



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**



**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS  
PRODUCTORAS DE GIBERELINAS  
PRESENTES EN PLANTAS DE  
*STANOPHEA TIGRINA* CON EFECTO  
PROMOTOR DE CRECIMIENTO VEGETAL**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)  
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

Q.F.B. JENNY GARCÍA SÁNCHEZ

**DIRECTORA DE TESIS:**

D. C. REBECA D. MARTÍNEZ CONTRERAS

**PUEBLA. PUE.**

**ENERO. 2018**



Puebla, Pue. a 4 de enero 2017.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
P R E S E N T E.**

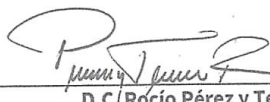
Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Jenny García Sánchez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**“Identificación de bacterias productoras de giberelinas presentes en plantas de *Stanhopea tigrina* con efecto promotor de crecimiento vegetal”**

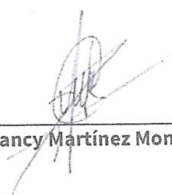
A nuestro juicio, la alumna **Jenny García Sánchez** puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

  
\_\_\_\_\_  
D.C. Rocío Pérez y Terrón

  
\_\_\_\_\_  
D.C. Ana María Arroyo Becerra

  
\_\_\_\_\_  
D.C. Nancy Martínez Montiel

  
\_\_\_\_\_  
D.C. José Antonio Munive Hernández

Posgrado en Ciencias Microbiológicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,  
Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522  
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

Este trabajo de Investigación fue realizado en el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana dentro del grupo de investigación de Biología Molecular y Celular de Hongos liderado por la D.C. Rebeca Débora Martínez Contreras Profesora e Investigadora Titular del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad de Puebla (CICM-ICUAP-BUAP)

La. Q.F.B. Jenny García Sánchez fue beneficiada con la beca número 692923 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

## AGRADECIMIENTOS

Durante este proyecto recibí ayuda inmensurable de nuevos y viejos amigos, son insuficientes las palabras que puedo escribir para expresar mi gratitud pero en pequeños párrafos espero plasmar mis más sinceros sentimientos.

A los que estuvieron involucrados muy de cerca durante el desarrollo del proyecto. Gracias a Sonia, Mayra y Mo que me enseñaron cosas nuevas dentro del laboratorio e hicieron del trabajo un rato agradable y sí, fuí la mas “Doris” del equipo.

Gracias a la Dra. Rebeca y Nancy, que me dieron un lugar en su equipo y un tema que desarrollar totalmente ajeno a lo que conocía pero que me enseñó nuevas cosas y que no existen las respuestas malas solo mal justificadas ¡Gracias por su guía!

Agradezco a la Dra. Ana, por acogerme en su equipo durante mi estancia en el CIBA, gracias también al Dr. Migue, a la M.C. Selma y demás integrantes del equipo del laboratorio molecular de plantas, por sus aportaciones y por su ayuda durante mi tiempo con ustedes.

A mi comité revisor y tutorial: D.C. José A. Munive, D.C. Rocio Pérez y Terrón, D.C. Analilia Arroyo y D.C. Nancy Martínez por su tiempo y consejos durante la escritura de este trabajo.

A los que hicieron de mi estancia en el CICM un tiempo más agradable a mis compañeros y amigos de generación por aligerar el peso de la maestría, gracias Iván, Marisol y demás compañeros ¡Fue un placer y un gusto conocerlos!

A mis amigos, al G8: Arely, Natalia, Martha, Ale, Andrea, Alex, Iván y Neri siempre es una aventura estar con ustedes. A Dulce gracias por tus consejos y compañía. A Mary y Alan por su compañía a pesar de la distancia. A todos por escuchar mis quejas y frustraciones por los buenos ratos, por los viajes por las salidas al café por todo ¡muchas gracias!

A ti Daniel por ser mi amigo y más que eso, por compartirme tu gusto por las plantas ¡qué bien necesité! por tu compañía, paciencia y consejos. Por todo ¡Gracias!

A mi familia por su apoyo en cada momento, a mis abuelos, tíos y primos. A ti Yame por hacer de mi primer congreso internacional una experiencia inolvidable. A mis hermanos, Diana, Jose Luis y Jareny, porque ustedes me motivan y desesperan, gracias por su apoyo y sus consejos y por fingir escucharme. A ti abuelita Yoya, gracias por estar siempre con nosotros, por su cariño y apoyo, porque usted se ha convertido en un ejemplo a seguir y en una inspiración por todo ¡muchas gracias! A ti madre por tu amor, por tus preocupaciones, regaños y abrazos por todo lo que eres y por estar siempre conmigo ¡gracias!

Y finalmente a mi papá porque sigues viviendo en mi mente y corazón. Gracias a Dios por haberte conocido por el tiempo que te presto con nosotros y por lo fue, lo que es y lo que será.

## INDICE

ABREVIATURAS .....	8
INDICE DE FIGURAS.....	10
INDICE DE TABLAS.....	12
RESUMEN.....	13
1. INTRODUCCIÓN .....	14
1.1 Morfología de las Orquídeas.....	15
1.1.1 Flor .....	15
1.1.2 Pseudobulbo y rizomas.....	16
1.1.3 Hojas.....	17
1.1.4 Raiz.....	17
1.2 Diversidad de Orquídeas en México.....	18
1.2.1 Orquídeas en Puebla.....	19
1.2.2 Género <i>Stanhopea</i> .....	20
1.2.3 <i>Stanhopea tigrina</i> .....	20
1.3 Bacterias asociadas a Orquídeas (BAO).....	23
1.3.1 BAO con efecto promotor de crecimiento vegetal.....	25
1.4 Giberelinas .....	26
1.4.1 Bacterias productoras de giberelinas .....	28
1.4.2 Ruta biosintética de giberelinas producidas por bacterias.....	29
2. ANTECEDENTES.....	31
3. JUSTIFICACIÓN.....	32
4. OBJETIVO GENERAL .....	33
4.1 Objetivos particulares .....	33
5. METODOLOGÍA .....	34
5.1 Diagrama general de trabajo .....	34
5.2 Aislamiento de cepas bacterianas .....	35
5.2.1 Aislamiento de bacterias epífitas.....	35
5.2.2 Aislamiento de bacterias endófitas.....	36

