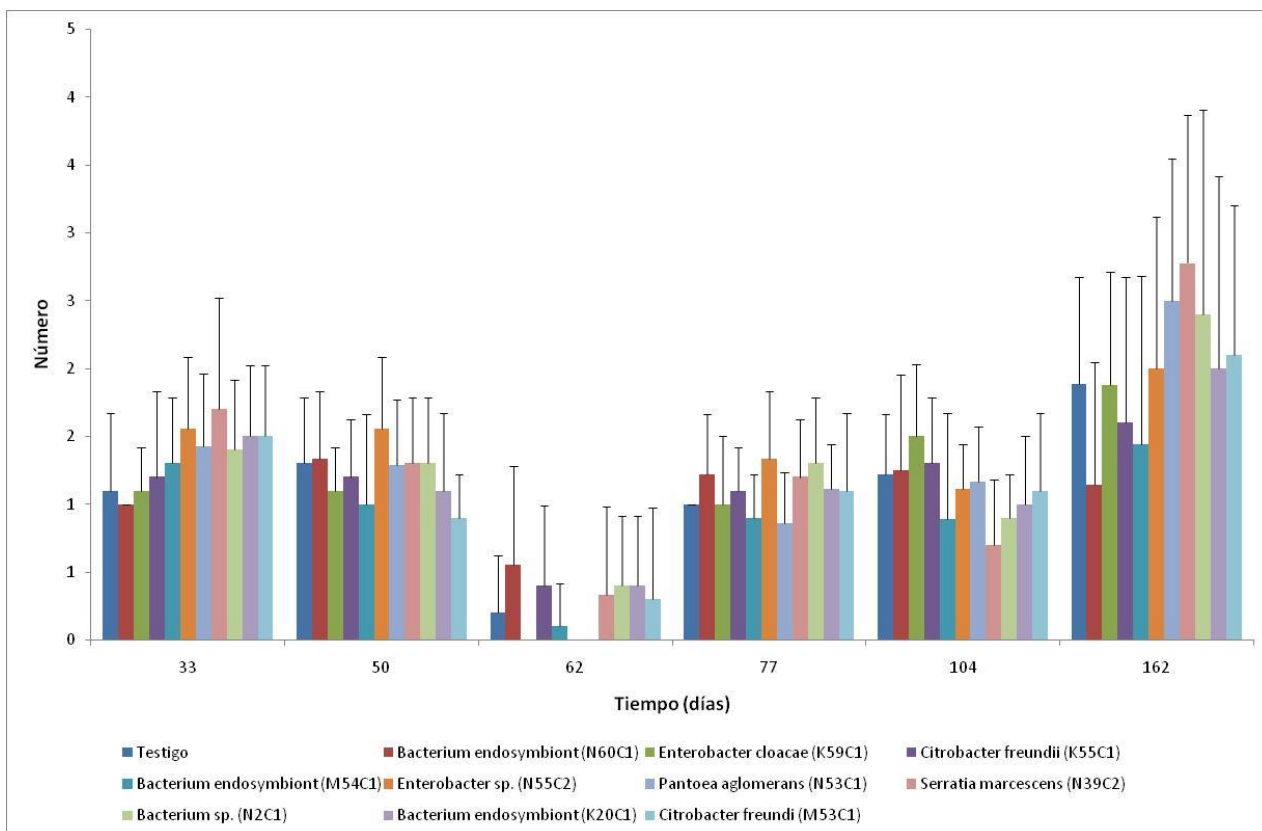


Figura 4. Número de nudos nuevos de las plántulas en los días posteriores a la inoculación.

En la figura 4 se puede observar que la formación de nudos nuevos a los 33 días posteriores a la inoculación fue la misma en el testigo y las plántulas inoculadas con la bacteria *Enterobacter cloacae* (K59C1), teniendo un valor más bajo el tratamiento *Bacterium endosymbiont* (N60C1) por lo que los demás tratamientos obtuvieron un efecto más elevado. A los 50 días de medición el efecto en el testigo, los tratamientos con *Serratia marcescens* (N39C2) y *Bacterium sp.* (N2C1) fueron los mismos considerando un número más alto en los de *Bacterium endosymbiont* (N60C1) y *Enterobacter sp.* (N55C2) respecto del testigo. En las

mediciones realizadas a los 62 días después de la inoculación se observa que en las plántulas inoculadas con *Enterobacter cloacae* (K59C1) y *Enterobacter sp.* (N55C2) la formación de nudos nuevos fue nula, el tratamiento con *Bacterium endosymbiont* (M54C1) tuvo el valor más bajo, por el contrario en las plántulas con *Bacterium endosymbiont* (N60C1) se puede observar un mejor efecto. A los 77 días después de la inoculación se encuentra una igualdad en el número de nudos nuevos entre el testigo y las plántulas inoculadas con *Enterobacter cloacae* (K59C1), por debajo de este valor están los tratamientos con *Bacterium endosymbiont* (M54C1) y *Pantoea agglomerans* (N53C1) quedando los tratamientos de *Bacterium endosymbiont* (N60C1), *Citrobacter freundii* (K55C1), *Enterobacter sp.* (N55C2), *Serratia marcescens* (N39C2), *Bacterium sp.* (N2C1), *Bacterium endosymbiont* (K20C1), *Citrobacter freundii* (M53C1) con los valores más elevados sin diferencias significativas. El número de nudos en el tratamiento con *Enterobacter cloacae* (K59C1) a los 104 días de medición fue favorable en comparación con *Serratia marcescens* (N39C2) el cual representa un valor menor respecto del testigo, por el contrario su efecto en la medición de los 162 días fue favorable teniendo un valor elevado a diferencia de *Bacterium endosymbiont* (N60C1) donde el efecto es menor.

3.5 Número de hojas en las plántulas de vainilla

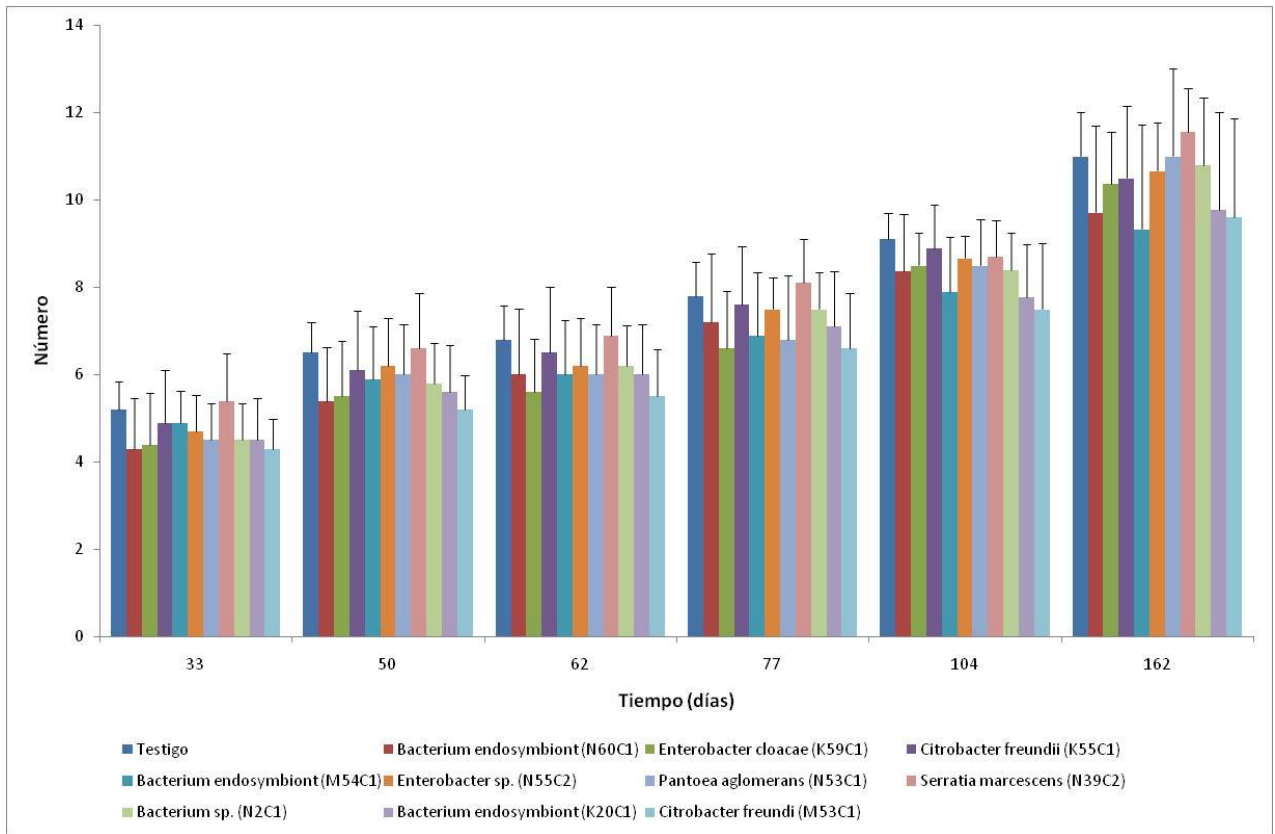


Figura 5. Número de hojas totales de las plántulas en los días posteriores a la inoculación.