5.2.3	Aislamiento de bacterias rizosféricas .....	36
5.3	Conservación de cepas .....	36
5.4	Identificación de cepas productoras de giberelinas .....	36
5.4.1	Técnica de Candau .....	36
5.4.2	Obtención de la fase orgánica para la determinación de GAs .....	37
5.4.3	Cromatografía en capa fina (TLC) .....	37
5.4.4	Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a UV (HPLC-UV).....	37
5.5	Ensayos de germinación .....	37
5.5.1	Esterilización de Semillas.....	38
5.5.2	Preparación del inóculo .....	38
5.5.3	Drop Plate .....	38
5.5.4	Siembra e inoculación de la plántula.....	38
5.5.5	Promoción de crecimiento vegetal .....	39
5.6	Identificación molecular .....	39
5.6.1	Extracción de ADN genómico.....	39
5.6.2	Electroforesis de ADN.....	40
5.6.3	Amplificación de 16S rDNA .....	40
5.6.4	Reacción de secuenciación y análisis de las secuencias .....	40
6.	RESULTADOS .....	41
6.1	Aislamiento de cepas bacterianas endófitas y epífitas.....	41
6.2	Identificación de aislados productores de giberelinas .....	46
6.2.1	Método de Candau.....	46
6.2.2	Cromatografía de capa fina (TLC) .....	50
6.2.3	Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a UV (HPLC-UV).....	52
6.3	Efecto promotor de crecimiento vegetal .....	57
6.3.1	Determinación de modelo vegetal .....	57
6.3.2.	Ensayos preliminares de promoción de crecimiento vegetal .....	57
6.3.3.	Ensayos de promoción de crecimiento vegetal.....	59
6.4	Identificación molecular de los aislados bacterianos productores de giberelinas con efecto promotor de crecimiento vegetal. ....	66
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	70

7.1	Aislamiento de cepas bacterianas endófitas y epífitas.....	70
7.2	Identificación de aislados productores de giberelinas .....	73
7.3	Efecto promotor de crecimiento vegetal .....	75
7.4	Identificación molecular de los aislados bacterianos productores de giberelinas....	77
8.	CONCLUSIONES .....	79
9.	PERSPECTIVAS .....	80
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	81
1.	ANEXOS.....	87

## ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ABA	Ácido abscisico
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
BAO	Bacterias asociadas a orquídeas
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPCV	Bacterias promotoras de crecimiento vegetal
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
CPS	Copalil difosfato sintasa
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CYP	monooxigenasas del citocromo P450
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>ent</i> -CPP	<i>ent</i> -copalil difosfato
G	gramos
GA	Giberelina
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas
GGPP	Geranil-geranil difosfato
HPLC	Cromatografía líquida de alta definición
HPLC-UV	Cromatografía líquida de alta definición acoplado a UV
Hrs	Horas
JA	Ácido jasmónico
Kb	Kilobases
KO	<i>ent</i> -kaureno oxidasa
KS	<i>ent</i> -kaureno sintasa
lb	libra
LB	Medio Luria-Bertani



lx	lux
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitro
MM	Medio mínimo enriquecido con sales y vitaminas
mM	Milimolar
N	Normalidad
nm	Nanometros
NOM	Norma oficial mexicana
NUT	Medio nutritivo
p/v	peso/volumen
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Tiempo de retención
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SSI	Solución salina isotónica
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano-HCL
U	Unidades
U.F.C.	Unidades formadoras de colonias
ug	microgramos
uL	microlitro
UV	Ultravioleta
V	Volts
Var	Variedad

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología general de la flor en las orquídeas.....	15
Figura 2. Agrupación de las inflorescencias presentadas por las orquídeas.....	16
Figura 3. Tipos de pseudobulbos encontrados en orquídeas. ....	16
Figura 4. Tipos de hojas encontrados en plantas monocotiledóneas.....	17
Figura 5. Endemismo en distintos grupos taxonómicos en México. ....	18
Figura 6. <i>Stanhopea tigrina</i> .....	21
Figura 7. Distribución de <i>Stanhopea tigrina</i> . ....	22
Figura 8. Estructura General de las Giberelinas. ....	26
Figura 9. Ruta biosintética de Giberelinas en plantas superiores y hongos. ....	27
Figura 10. Ruta biosintética de giberelinas en bacterias. ....	30
Figura 11. Identificación de plantas de <i>Stanhopea tigrina</i> .....	41
Figura 12. Abundancia de aislados bacterianos en <i>S. tigrina</i> . Se muestra el número de aislados obtenidos de cada una de las tres plantas, así como para la flor muestreada. ....	42
Figura 13. Abundancia de aislados bacterianos recuperados en función del medio de cultivo utilizado. ....	43
Figura 14. Distribución de aislados bacterianos en los diferentes tejidos de <i>S. tigrina</i> . ....	44
Figura 15. Relación porcentual de los aislados bacterianos presentes en cada planta de <i>S. tigrina</i> . ....	45
Figura 16. Abundancia de aislados epífitos y endófitos en los diferentes tejidos de <i>S. tigrina</i> . ....	45
Figura 17. Reacción de esterificación del ácido giberélico. ....	46
Figura 18. Evaluación de la producción de GAs mediante la técnica de Candau. ....	47
Figura 19. Aislados bacterianos positivos a la prueba cualitativa de producción de giberelinas.....	48
Figura 20. Identificación de GAs mediante cromatografía en capa fina (TLC).....	51
Figura 21. Identificación de la producción de GA <sub>3</sub> en aislados bacterianos mediante HPLC. ....	53
Figura 22. Identificación de la producción de GA <sub>4</sub> en aislados bacterianos mediante HPLC. ....	54
Figura 23. Ensayo preliminar para evaluar la promoción de crecimiento vegetal .....	58
Figura 24. Prueba piloto de promoción de crecimiento vegetal en V2.....	59
Figura 25. Longitud de la parte aérea para plántulas inoculadas con aislados bacterianos en condiciones de cámara de crecimiento. ....	62
Figura 26. Longitud de la parte aérea para plántulas inoculadas con aislados bacterianos en condiciones de invernadero .....	62
Figura 27. Crecimiento de plantas de maíz var. Legendario tratadas con el aislado 713.....	63
Figura 28. Efecto del aislado 713 en plantas de maíz var. legendario en el estadio V4.....	64

Figura 29. Efecto de los aislados bacterianos productores de GAs en la promoción de crecimiento vegetal en cámara de crecimiento.....65

Figura 30. Efecto de los aislados bacterianos productores de GAs en la promoción de crecimiento vegetal en cámara de invernadero.....66

Figura 31. Tinción de Schaeffer-fulton al aislado 350. ....68

Figura 32. ADN genómico extraído de los aislados bacterianos productores de GAs.....68

Figura 33. Amplicones correspondientes al gen 16S rARN obtenidos para los aislados bacterianos productores de GAs. ....69

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Situación actual de las especies de orquídeas en México.....	19
Tabla 2. Géneros bacterianos asociados a raíces de orquídeas.....	24
Tabla 3. Bacterias reportadas como productoras de giberelinas..	28
Tabla 4. Aislados bacterianos positivos a la prueba cualitativa de producción de giberelinas. .....	49
Tabla 5. Determinación de la producción de GAs mediante HPLC-UV para diferentes aislados bacterianos. ....	56
Tabla 6. Valores promedio de los parámetros variables en condiciones de invernadero. ....	60
Tabla 7. Valores promedio de los parámetros variables en condiciones de cámara de crecimiento. ....	60
Tabla 8. Características microscópicas de los aislados bacterianos utilizados en el experimento de promoción de crecimiento vegetal.....	67
Tabla 9. Identidad de los aislados productores de GAs con efecto positivo en elongación de parte aérea durante estadios tempranos en maíz var. Legendario. ....	70