En la primera medición después de la inoculación en la figura 5 se puede observar que el número de hojas en los tratamientos *Bacterium endosymbiont* (N60C1) y *Citrobacter freundii* (M53C1) es el mismo comparando con el testigo ambos tienen el valor más bajo, por otra parte el tratamiento que tuvo un valor más alto fue *Serratia marcescens* (N39C2) sin diferencias significativas. El número de hojas en la medición de los 50 hasta los 62 días después de la inoculación es similar a la anterior en comparación con el testigo de los tratamientos *Serratia marcescens* (N39C2) y *Citrobacter freundii* (M53C1) con los valores más altos y más bajos respectivamente. A los 77 días después de la inoculación se repite el comportamiento de la medición anterior con la observación que el número de hojas en los tratamientos *Citrobacter freundii* (M53C1) y *Enterobacter cloacae* (K59C1) son iguales. La medición realizada a los 104 días refleja un valor más alto

en el número de hojas del testigo que en los tratamientos de las plántulas inoculadas, por el contrario a los 162 días se puede observar un mejor efecto en el tratamiento *Serratia marcescens* (N39C2) teniendo un valor más elevado que *Bacterium endosymbiont* (M54C1) donde el valor es más bajo respecto del testigo.

3.6 Número de raíces adventicias en las plántulas

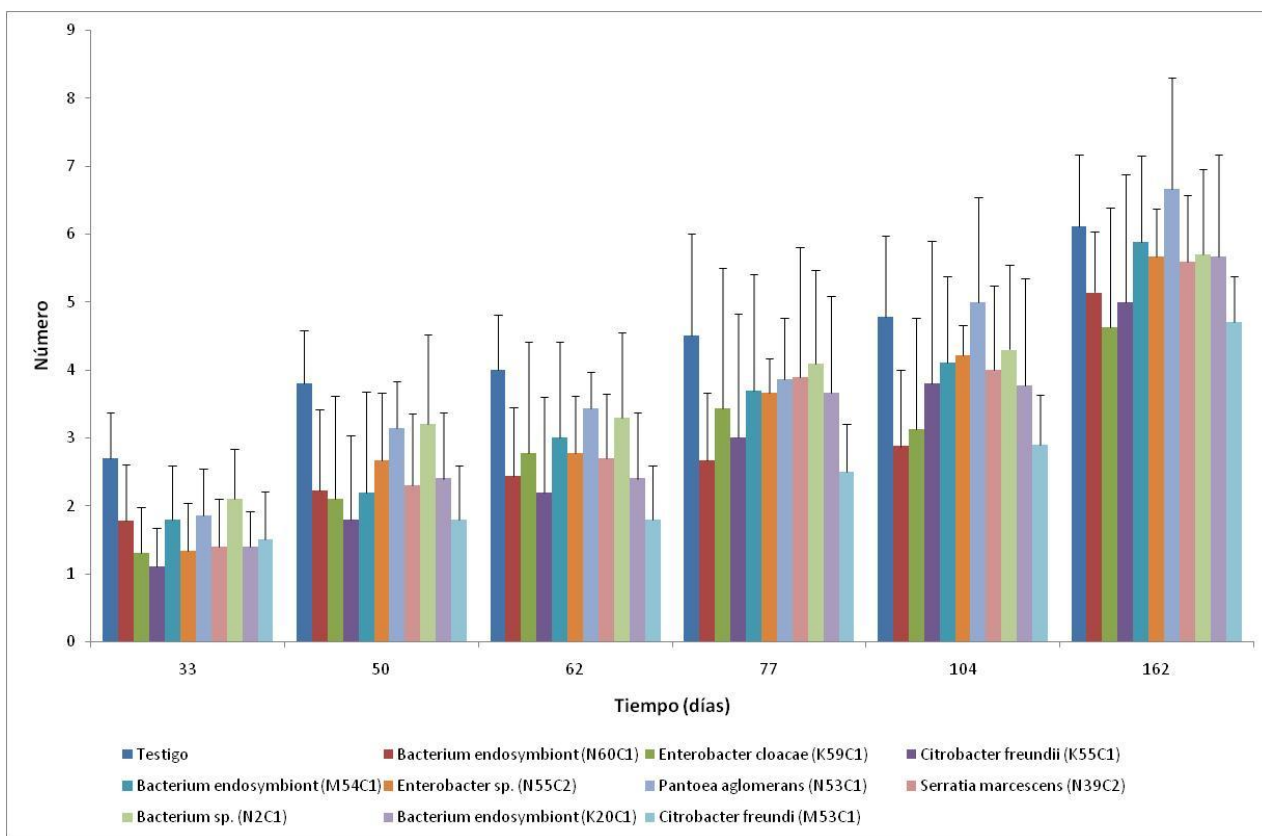


Figura 6. Número de raíces adventicias de las plántulas en los días posteriores a la inoculación.

El número de raíces adventicias a los 33 y 77 días de medición después de la inoculación se puede mostrar en la figura 6 que el efecto en el testigo es favorable en comparación con el tratamiento *Citrobacter freundii* (K55C1) donde el valor es menor, de manera similar a los 50 días de medición *Citrobacter freundii* (K55C1) y *Citrobacter freundii* (M53C1) representaron niveles por debajo del testigo. El tratamiento *Pantoea agglomerans* (N53C1) a los 104 y 162 días de medición después de la inoculación tiene un valor más elevado en número de raíces

adventicias en comparación con el testigo, por el contrario *Bacterium endosymbiont* (N60C1) y *Enterobacter cloacae* (K59C1) representan un valor más bajo respectivamente.

3.7 Número de brotes en plántulas de vainilla

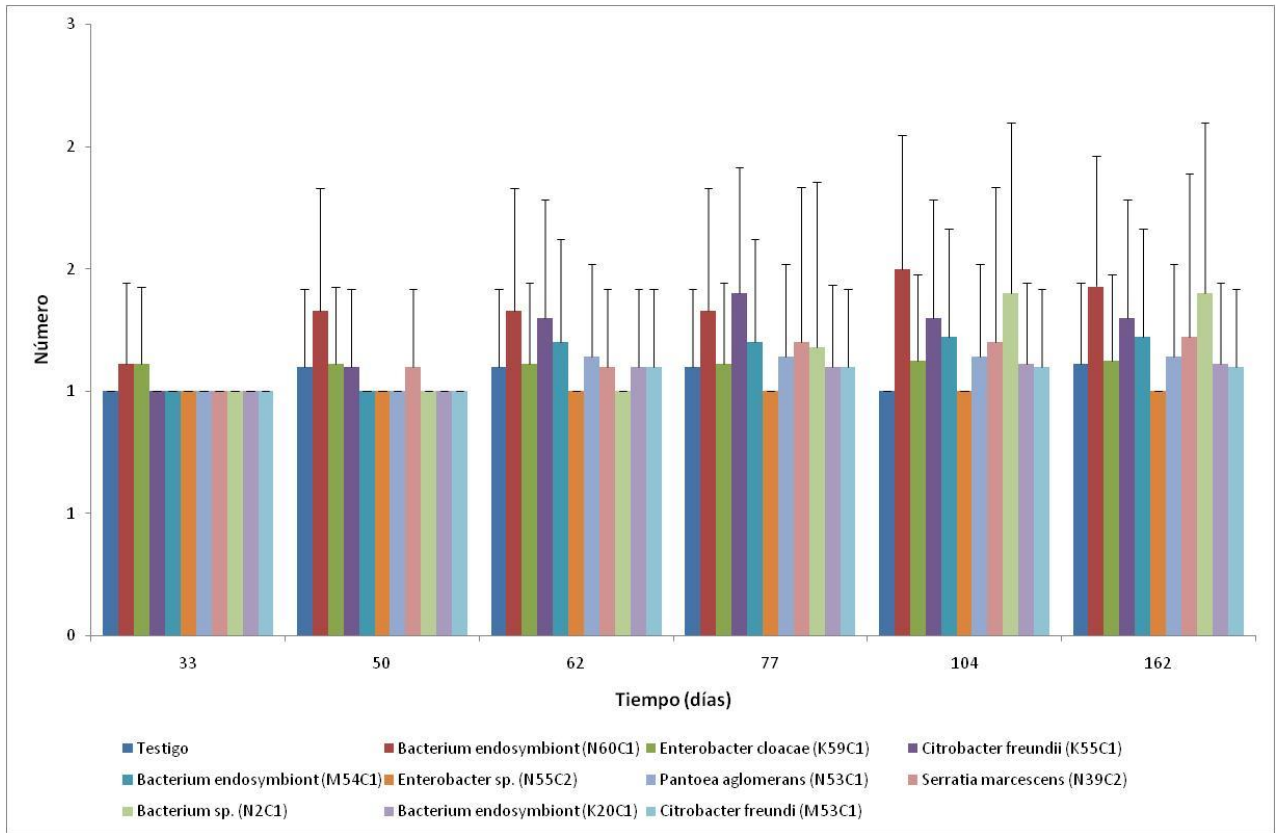


Figura 7. Número de brotes de las plántulas en los días posteriores a la inoculación.