## RESUMEN

La familia Orchidaceae cuenta con alrededor de 25,000 especies reconocidas, su extremada especialización y su relevancia en procesos biológicos hace difícil su propagación. *Stanhopea tigrina* es una orquídea endémica mexicana de gran valor cultural y se encuentra reportada en la norma ecológica NOM-059-SEMARNAT-2010 como una especie amenazada. La identificación de bacterias asociadas a esta orquídea con la capacidad de producir fitohormonas, giberelinas, capaces de promover el crecimiento vegetal puede ser un excelente método para ayudar a revertir el estado de amenaza en el que se encuentra esta especie. En este estudio se recolectaron 3 plantas y una flor de *Stanhopea tigrina* de la Reserva “Jardín Botánico Xoxotic” (Cuetzalan, Puebla, México) y se aislaron bacterias endófitas, epífitas y rizosféricas de diferentes tejidos de la planta empleando los medios Luria-Bertani (LB), medio nutritivo (NUT) y medio mínimo enriquecido (MM) con la finalidad de recuperar el mayor número de bacterias. Obtuvimos un total de 1024 aislados bacterianos recuperados de rizósfera, raíz, hoja, pseudobulbo y flor. Se observó que el tejido con una mayor abundancia bacteriana fue el pseudobulbo, seguido por la raíz y la hoja. Al analizar la distribución de los aislados, identificamos el mismo número de epífitos y endófitos en hoja y pseudobulbo, mientras que en la flor se encontraron 3 veces más epífitos que endófitos. Se evaluó cualitativamente la capacidad de estos aislados para producir giberelinas y se obtuvieron 18 aislados positivos a la Técnica de Candau cuya producción de GA3 y GA4 se determinó por HPLC-UV, se analizaron los cromatogramas obtenidos y se determinaron 8 aislados bacterianos como los mejores productores de GA3 y GA4, a los que posteriormente se probó su capacidad de promoción de crecimiento vegetal en un híbrido simple de Maíz var. Legendario en condiciones de invernadero y cámara de crecimiento, en ambas condiciones se monitoreo el experimento hasta el estado vegetativo V4, se sacrificaron las plantas para medir parámetros como: longitud, peso fresco y peso seco de parte aérea y raíz. Por medio de un análisis estadístico se obtuvo que los aislados 42, 56, 79, 350 y 713 tienen un efecto de elongación de la parte aérea en las plantas de maíz en los primeros estadios vegetativos, sin embargo este efecto se pierde a partir del estadio V3. Finalmente se amplificó el gen 16s para determinar el género los aislados bacterianos que mostraron un efecto temprano de promoción de crecimiento vegetal los aislados se identificaron como: 42 *Pseudomonas fluorescens*, 56 *Lelliottia amnigena*, 79 *Pseudomonas synxantha* y 713 *Stenotrophomonas maltophilia*. Para el aislado 350 de acuerdo a sus características macro y microscópica se sugiere que pertenece al género *Bacillus*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las orquídeas pertenecen a la familia más extensa de plantas angiospermas y se estima que comprende alrededor de 20,000 a 35,000 especies y cinco subfamilias (Dixon *et al.*, 2003). El 7% de las plantas con flores son orquídeas lo cual las convierte en la familia botánica más extensa. Estas plantas se distribuyen en todos los continentes e incluso en algunas islas de la Antártica, pero su mayor diversidad se concentra en las regiones tropicales, siendo particularmente dominantes en hábitats con pocos nutrientes. Dependiendo del lugar donde crecen estas plantas presentan diferentes hábitats: terrestres, litófitas, epífitas, semiacuáticas y subterráneas, aunque más de la mitad de las especies son epífitas. Las orquídeas constituyen una familia de plantas muy evolucionadas desde el punto de vista botánico debido a las modificaciones de sus estructuras vegetativas y florales, así como a los mecanismo de polinización altamente especializados que emplea (Escamilla & Flores, 2007). Su ciclo vital es complejo y puede asociarse con especies de hongos y polinizadores específicos. Es por esto que las orquídeas ofrecen una excelente oportunidad para el estudio de las interacciones entre plantas, microorganismos y animales. Por otro lado, las orquídeas son extremadamente sensibles a los cambios ambientales, por lo que pueden emplearse como indicadores de la salud de algún hábitat.

La palabra “orquídea” apareció por primera vez en un manuscrito del filósofo griego Therphrastus (371-285 a.C.) y significa “testículo” que hace alusión a los pseudobulbos de algunas especies (Freuler, 2007). La clasificación de la familia es compleja por su gran tamaño, preferencia por hábitats tropicales, la rareza de muchas de las especies, el intenso interés hortícola, y demasiada confianza en la morfología floral.

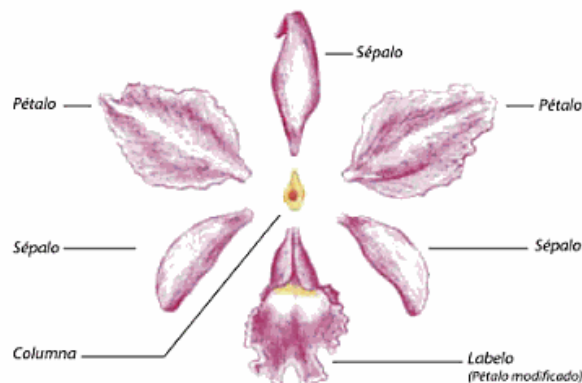
Las orquídeas son una de las plantas más atractivas y han sido apreciadas desde la antigüedad. En Grecia se les atribuían propiedades curativas y afrodisiacas. Los mexicas y mayas enriquecían una bebida espesa a base de cacao con la vainilla obtenida de la orquídea *Vanilla planifolia*. Estas plantas poseen una considerable importancia económica, en especial en horticultura y floristería, pero también en la industria farmacéutica y de las esencias. Sin embargo, la sobre explotación, la pérdida y fragmentación del hábitat, el desajuste en las conexiones ecológicas con los polinizadores, así como la introducción de plagas y enfermedades amenazan a la población de orquídeas a nivel mundial (Swarts & Dixon, 2009).

## 1.1 Morfología de las Orquídeas

Las orquídeas se componen de las siguientes partes estructurales: flor, pseudobulbo, tallo, hojas y raíces. Esta organización particular hace de la orquídea una planta muy llamativa a la vista por sus espectaculares flores que tienen gran variedad de colores y formas, además de su característico aroma. A continuación se presentan algunas de las características que presentan las diferentes estructuras de esta familia de plantas.