En la figura 7 podemos observar que el número de brotes en las plántulas inoculadas con *Bacterium endosymbiont* (N60C1) y *Enterobacter cloacae* (K59C1) son iguales y con valores más altos que el testigo. Para la segunda medición a los 50 días *Bacterium endosymbiont* (N60C1) tiene un valor más elevado y los tratamientos *Bacterium endosymbiont* (M54C1), *Enterobacter sp.* (N55C2), *Pantoea aglomerans* (N53C1), *Bacterium sp.* (N2C1), *Bacterium endosymbiont* (K20C1), *Citrobacter freundii* (M53C1) son iguales y más bajos que el testigo. A los 62 días *Bacterium endosymbiont* (N60C1) sigue teniendo un valor más elevado, *Enterobacter sp.* (N55C2) y *Bacterium sp.* (N2C1) tienen valores iguales

y más bajos. Las plántulas inoculadas con *Citrobacter freundii* (K55C1) reflejaron un número de brotes más alto teniendo a *Enterobacter sp.* (N55C2) sin ningún cambio con el valor más bajo. A los 104 días el testigo tiene el mismo número de brotes que *Enterobacter sp.* (N55C2), rebasando esta cifra se encuentra el tratamiento *Bacterium endosymbiont* (N60C1) con un valor más alto hasta los 162 días de medición después de la inoculación.

3.8 Peso fresco

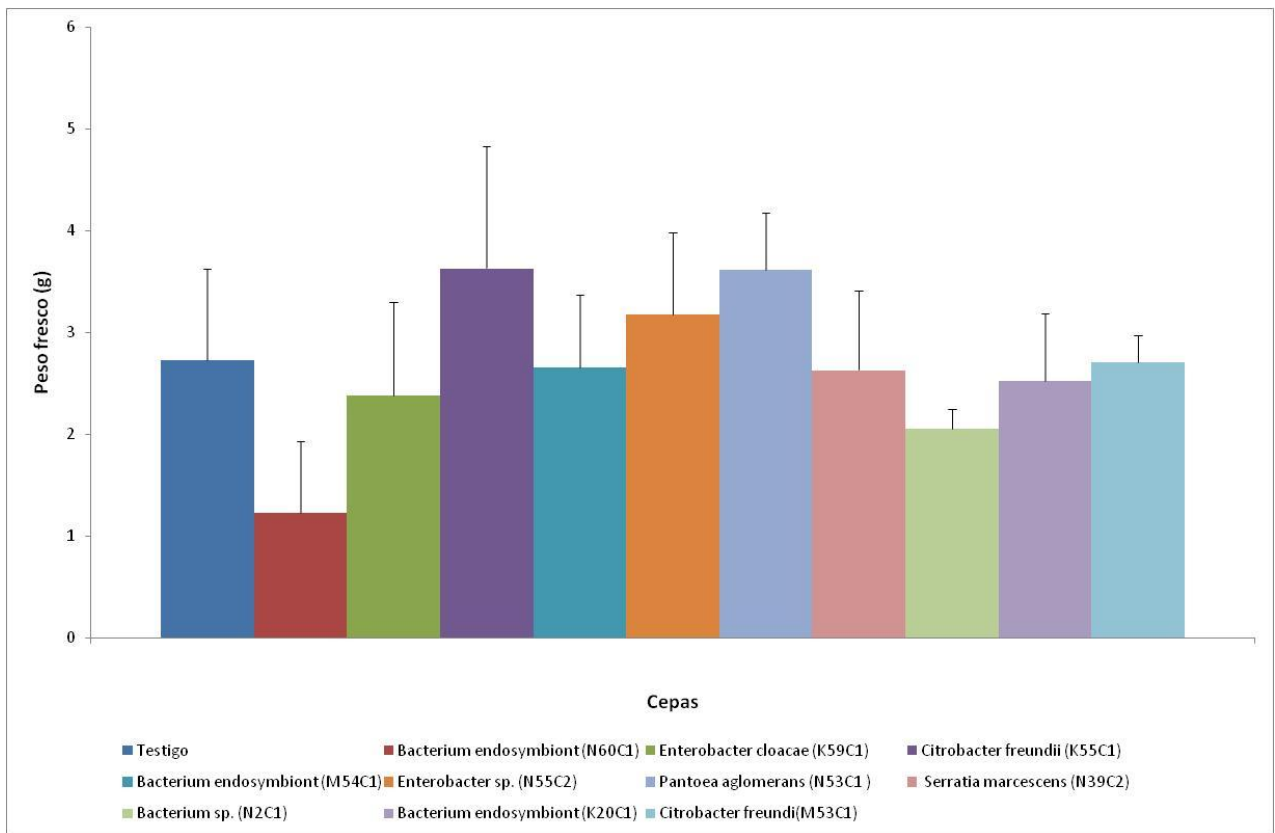


Figura 8. Peso fresco de las plántulas en la última medición después de la inoculación.

En la figura 8 podemos observar que el peso fresco en las plántulas inoculadas con *Citrobacter freundii* (K55C1), *Enterobacter sp.* (N55C2) y *Pantoea agglomerans* (N53C1) es elevado en comparación con el testigo, teniendo un valor más bajo los demás tratamientos.

3.9 Peso seco

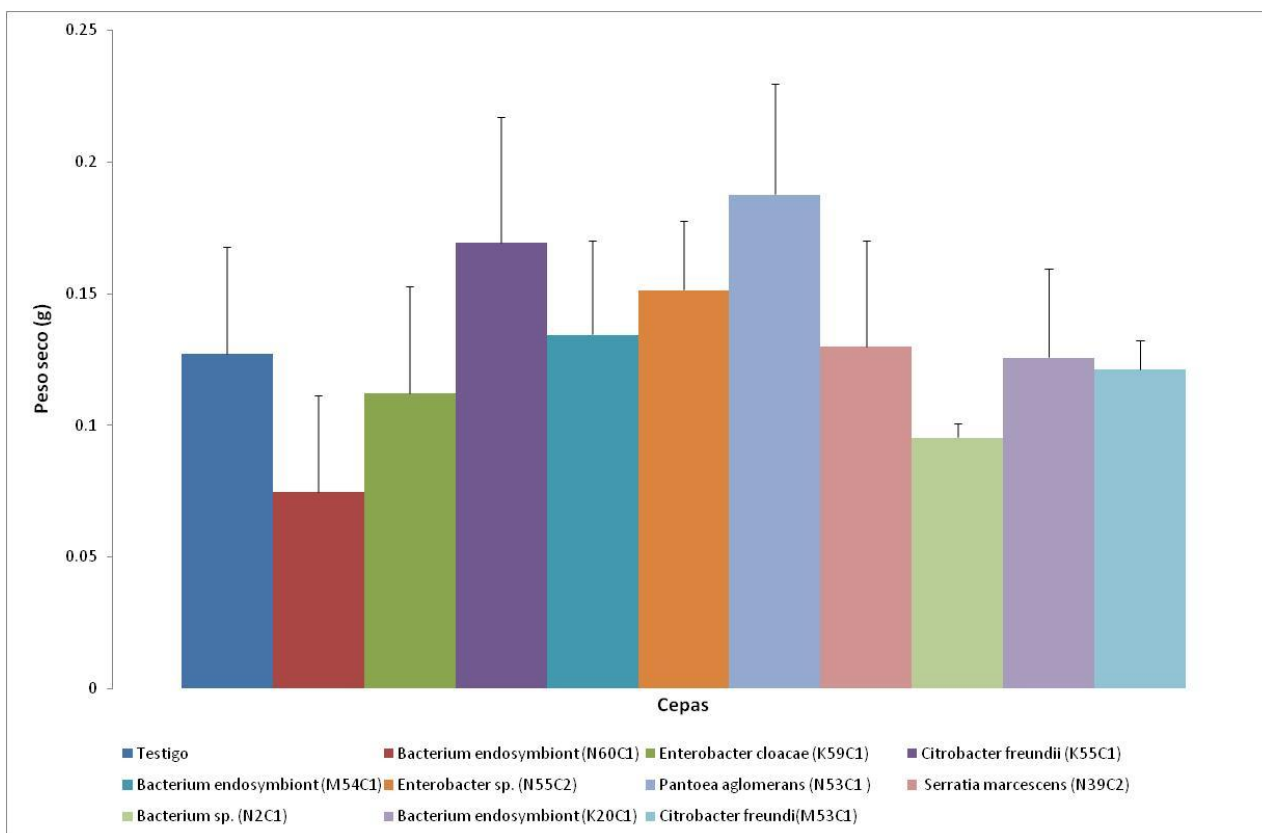


Figura 9. Peso seco de las plántulas en la última medición después de la inoculación.

En la figura 9 se puede observar que las plántulas inoculadas con las cepas *Citrobacter freundii* (K55C1), *Bacterium endosymbiont* (M54C1), *Enterobacter sp.* (N55C2), *Pantoea agglomerans* (N53C1) y *Serratia marcescens* (N39C2) reflejan un mejor efecto en los gramos de peso seco en comparación con el testigo, por otro lado los tratamientos con valores más bajos fueron *Bacterium endosymbiont* (N60C1), *Enterobacter cloacae* (K59C1), *Bacterium sp.* (N2C1), *Bacterium endosymbiont* (K20C1) y *Citrobacter freundii* (M53C1).

3.10 Área foliar

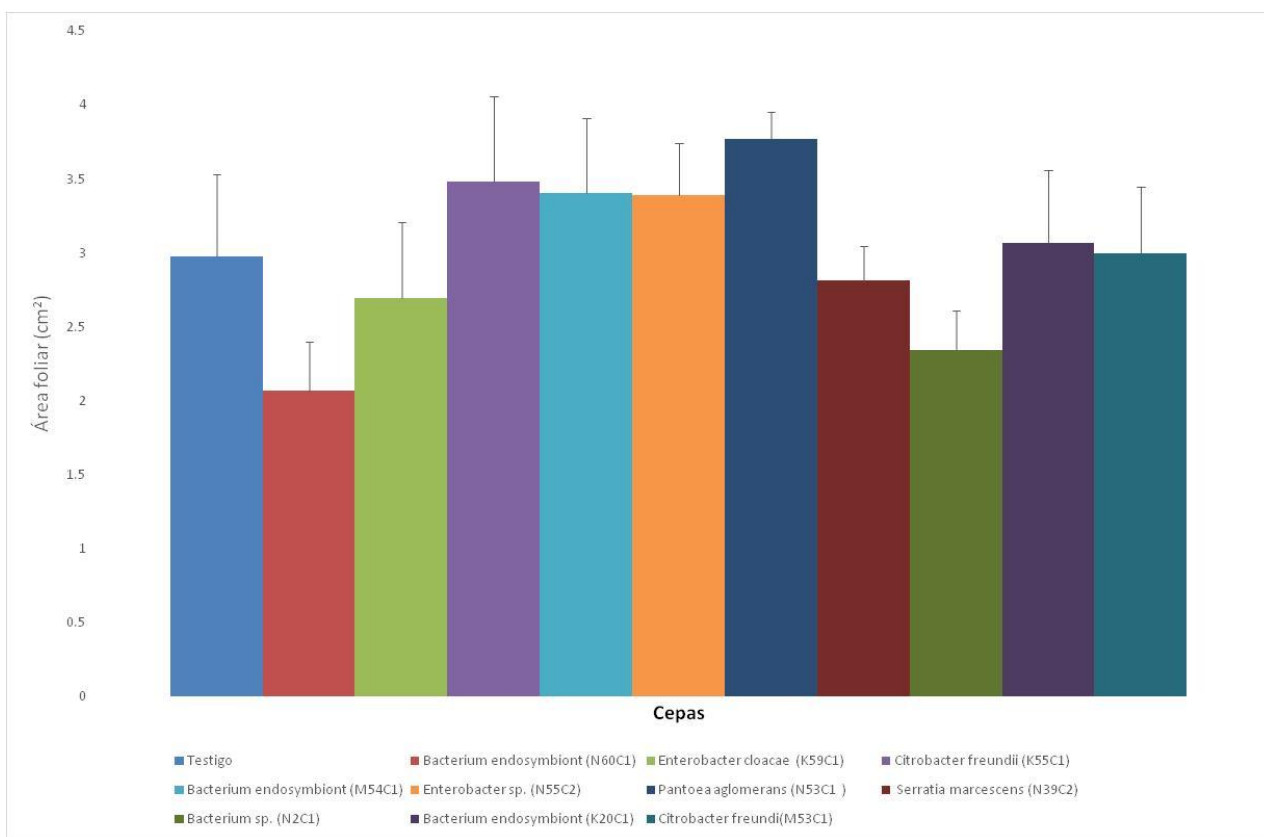


Figura 10. Área foliar de las plántulas en la última medición después de la inoculación.

En la figura 10 se puede observar que en las plántulas inoculadas con las cepas *Citrobacter freundii* (K55C1), *Bacterium endosymbiont* (M54C1), *Enterobacter sp.* (N55C2), *Pantoea agglomerans* (N53C1), *Bacterium endosymbiont* (K20C1) y *Citrobacter freundii* (M53C1) tuvieron un valor más alto que en el testigo, los valores más bajos se presentaron en las plántulas inoculadas con *Bacterium endosymbiont* (N60C1), *Enterobacter cloacae* (K59C1), *Serratia marcescens* (N39C2) y *Bacterium sp.* (N2C1) sin diferencias significativas.

3.11 Longitud de raíces de suelo

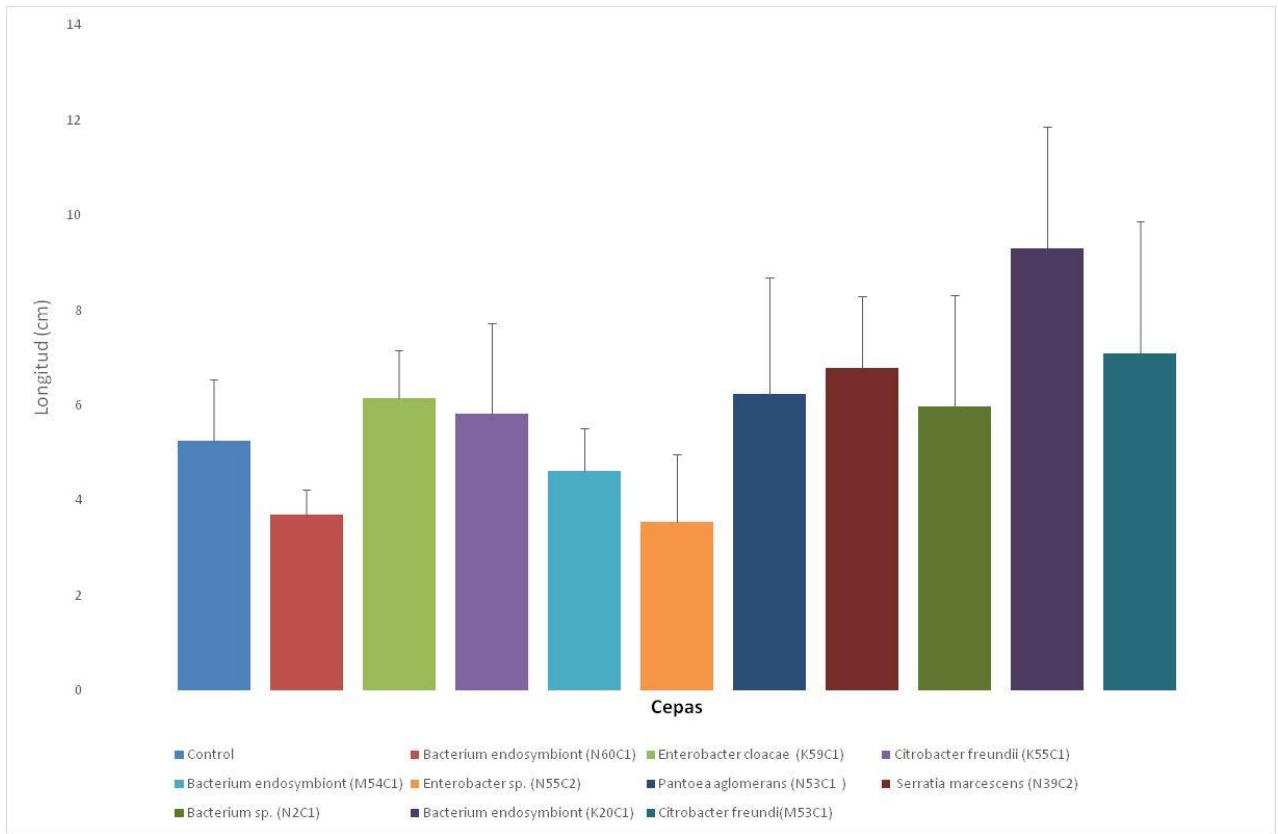


Figura 11. Longitud de raíces de suelo de las plántulas en la última medición después de la inoculación.

La longitud de las raíces de suelo en las plántulas inoculadas con la cepa *Bacterium endosymbiont* (K20C1) con respecto al testigo es mayor con diferencias significativas $p < 0.05$ y se muestran en la figura 11. Los tratamientos inoculados con *Bacterium endosymbiont* (N60C1), *Bacterium endosymbiont* (M54C1) y *Enterobacter sp.* (N55C2) tuvieron valores más bajos en comparación con el testigo, por el contrario los valores fueron elevados en *Enterobacter cloacae* (K59C1), *Citrobacter freundii* (K55C1), *Pantoea agglomerans* (N53C1), *Serratia marcescens* (N39C2), *Bacterium sp.* (N2C1) y *Citrobacter freundii* (M53C1) sin diferencias significativas.