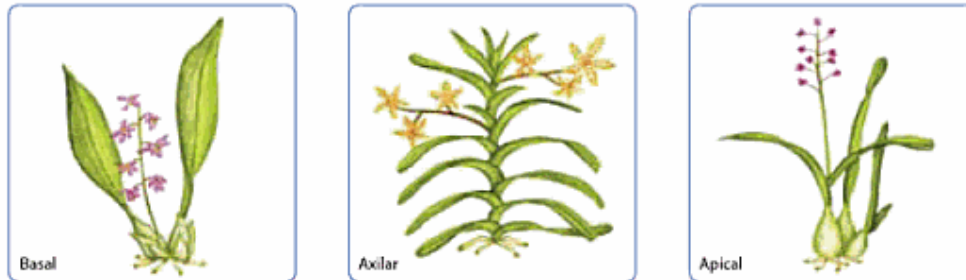
### 1.1.1 Flor

Las flores están altamente especializadas en relación a sus polinizadores. En las orquídeas, las flores presentan simetría bilateral, zigomorfa y cuentan con las siguientes estructuras, las cuales se muestran en la figura 1: tres sépalos, tres pétalos y el pétalo de en medio o labelo que sirve para que se posen los insectos (Freuler, 2007), contribuyendo así a la polinización de la planta. Los sépalos forman un círculo exterior en la flor y sirven de cáliz, siendo los que se observan en el botón floral. Estos pueden ser distintos en forma y tamaño a los pétalos. Los sépalos también pueden ser similares o distintos entre sí e incluso pueden presentar colores más vistosos que los pétalos. El labelo es la parte más atractiva de la flor ya que presenta una enorme cantidad de formas y colores, característica única en todo el reino vegetal y la más distintiva de las orquídeas, actuando como atractivo, indicador y plataforma para los polinizadores.



**Figura 1. Morfología general de la flor en las orquídeas.** Se indican las principales partes que la componen: 3 sépalos, 3 pétalos de los cuales uno de los cuales es modificado para el pose de los polinizadores y se conoce como labelo, además de una columna donde se encuentran las estructuras reproductivas.

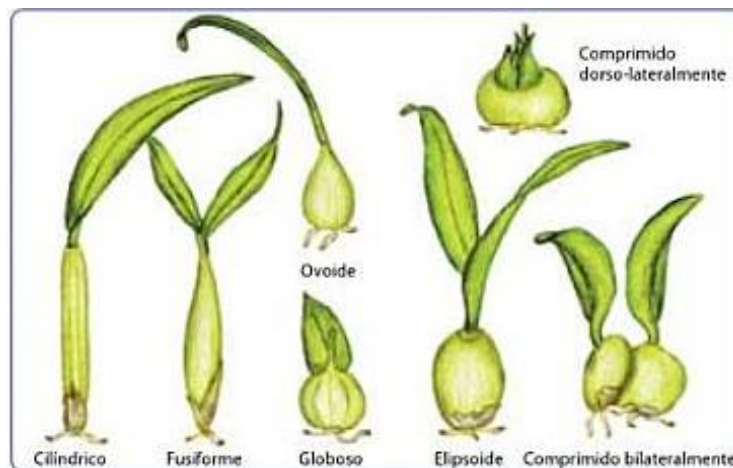
En cuanto a la disposición de las flores, es común que éstas se agrupen en inflorescencias, es decir, sobre un tallo. Dependiendo del sitio de la planta en donde emergen las flores, ésta puede considerarse como basal si la vara floral surge de la base del pseudobulbo, axilar cuando la vara floral sale de entre el tallo y la hoja o apical (también llamada terminal) cuando la vara surge de la punta del tallo o pseudobulbo (Fig. 2).



**Figura 2. Agrupación de las inflorescencias presentadas por las orquídeas.** Se puede observar una diferente organización de las flores, dependiendo de lo cual la planta puede ser considerada como basal, axilar o apical.

### 1.1.2 Pseudobulbo y rizomas

Las plantas simpodiales tienen un rizoma (tallo subterráneo o aéreo) a partir del cual se originan pseudobulbos, que son los órganos de reserva de alimento y agua. Los rizomas más jóvenes llevan las hojas, son portadores de yemas auxiliares, dan origen a raíces y en muchos casos a las flores. En cuanto a su forma, los rizomas pueden ser cilíndricos, fusiformes, elípticos, ovalados, etc. (Fig. 3). Estas estructuras son características de las orquídeas y relevantes para el mantenimiento de la salud y fisiología de la planta.

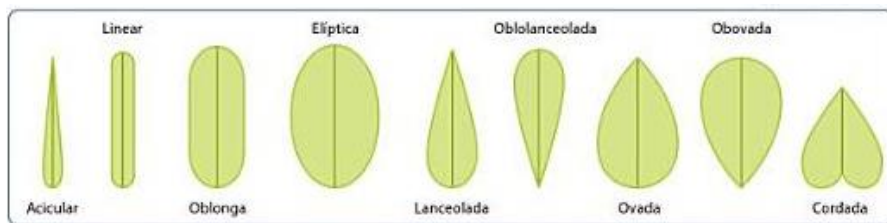


**Figura 3. Tipos de pseudobulbos encontrados en orquídeas.** Estas estructuras pueden presentar formas diversas su función principal es de reserva.



### 1.1.3 Hojas

Del rizoma o tallo nacen las hojas. Como las monocotiledóneas, las hojas presentan nervaduras, que llevan agua y transportan los productos de fotosíntesis, corren paralelas entre sí y al eje longitudinal (Fig. 4).



**Figura 4. Tipos de hojas encontrados en plantas monocotiledóneas.** La forma de las hojas puede ser variable, pero todas presentan nervaduras de origen axial. Las hojas de especies que habitan en lugares calurosos son cilíndricas para evitar una rápida deshidratación.

### 1.1.4 Raiz

En la mayoría de las orquídeas, las raíces se observan gruesas apenas emergen del rizoma, pseudobulbo o tallo y a veces se ramifican cuando son muy largas, generalmente se encuentran cubiertas por un tejido que actúa como una esponja, llamado velamen.

Las raíces de las orquídeas pueden ser diferentes dependiendo del género correspondiente, dependiendo también del sustrato en el que se desarrolla. Por lo general, las orquídeas epífitas presentan raíces que se encuentran al aire y tienen la característica de tener un tipo de cofia en la parte terminal y son revestidas por un tejido esponjoso llamado velamen que, dotado de clorofila, desarrolla la fotosíntesis y absorbe el vapor húmedo de la atmósfera. Los géneros más conocidos de orquídeas epífitas incluyen a *Cattleya*, *Vanda*, y *Odontoglossum*.

En el caso de las orquídeas terrestres, las cuales prevalecen en los climas templados, las raíces se encuentran firmes en la tierra y a través de ellas, la planta absorbe los elementos nutritivos. En las orquídeas terrestres podemos encontrar formaciones llamadas tubérculos las cuales se forman por la fusión de algunas raíces que presentan color negro cuando han alimentado el botón del año corriente o de color blanco cuando están destinados a proveer sustancias nutritivas al botón del año siguiente. Ejemplos típicos de estas orquídeas son *Cymbidium*, *Cypripedium* y *Paphiopedilum*.