3.12 Clorofila a, b y total

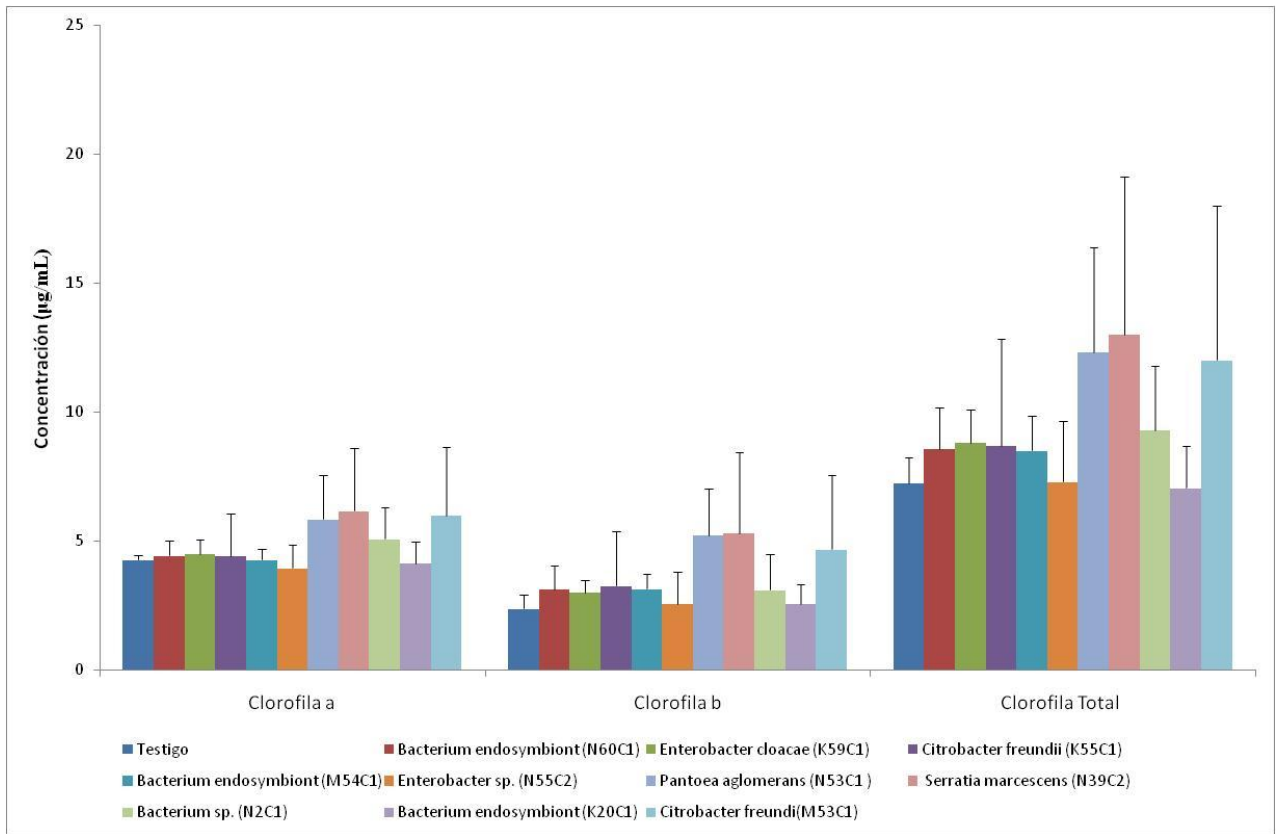


Figura 12. Concentración de clorofila a, b y total de las plántulas en la última medición después de la inoculación.

En la figura 12 se observa que la concentración de clorofila a, b y clorofila total en las plántulas inoculadas con las cepas *Pantoea agglomerans* (N53C1), *Serratia marcescens* (N39C2) y *Citrobacter freundii* (M53C1) fueron mayores en comparación con los demás tratamientos con diferencias significativas $p < 0.05$. La concentración en clorofila a de las plántulas inoculadas con *Bacterium endosymbiont* (N60C1), *Enterobacter cloacae* (K59C1), *Citrobacter freundii* (K55C1), *Bacterium endosymbiont* (M54C1) y *Bacterium sp.* (N2C1) tienen un valor más alto en comparación con el testigo, las bajas concentraciones están representadas por *Enterobacter sp.* (N55C2) y *Bacterium endosymbiont* (K20C1). La concentración del testigo en clorofila b tiene un valor más bajo que los demás tratamientos. La concentración de clorofila total en el testigo tiene un valor inferior en comparación con los demás tratamientos a excepción de las plántulas inoculadas con *Bacterium endosymbiont* (K20C1).

3.13 Concentración de Fe

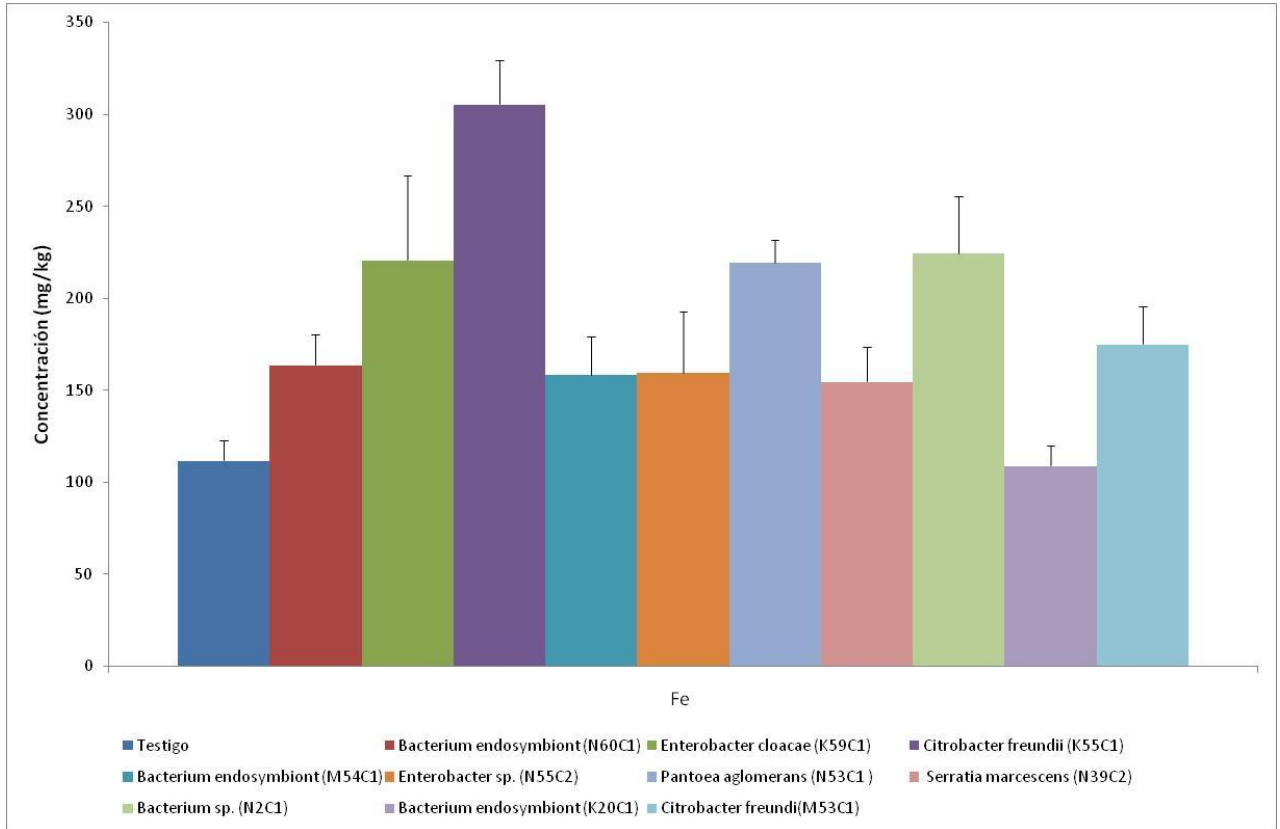


Figura 13. Concentración de Fe en plántulas en la última medición posterior a la inoculación.

En la figura 13 se puede observar una mayor cantidad en la concentración de Fe en las plántulas inoculadas con las cepas *Enterobacter cloacae* (K59C1), *Citrobacter freundii* (K55C1), *Pantoea agglomerans* (N53C1) y *Bacterium sp*(N2C1) respecto del testigo con diferencias significativas $p < 0.05$. Las concentraciones de los demás tratamientos tienen valores más altos en comparación con el testigo.

3.14 Concentración de Zn

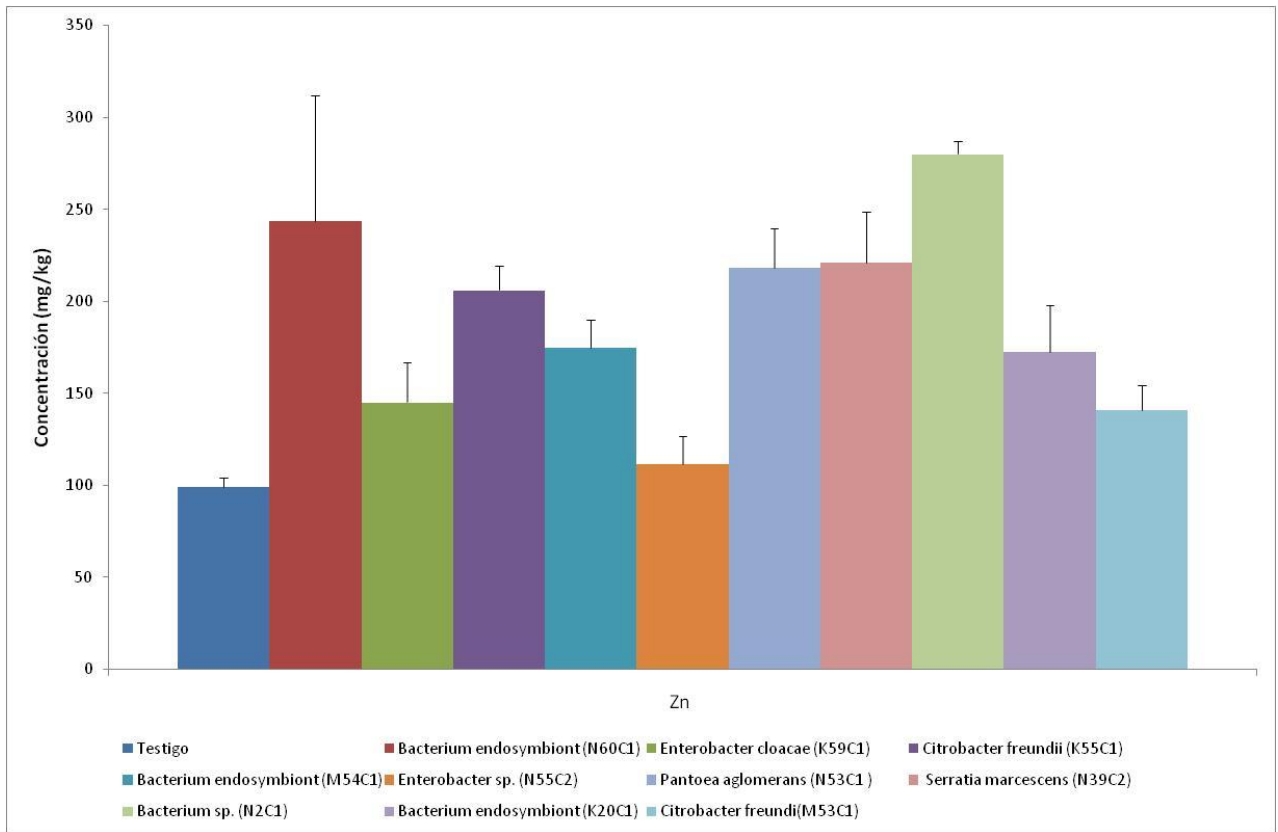


Figura 14. Concentración de Zn en plántulas en la última medición posterior a la inoculación.

La concentración de Zn en las plántulas del testigo tienen un valor más bajo que los demás tratamientos, se puede observar una mayor concentración de Zn en plántulas inoculadas con las cepas *Bacterium endosymbiont* (N60C1) y *Bacterium sp* (N2C1) con diferencias significativas $p < 0.05$ mostradas en la figura 14.

3.15 Concentración de Cu

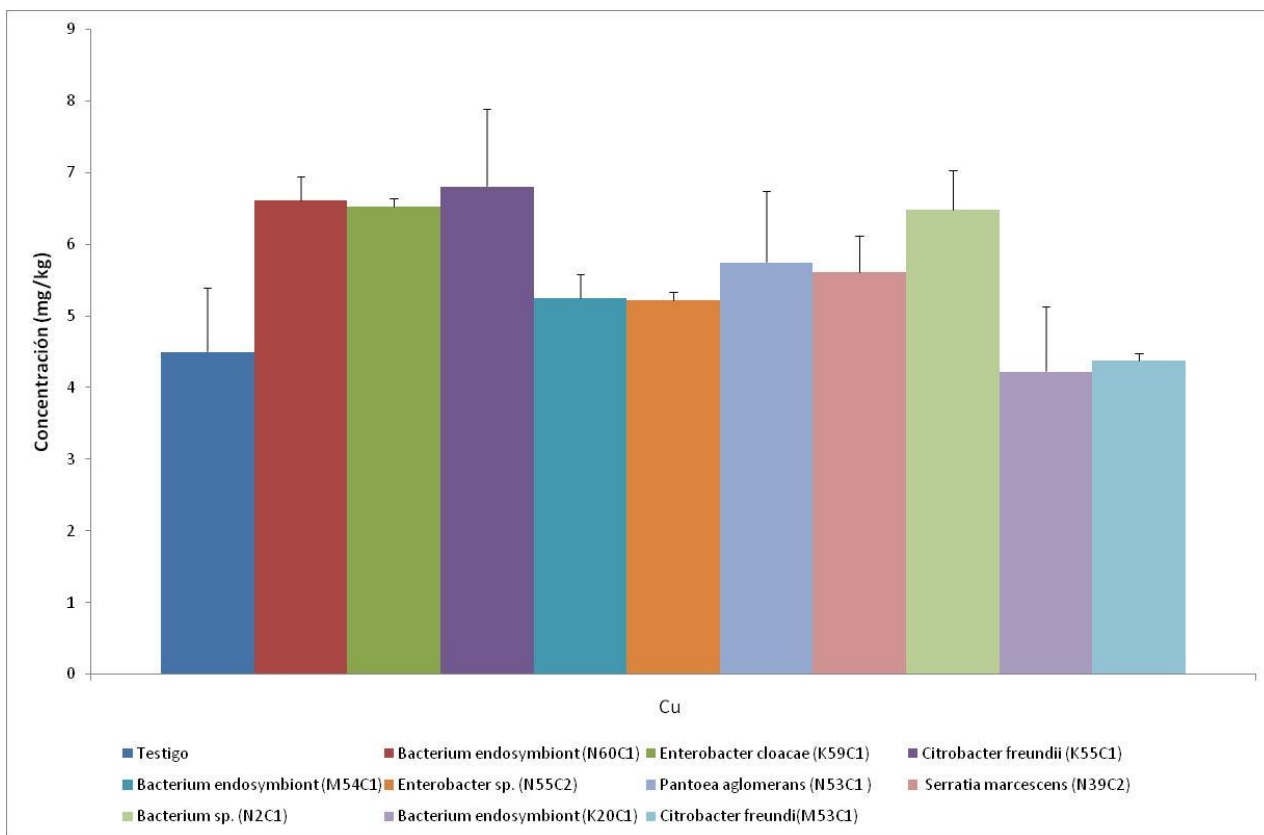


Figura 15. Concentración de Cu en plántulas en la última medición posterior a la inoculación.

En la figura 15 se puede observar que la concentración de Cu en las plántulas inoculadas con las cepas *Bacterium endosymbiont* (K20C1) y *Citrobacter freundii* (M53C1) tienen una concentración más baja en comparación con el testigo, las plántulas inoculadas con *Bacterium endosymbiont* (N60C1), *Enterobacter cloacae* (K59C1), *Citrobacter freundii* (K55C1), *Bacterium endosymbiont* (M54C1), *Enterobacter sp.* (N55C2), *Pantoea agglomerans* (N53C1), *Serratia marcescens* (N39C2) y *Bacterium sp.* (N2C1) tuvieron un mejor efecto sin diferencias significativas.

3.16 Concentración de Mn

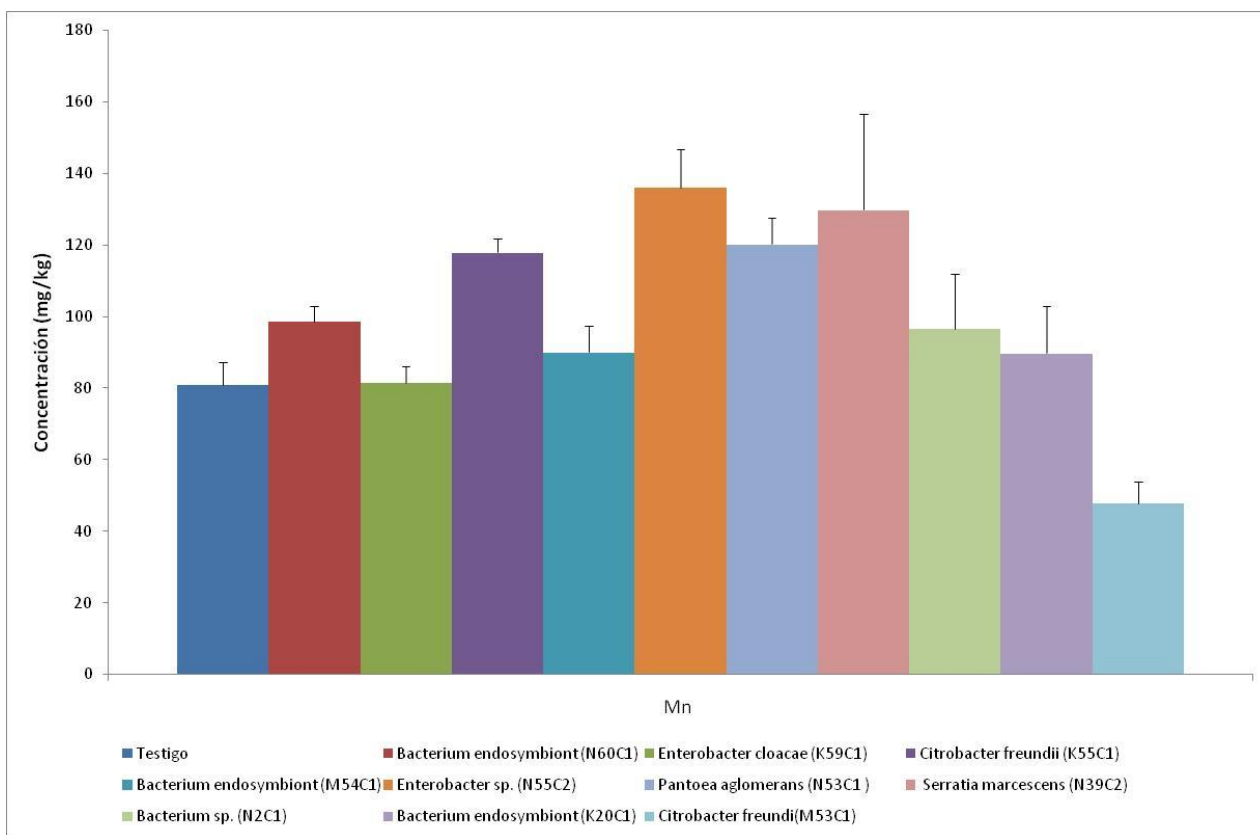


Figura 16. Concentración de Mn en plántulas en la última medición posterior a la inoculación.