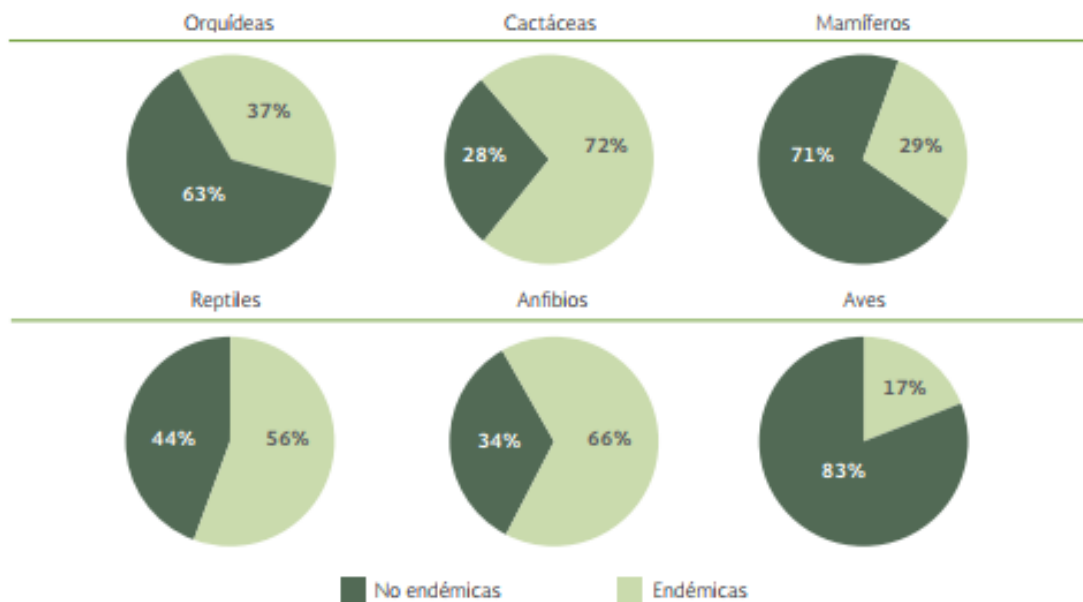
Existen también orquídeas semi-epífitas, correspondientes a plantas que viven sobre las ramas y sobre los troncos de otras plantas, o bien litófilas o rupícolas que viven sobre las rocas cubiertas por una sutil capa de fragmentos vegetales, musgos y líquenes que tienen raíces que son intermedias entre las epífitas y las terrestres. Por ejemplo, las plantas del género *Cattleya* pueden ser epífitas o semi-epífitas. Finalmente, algunas orquídeas viven como parásitos y pueden parecer desabastecidas de clorofila lo que conduce a una vida heterótrofa. Algunas especies poseen raíces infectadas por hongos, mientras que otras como la *Corallorhiza* no

tienen raíces, en donde la función de las raíces es asumida por las ramificaciones del rizoma que presenta un aspecto coralino.

## 1.2 Diversidad de Orquídeas en México

México es un país con gran diversidad biológica debido a diversos factores como su geología, ya que cuenta con una variada topografía que incluyen amplias serranías, cadenas volcánicas y mesetas, así como por su ubicación geográfica entre otros factores, lo que explica la variedad de climas que se encuentran en su territorio, los cuales pueden ir desde cálidos húmedos hasta fríos alpinos. El conjunto de estos factores han generado en México las condiciones necesarias para la presencia de la mayoría de ecosistemas reconocidos en el planeta (Semarnat, 2015). En este sentido, México es uno de los 17 países megadiversos, los cuales en conjunto reúnen entre el 65 y 70% de la riqueza mundial de especies e inicialmente se estimó que México poseía entre el 10 y 12% de la diversidad del mundo (Martinez-Meyer *et al.*, 2014).

Además de la riqueza de especies, la proporción de taxa endémicos de México se aproxima a 10% en el caso de géneros y 52% en especies, lo que indica que el territorio nacional ha sido el sitio de origen y evolución de un gran número de linajes vegetales (Tellez-Velasco, 2011).



Fuente:  
Coordinación de información y servicios externos, Conabio, México, 2015.

**Figura 5. Endemismo en distintos grupos taxonómicos en México.** Tomado de SEMARNAT 2015

Se ha calculado que la familia *Orchidaceae* ocupa el tercer lugar a nivel nacional en lo referente a las familias de plantas con mayor diversidad superada solo por las familias Asteraceae y Fabaceae. En México las orquídeas están representadas por 170 géneros y 1,260 especies, de las cuales el 37 % son endémicas (Fig. 5). Del total de las especies reportadas, el 60% son epífitas y se encuentran distribuidas principalmente en los bosques mesófilos de montaña (bosques de niebla) donde encontramos del 50 al 60% de las especies de orquídeas del país (Cox *et al.*, 2016). Sin embargo, existen muchas especies que aún no han sido descritas, por lo que posiblemente su diversidad se encuentre subestimada.

En México la colecta de orquídeas está regulada por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, que determina las especies y subespecies de flora y fauna terrestre y acuática que están en peligro de extinción, amenazadas y sujetas a protección especial. En la tabla 1 se muestra la distribución de especies de orquídeas con base a su estado de amenaza. Cabe resaltar que alrededor del 40% de estas especies son endémicas de México.

**Tabla 1. Situación actual de las especies de orquídeas en México. Modificado de López (2007).**

Categoría	Especies Reportadas	Especies Endémicas
<b>Probablemente extinta (E)</b>	1	1
<b>En Peligro de extinción (P)</b>	15	5
<b>Amenazada (A)</b>	58	26
<b>Sujeta a protección especial (Pr)</b>	107	40
<b>Total</b>	<b>181</b>	<b>72</b>

En el siglo XVI, el estudioso Francisco Hernández, bajo la encomienda de Felipe II, publicó los primeros dibujos de cinco orquídeas mexicanas: *Stanhopea*, *Laelia*, *Encyclia*, *Bletia* y *Vanilla planifolia* (Tellez-Velasco, 2011). Sin embargo, el cultivo de orquídeas en nuestro país tiene más de 500 años, ya que los aristócratas aztecas las cultivaban para sus colecciones particulares. Actualmente, las orquídeas son usadas para múltiples aplicaciones, desde la fabricación de instrumentos, para los que se utilizan pseudobulbos de *Laelia*, *Prosthechea* y *Bletia*, hasta remedios medicinales como el empleo de *Catasetum integerrimum* para el tratamiento de tumores, entre otras actividades culturales y sociales.

### 1.2.1 Orquídeas en Puebla

En Puebla, el conocimiento de la orquideoflora del estado proviene solo de los listados disponibles a nivel nacional, en donde se ha reportado la presencia de 152 especies de orquídeas correspondientes a 58 géneros, de las cuales 94 especies se localizan en el

municipio de Cuetzalan (Perez-Bravo, 2010). Dentro de estos géneros encontramos como endémico el género de *Stanhopea*.

### 1.2.2 Género *Stanhopea*

Este género está integrado a la sub-tribu Stanhopeinae, la cual consta de aproximadamente 22 géneros morfológicamente complejos con flores fragantes y aromáticas que son polinizadas por abejas macho euglosinas (Tellez-Velasco, 2011).

La descripción botánica completa del género *Stanhopea* incluye las siguientes características: son plantas perennes, epífitas o litófitas; presenta pseudobulbos agregados, conspicuos, de un solo entrenudo, sulcados, unifoliados; sus hojas son perennes, pecioladas, plegadas, coriáceas, con pecíolo sulcado; muestran inflorescencia lateral, surgiendo de la base de los pseudobulbos. Esta especie es péndula, racemosa, de pocas flores, con grandes brácteas cartáceas; de flores vistosas, generalmente suculentas, colgantes con sépalos libres, extendidos, semejantes entre sí en forma, amplios, cóncavos, de laterales a poco oblicuos, pétalos libres, generalmente recurvados, más angostos que los sépalos, ondulados; el labelo es suculento, ceroso, rígido, complejo, dividido en tres porciones reconocibles: hipoquilo que usualmente es cimbiforme y giboso, mesoquilo algo constreñido, corto y por lo común produce un cuerno suculento a cada lado, y epiquilo entero o trilobado, frecuentemente recurvado. La columna es alargada, arqueada, áptera o ampliamente alada, con un pie prominente; antera terminal, operculada, incumbente, polinario formado por dos polinios, dorsiventralmente aplanados, estípites laminar, viscidio apical; con fruto en forma de cápsula, generalmente elipsoide.

El género *Stanhopea* está presente en México con 13 especies reconocidas (Gerlach, 2009) De acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010, de las 13 especies presentes en México, tres se encuentran amenazadas: *S. ecornuta*, *S. oculata* y *S. tigrina*. *Stanhopea tigrina* es una de las orquídeas más espectaculares del país, endémica de México y se encuentra actualmente en estado de amenaza.

### 1.2.3 *Stanhopea tigrina*

*Stanhopea tigrina* es una planta mediana, epífita o litófila de unos 50 centímetros de alto, con pseudobulbos globosos y una sola hoja terminal, que produce una inflorescencia con una o dos flores de hasta 15 cm de diámetro color marfil con manchas color vino (Moreno-Martinez & Menchada-García, 2007). Esta planta posee un labelo complejo de tres piezas y con terminación en dos estructuras semejantes a cuernos, de ahí su nombre coloquial de “torito.” Sus flores presentan un dulce y penetrante aroma que es ocasionado principalmente por la presencia del compuesto acetato de feniletilo (Gerlach, 2009); esta fuerte fragancia atrae a su

polinizador correspondiente a la abeja *Euglossa viridissima*, que son polinizadores muy fuertes capaces de viajar grandes distancias (Fig. 6).



**Figura 6.** *Stanhopea tigrina*. Fotografía de una planta epífita de *Stanhopea tigrina*: se observan dos flores colgantes mirando hacia abajo, sépalos crema o amarillos, con manchas color púrpura a púrpura renegrido, pétalos amarillos con una gran mancha púrpura en la base y otras más submarginales.

A continuación se muestra la clasificación taxonómica de *Stanhopea tigrina*.

**Reino:** *Plantae*

**División:** *Magnoliophyta*

**Clase:** *Liliopsida*

**Orden:** *Asparagales*

**Familia:** *Orchidaceae*

**Subfamilia:** *Epidendrideae*

**Tribu:** *Maxillarieae*

**Subtribu:** *Stanhopeinae*

**Género:** *Stanhopea*

**Especie:** *Stanhopea tigrina*

*Stanhopea tigrina* se establece en la Sierra Madre Oriental (Fig. 7), crece en bosques de encino húmedos, en selva mediana perennifolia y en bosque de pino, encinos. Las regiones prioritarias en las que crece son: El Cielo, Sierra Gorda-Río Moctezuma, Bosques mesófilos de la Sierra Madre Oriental, Cuetzalan, Sierra Norte de Oaxaca-Mixe (Soto-Arenas *et al.*, 2007). *S. tigrina* es una planta tan apreciada que ha resultado emblemática de las orquídeas de México y es el símbolo de la Asociación Mexicana de Orquideología. A.C.

A nivel mundial las orquídeas es uno de los grupos de plantas más vulnerables, debido a la sobreexplotación del medio silvestre, el tráfico ilegal, la pérdida de hábitat, así como el cambio climático; por otro lado, las características biológicas inherentes de esta familia como sus complicadas estrategias adaptativas, los altos niveles de especialización-polinizador, las minúsculas semillas y la dependencia simbiótica con un hongo micorrízico para germinar hacen difícil su supervivencia.



**Figura 7. Distribución de *Stanhopea tigrina*.** *S. tigrina* se establece principalmente en la Sierra Madre Oriental entre los estados de Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz. CONABIO 2007.

En el caso *Stanhopea tigrina*, las principales causas que ponen en riesgo la población de esta orquídea en los estados de Puebla y el centro de Veracruz son la deforestación y fragmentación de su hábitat así como la excesiva colecta de especímenes (Soto-Arenas *et al.*, 2007). En este sentido, es necesario buscar alternativas de conservación como el estudio de su microbioma, ya que es fundamental para la salud de la planta; la manipulación de los microorganismos asociados puede reducir potencialmente la incidencia de enfermedades, incrementar su producción y reducir el uso de insumos de origen químico resultando en prácticas agrícolas sustentables (Turner *et al.*, 2013).

En algunos casos, principalmente para las orquídeas terrestres, se ha descrito la importancia la relación orquídea-hongo (McKendrick, 2000) donde la asociación micorrízica es necesaria para la germinación de sus semillas, principalmente con hongos basidiomicetos del grupo de *Rhizoctonia* (Rasmussen, 1995). Si bien es indiscutible la importancia de la relación orquídea-

hongo para ciertas especies, es necesario explorar también la relación orquídea-bacteria y la importancia de esta interacción para el crecimiento de la planta.

### 1.3 Bacterias asociadas a Orquídeas (BAO)

Las bacterias asociadas a orquídeas (BAO) tienen la capacidad de colonizar tejidos subterráneos de orquídeas terrestres, lo cual se ha descrito para diversas especies de orquídeas en Tailandia. Por otro lado, se ha demostrado que existe un patrón estacional en el cual los géneros identificados para las BAO varía de acuerdo a la época del año. Además, algunas BAO son capaces de promover una germinación simbiótica con *Cymbidium goeringii*, *Orchis miitaris*, etc (Faria *et al.*, 2013). Por lo que uno de los posibles métodos para la conservación y adaptación de orquídeas raras o en algún estado de amenaza puede venir de la bacterización *in vitro* con especies promotoras de crecimiento vegetal. Sin embargo, la información acerca de las BAO es escasa y son pocos los grupos de investigación dedicados a este tema de estudio (Tsavkelova, 2011). Dentro de algunos géneros bacterianos que se han encontrado asociados a orquídeas podemos mencionar a *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Flavobacterium* entre otros (tabla 2).