En la figura 16 se puede observar una mayor concentración de Mn con diferencias significativas $p < 0.05$ en las plántulas inoculadas con *Enterobacter sp* (N55C2) y *Serratia marcescens* (N39C2) en comparación con el testigo. El valor en la concentración en las plántulas inoculadas con *Citrobacter freundii* (M53C1) es más bajo en comparación con el testigo, los tratamientos inoculados con *Bacterium endosymbiont* (N60C1), *Enterobacter cloacae* (K59C1), *Citrobacter freundii* (K55C1), *Bacterium endosymbiont* (M54C1), *Pantoea agglomerans* (N53C1), *Bacterium sp.* (N2C1) y *Bacterium endosymbiont* (K20C1) tuvieron un valor más elevado que el testigo sin diferencias significativas.

3.17 Concentración de K

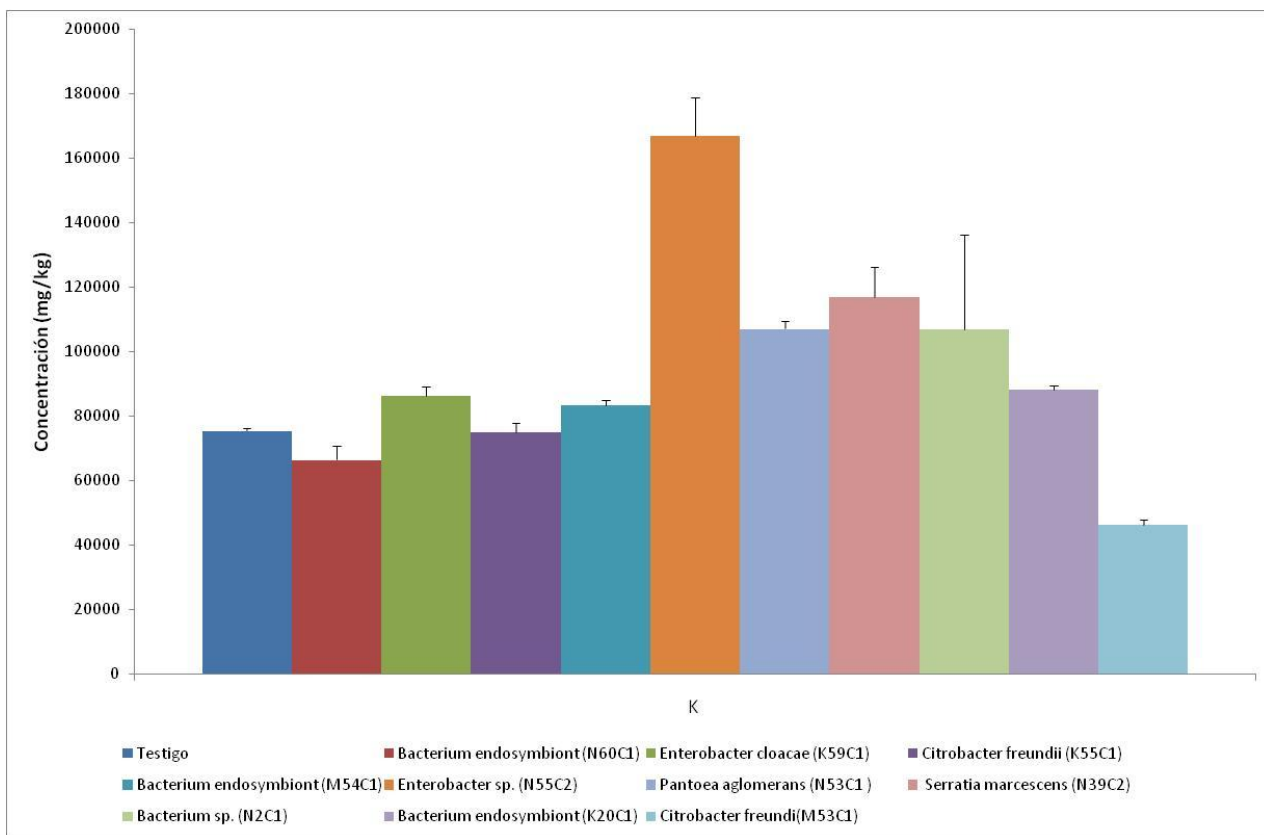


Figura 17. Concentración de K en plántulas en la última medición posterior a la inoculación.

La concentración de K en las plántulas inoculadas con las cepas *Enterobacter sp* (N55C2) y *Serratia marcescens* (N39C2) fue mayor en comparación con el testigo con diferencias significativas $p < 0.05$. Los valores de los tratamientos inoculados con las cepas *Bacterium endosymbiont* (N60C1), *Citrobacter freundii* (K55C1) y *Citrobacter freundii* (M53C1) son más bajos en comparación con los del testigo, por otra parte las plántulas inoculadas con *Enterobacter cloacae* (K59C1), *Bacterium endosymbiont* (M54C1), *Pantoea agglomerans* (N53C1), *Bacterium sp.* (N2C1) y *Bacterium endosymbiont* (K20C1) obtuvieron valores más altos sin diferencias significativas como se puede observar en la figura 17.

3.18 Concentración de P

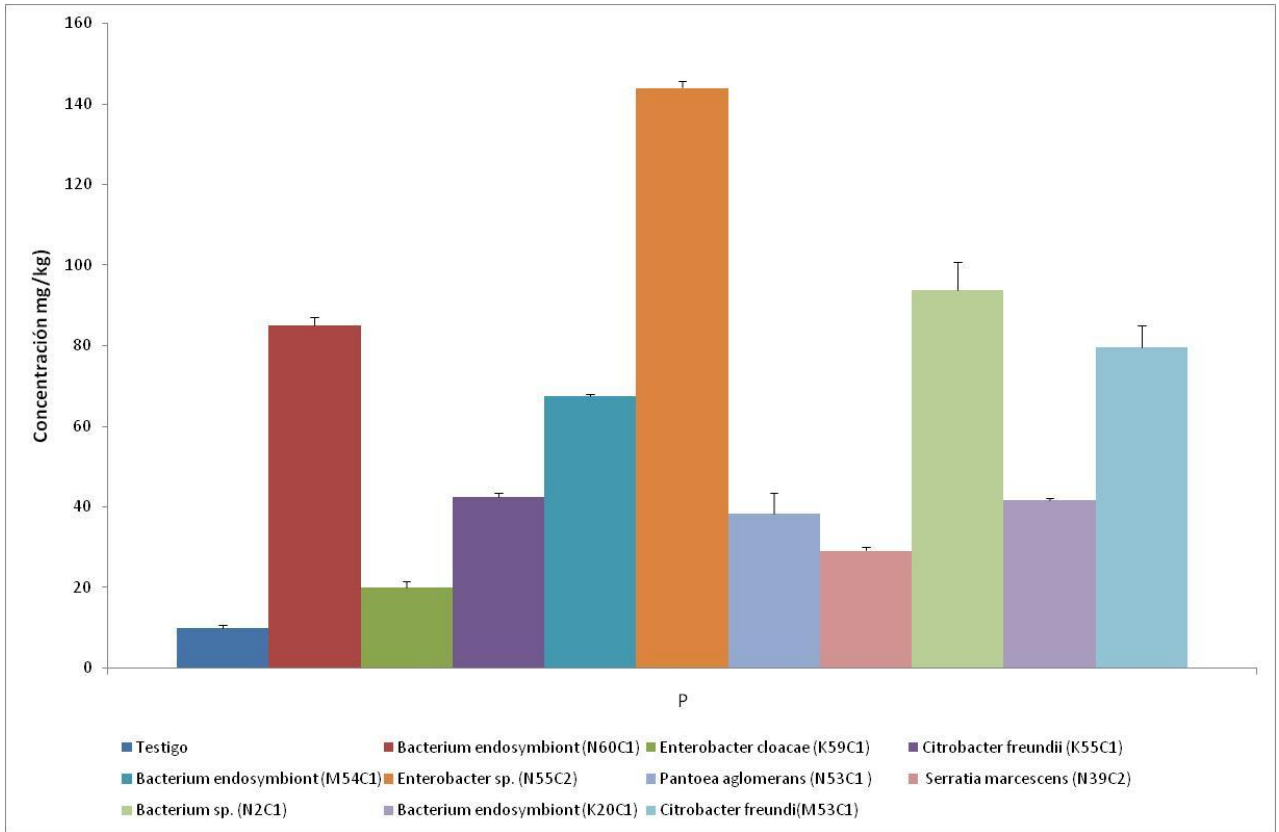


Figura 18. Concentración de P en plántulas en la última medición posterior a la inoculación.