**Tabla 2. Géneros bacterianos asociados a raíces de orquídeas. Modificado de Tsavkelova, E. 2011**

<b>Planta</b>	<b>Géneros aislados de rizósfera</b>	<b>Géneros aislados como endófitos</b>
<b>Orquídeas que crecieron en condiciones silvestres</b>		
<i>Paphiopedilum appletonianum</i> (Orquídea terrestre)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus</i></li> <li>• <i>Burkholderia</i></li> <li>• <i>Erwinia</i></li> <li>• <i>Nocardia</i></li> <li>• <i>Pseudomonas</i></li> <li>• <i>Streptomyces</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus</i></li> <li>• <i>Erwinia</i></li> <li>• <i>Pseudomonas</i></li> <li>• <i>Streptomyces</i></li> </ul>
<i>Pholidota articulata</i> (orquídea epífita)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Agrobacterium</i></li> <li>• <i>Bacillus</i></li> <li>• <i>Burkholderia</i></li> <li>• <i>Chryseobacterium</i></li> <li>• <i>Erwinia</i></li> <li>• <i>Flavobacterium</i></li> <li>• <i>Pantoea</i></li> <li>• <i>Paracoccus</i></li> <li>• <i>Stenotrophomonas</i></li> <li>• <i>Pseudomonas</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus</i></li> <li>• <i>Flavobacterium</i></li> <li>• <i>Pseudomonas</i></li> </ul>
<b>Orquídeas epífitas crecidas en invernadero</b>		
<i>Dendrobium moschatum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus</i></li> <li>• <i>Flavobacterium</i></li> <li>• <i>Microbacterium</i></li> <li>• <i>Nocardia</i></li> <li>• <i>Pseudomonas</i></li> <li>• <i>Rhodococcus</i></li> <li>• <i>Sphingomonas</i></li> <li>• <i>Xanthomonas</i></li> </ul>	--
<i>Acampe papillosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus</i></li> <li>• <i>Flavobacterium</i></li> <li>• <i>Micrococcus</i></li> <li>• <i>Pseudomonas</i></li> <li>• <i>Rhodococcus</i></li> <li>• <i>Streptomyces</i></li> <li>• <i>Xanthomonas</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus</i></li> <li>• <i>Flavobacterium</i></li> <li>• <i>Pseudomonas</i></li> <li>• <i>Rhodococcus</i></li> <li>• <i>Xanthomonas</i></li> </ul>



### 1.3.1 BAO con efecto promotor de crecimiento vegetal

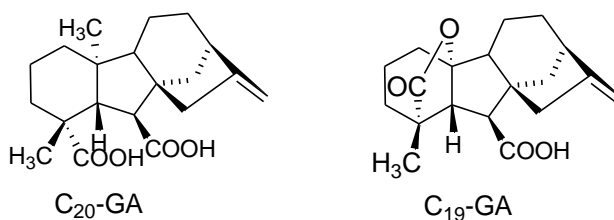
Las rizobacterias y bacterias endófitas tienen un gran impacto sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, por medio de diversos mecanismos que incluyen la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la producción de sideróforos, su participación en el biocontrol de patógenos de plantas, la captación de nutrientes y la producción de fitohormonas como auxinas, citoquininas, ácido abscísico y giberelinas. (Shahzad *et al.*, 2016).

Para el caso específico de bacterias asociadas a orquídeas, se sabe que algunas cepas de BAO son capaces de promover la germinación simbiótica de *Pterostylis vittata* por medio de la producción de sustancias promotoras de crecimiento en la rizósfera. En este sentido, se ha demostrado que cepas de *Pseudomonas putida*, *Xanthomonas maltophilia* y *Bacillus cereus* promovían una germinación simbiótica en *Pterostylis vittata* debido, probablemente, a la producción de auxinas por estas BAO o por la inducción de la producción de hormonas endógenas en la orquídea debido a la presencia de metabolitos producidos por estas cepas (Wilkinson *et al.*, 1994). En otro estudio, se obtuvieron 26 aislados bacterianos del rizoplaneo de la orquídea *Cattleya walkeriana*, de los cuales 11 fueron epífitos y 15 endófitos y dentro de ellos se seleccionaron los cuatro mejores productores de auxinas. Dichos productores correspondieron a dos aislados epífitos y dos endófitos, los cuales se identificaron como pertenecientes a los géneros *Burkholderia sp.*, *Curtobacteria sp.*, *Enterobacter sp.* y *Bacillus sp.* De los cuatro productores, solamente los dos aislados bacterianos correspondientes a las cepas de *Enterobacter sp.* y *Bacillus sp.* fueron capaces de promover el crecimiento en plántulas de *Cattleya walkeriana* durante su aclimatación *ex vitro* en invernadero (Galindo-Junior *et al.*, 2011). De manera independiente, se ha reportado que dos bacterias endófitas pertenecientes al género *Paenibacillus* y aisladas de *Cymbidium ebumeum* promovían el crecimiento vegetal en plántulas de *Cattleya loddigesii* (Faria *et al.*, 2013). Finalmente, un estudio reciente demostró que la cepa de *Sphingomonas paucimobilis* ZJSH1, asociada con *Dendrobium officinale*, incrementaba el crecimiento en tallos y peso fresco en plántulas de esta misma orquídea por medio de una combinación de fitohormonas como ácido salicílico, ácido 3-indol acético, Zeatina y ácido abscísico (ABA), así como un incremento en la fijación de nitrógeno (Yang *et al.*, 2014).

Como se mencionó anteriormente, es escasa la información relacionada con las bacterias asociadas a orquídeas que puedan promover el crecimiento vegetal; sin embargo, los pocos trabajos reportados se enfocan principalmente a bacterias endófitas debido a su potencial biotecnológico. Hasta este momento podemos asumir que las BAO que promueven el crecimiento vegetal, pueden hacerlo por combinación de diferentes mecanismos como la producción de fitohormonas, empero, hasta el momento no hay reportes de bacterias asociadas a orquídeas productoras de giberelinas promotoras de crecimiento vegetal.

## 1.4 Giberelinas

Las giberelinas son fitohormonas diterpenoides que poseen un anillo *ent*-gibberellano. Existen dos tipos principales de giberelinas (Fig. 8), aquellas con 20 átomos de carbono, (C<sub>20</sub>-GAs) y las que han perdido un átomo de carbono y poseen una lactona (C<sub>19</sub>-GAs). Las GAs con mayor actividad biológica en las plantas son las del tipo C<sub>19</sub> (Srivastava, 2002).