En la figura 18 se puede observar diferencias significativas $p < 0.05$ en la concentración de P donde el valor es mayor en comparación con el testigo a excepción de *Enterobacter cloacae* (K59C1) donde no hubo diferencia significativa.

CONCLUSIONES.

El análisis de las propiedades promotoras del crecimiento sobre las plántulas de vainilla por la cepa *Pantoea agglomerans* (N53C1) tiene un mejor efecto de acuerdo a los valores obtenidos durante las mediciones realizadas en campo después de la inoculación. Dicho efecto se observa en los parámetros de longitud, número de raíces adventicias, peso seco, área foliar e incremento de altura con una diferencia significativa de $p < 0.05$ con respecto al testigo en el incremento total.

Para las plántulas inoculadas con *Enterobacter sp* (N55C2) las diferencias se presentaron en Mn y K, los tratamientos con *Bacterium endosymbiont* (N60C1) tuvieron mayor longitud en sus raíces de suelo, ambos con diferencia significativa de $p < 0.05$ respecto al testigo

La cepa bacteriana *Serratia marcescens* (N39C2) registró un efecto mayor en las concentraciones de Mn, K así como clorofila a, b y total con una diferencia significativa de $p < 0.05$ en comparación con testigo. Para número de nudos y número de hojas totales se registró un valor más elevado que los demás tratamientos.

La inoculación de las plántulas con la bacteria *Citrobacter freundii* (K55C1) se observó que la concentración de Fe, clorofila a, b y clorofila total fue la mayor en comparación con el testigo con diferencia significativa de $p < 0.05$, en el caso de Cu y peso fresco obtuvo un valor más alto.

Las plántulas inoculadas con *Bacterium sp* (N55C2) tuvieron una mayor concentración de Fe y Zn respecto al testigo con $p < 0.05$.

Para la concentración de P el valor del testigo fue menor que los demás tratamientos con diferencias significativas de $p < 0.05$ a excepción de *Enterobacter cloacae* (K59C1)

Las plántulas inoculadas con *Bacterium endosymbiont* (N60C1) reflejaron una mayor concentración de Zn respecto del testigo con una diferencia significativa de $p < 0.05$, se observó un valor más alto en el número de brotes a diferencia de los demás tratamientos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M. 2006. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 36:1-9.
- Ahmet, E., Hilal, E.Y., Sezai, E.M., Figen, D., Metin, T., Gunes, A., 2010. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Microbiological Research*. 124: 62–66
- Barrera R.A.I, Herrera C.B.E, Jaramillo V.J.L, Escobedo G.J.S, Bustamante González A. 2009. Characterization of vanilla production systems (vanilla planifolia a.) under orange tree and mesh shade in the totonacapan region. *Tropical and Subtropical Agroecosystem*. 2(10):199-212
- Bashan, Y., Hernandez, J.P., Leyva, L.A., Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol. Fertil Soils* 35: 359-368.
- Bashan, Y., Holguin, G., de Bashan, L.E. 2004. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. *Canadian Journal of Microbiology* 50: 521-577
- Camelo, R. M., Vera, M., Bonilla B. 2011. Mechanisms of action of plant growth promoting rhizobacteria. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 12(2): 159-166
- Castro B.G., García F.J G. 2007. Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) crop systems used in the Totonacapan area of Veracruz, Mexico: Biological and productivity evaluation. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. 2 (5): 136-142
- Chanway, C.P., Hynes, R.K., Nelson, L.M. 1989. Plant growth-promoting rhizobacteria: Effects on growth and nitrogen fixation of lentil. *Soil Biol. Biochem*. 21: 511-514
- Chávez B., Lozuna L., Bárcenas O., García S., Olalde P.V. 2011. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) asociadas a aguacatero en huertos de Uruapan, Michoacán, México. *Microbiological Research*. 2:5-9
- Curti, E.D. 1995. Cultivo y beneficiado de vainilla en México. Organización Nacional de Vainilleros Indígenas de México. 2:1-96 p.
- Dawwam, G. E., Elbeltagy, A., Emara, H.M., Abbas, I.H., Hassan, M.M. 2013. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. *Annals of Agricultural science* .58(2), 195–201
- Deepti, B., Nidhi, B., Deepamala, M., Chandan, S., Kalra, A. 2012. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. *Plant Physiology and Biochemistry* .58:227-235

Díaz V.P., Ferrera C.R., Almaraz S.J.J., Alcántar G.G. 2001. Inoculation of Plant Growth-promoting Bacteria in Lettuce. *Terra* .4(19): 327-335.

Elorza M.P., López H.M., Hernández F.A.D., Olmedo P.G., Dominguez B.C., Maruri G.J.M. 2007.Efecto del tipo de tutor sobre el contenido de vainillina y clorofila en vainas de vainilla (*Vanilla planifolia* Andrews) en Tuxpan, Veracruz, México. *UDO Agrícola* . 7 (1): 228-236.

Fischer, S.E., Miguel, M.J., Mori, G.B. 2003. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *azospirillum brasilense* cd under saline stress.*FEMS Microbiol. Lett.* 219: 53-62

Glick, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research* .169:30-39

Gutiérrez, G., Almaráz, R., 2007. Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 13(2): 157-162.

Henry, A., Kelso, B., Khalidou, M., Sánchez Morales, S., Reyes López D. 2012.In situ ESTIMATION OF Kcini IN VANILLA (*Vanilla planifolia* A). *Agrociencia* .46: 499-506

Hernández C.S., Aguilar, J. 2013. Evaluación de enraizadores naturales (orgánicos) en el cultivo de vainilla (*vanilla planifolia* andrew). *Agroecología de recursos fitogenéticos y ecosistémicos*. 2:14-25

Hernández, H., J.2000. Producción intensiva de la vainilla. Memoria Técnica No. 6 del día del productor agropecuario y forestal. Campo experimental Ixtacuaco-Inifap Pág. 64p.

Hopkings, W. Y. 2004. *Intriduction to plant physiology*.New Jersey: Wiley-Liss.32(3):450-482

Jaramillo, J.L., Escobedo. G., Barrera, R. 2012. Competitiveness of Benefited Vanilla Systems (*Vanilla Planifolia* J.) in the Región of Totonacapan, Mexico. *Panorama Socioeconómico* .45(30):80-93

Kazuo, I., Hiroko, S.Y.,Rie,Goto. 2009. Ethylene production by gynoecium and receptacle is associated with sepal abscission in cut *Delphinium* flowers. *Postharvest Biology and Technology* . 52 (2009) 267–272

Kibret, M. A. 2013. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University Science* .26(2013):1-20

La vainilla una tradición con alto potencial. (Claridades). ASERCA. 2002., 44:6.

Landa, B., Mavrodi, O., Raaijmakers, M., McSpadden, B., Thomashow, L., Weller, D. 2002. Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinolproducing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. *EnvironmentMicrobiological*. 68(7):3226-3237.

Mavrodi, O.V., Mavrodi, D., Park, A., Weller, D., Thomashow, L. 2006. The role of *dsbA* in colonization of the wheat rhizosphere by *Pseudomonasfluorescens* Q8r1-96. *Microbiological* 152:863-872.

Nico, M., Ribaudó, C.M., Gori, J.I., Cantore, M.I., Curá, J.A. 2012. Uptake of phosphate and promotion of vegetative growth in glucose-exuding rice plants (*Oryza sativa*) inoculated with plant growth-promoting bacteria. *Applied Soil Ecology* .61:190-195

Read, D. 1998. Plants on the web. *Nature*. 396:22-23.

Reyes, I., Álvaro, L., El Ayoubi, H., Valery, A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*. 20: 37-40

Rodríguez M. Ma. N., Chávez, R., García C.J.L., Benavides M.A. 2013. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo de melón (*Cucumis melo*). *Interciencia* .12(38):857-862

Sagarpa. (2011). Paquete tecnológico Vainilla. Recuperado el 28 de Abril de 2014, de www.gobiernofederal.gob.mx www.sagarpa.gob.mx www.inifap.gob.mx

Sánchez, M., S. 1992. Manual de producción de vainilla en el estado de Veracruz. Manual para productores # 3. SARH-INIFAP Campo Experimental Papantla. Papantla, Veracruz, México. 28 p.

Saubidet, M.I., Fatta, N., Barneix, A.J. 2002. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant Soil* 245: 215-222.

Shoresh, M., Yedidia, I., Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by Trichoderma asperellum T20. Phytopathol. 95(1):66-77.

Simons, M., Van Der Bij, A., Brand, J., De Weger, L., Wijffelman, C., Lugtenberg, B. 1996. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting Pseudomonas bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions. 9:600-607.

Soto, A.M. 2006. Vainilla: Los retos de un cultivo basado en una especie amenazada con una historia de vida compleja. Herbario AMO México D.F. Páginas 26-28 en Consejo Veracruzano de la Vainilla, editor. Congreso Internacional de Productores de Vainilla, Papantla , Veracruz, Mex.

Stéphane, C., Clément, C., Sessitsch, A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry* .42 : 669-678

Van, E. N. 1997. Total Sulphur Determination in Plant Material. *Springer-Verlag* .2:1-38

Woojong, Y., Sundaram, S., Kiyoon, K., Gillseung, L., Tongmin, S. 2013. Ethylene emission and PR protein synthesis in ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. inoculated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) challenged with *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* . 67 (2013) 95-104