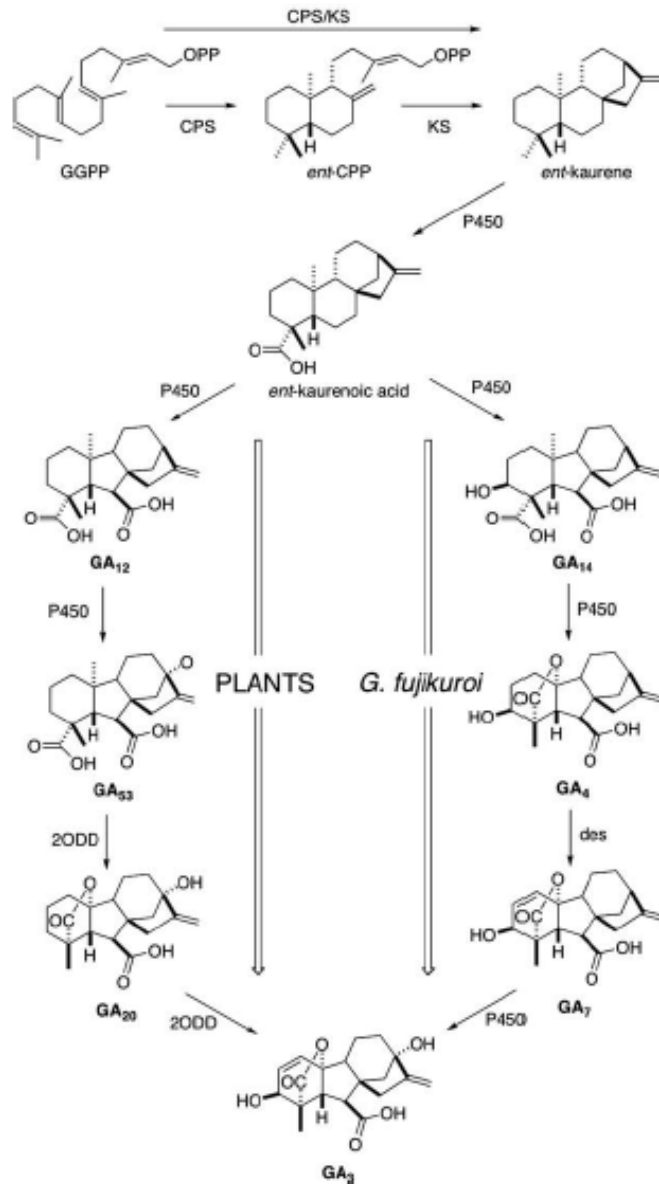


**Figura 8. Estructura General de las Giberelinas.** Existen dos principales estructuras de las GAs, las C<sub>20</sub>-GAs y las C<sub>19</sub>-GAs, ambos grupos presentan el anillo *ent*-gibberelano característico de estos compuestos.

Las giberelinas fueron descubiertas por Ewiti Kurosawa en 1926, aisladas del hongo *Gibberella fujikuroi*, sin embargo, su efecto había sido observado mucho tiempo atrás por los agricultores de arroz de Asia, donde una enfermedad hacía que las plantas de arroz crecieran altas y sin semillas. En Japón esta enfermedad se conocía con el nombre de la “planta loca” o “bakanae” (Taiz, 2006). Las principales funciones de las giberelinas son la interrupción del periodo de latencia de las semillas haciéndolas germinar, la inducción del desarrollo de yemas y frutos, así como la regulación del crecimiento longitudinal del tallo y la elongación de órganos axiales como pecíolos, pedúnculos, etc. Los principales usos comerciales de las giberelinas son el aumento de rendimiento en la producción de caña de azúcar, la obtención de uvas sin semillas, la elongación de manzanas y el retraso de la senescencia en cítricos alargando el periodo comercial.

Las giberelinas se forman a partir de la ciclación del geranil geranil difosfato (GGPP), con lo que se produce *ent*-kaureno. En plantas superiores, la ciclación ocurre en dos pasos que requieren dos enzimas: copalil difosfato sintasa (CPS) que produce *ent*-copalil difosfato (*ent*-CPP) y *ent*-kaureno sintasa (KS), que genera el producto final (Fig. 9). En hongos y en el musgo *Physcomitrella patens* la ciclación de dos pasos del GGPP al *ent*-kaureno es catalizada por una diterpeno sintasa bifuncional (CPS/KS). Subsecuentemente, el *ent*-kaureno es convertido en ácido *ent*-Kaurenoico por la enzima P450 en ambos organismos. El paso final de la ruta biosintética consiste en la formación de giberelinas bioactivas, la cual se lleva a cabo por una dioxigenasa dependiente de 2 oxoglutarato (2ODDs) en plantas, mientras que los hongos dependen de enzimas P450 para la generación de estas mismas moléculas (Morrone *et al.*, 2009).

Aunque históricamente las giberelinas fueron descubiertas en hongos, actualmente se encuentra bien establecido que estas fitohormonas no son solo producidas por hongos y plantas superiores, sino que también son producidas por diversas especies de bacterias.



**Figura 9. Ruta biosintética de Giberelinas en plantas superiores y hongos.** La ruta empieza a partir de la ciclación del geranyl geranyl difosfato (GGPP), para la cual las plantas superiores utilizan dos diferentes enzimas (CPS y KS), mientras que en hongos y en algunos musgos se lleva a cabo por una diterpeno sintasa bifuncional (CPS/KS). GGPP: Geranyl-geranyl difosfato, CPS: Copalil difosfato sintasa, KS: ent-kaureno sintasa, CPS/KS: diterpeno sintasa bifuncional (Tomado de Morrone *et al.*, 2009).

### 1.4.1 Bacterias productoras de giberelinas

El primer reporte de la producción de giberelinas por bacterias se realizó en 1988, cuando Atzorn y colaboradores detectaron la presencia de estas sustancias en cultivos de *Rhizobium phaseoli* por medio de la cromatografía líquida de alta definición (HPLC), en donde GA<sub>1</sub> y GA<sub>4</sub> fueron las giberelinas detectadas en mayor concentración (Atzorn, 1988). En 1989, Bottini y colaboradores identificaron a GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub> en cultivos de *Azospirillum lipoferum* utilizando espectrofotometría de masas acoplada a cromatografía capilar de gases (GC-MS); años después estos mismos investigadores demostraron también la presencia de GA<sub>4</sub>, GA<sub>9</sub> y GA<sub>20</sub> en *A. lipoferum* (Botinni *et al.*, 1989; Piccoli *et al.*, 1996).

Las giberelinas biológicamente activas corresponden principalmente a GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub>, las cuales se han identificado por medio de GC-MS en cultivos de *Acetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum seropedicae*, ambas bacterias promotoras del crecimiento en gramíneas (Bastian *et al.*, 1998). A continuación se enlistan en la tabla 3 las especies bacterianas productoras de giberelinas que han sido reportadas hasta este momento.

**Tabla 3. Bacterias reportadas como productoras de giberelinas. Modificado de Kang *et al.*, 2014.**

Bacteria	Giberelinas aisladas	Referencia
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	GA <sub>3</sub>	Moreno-Ramirez <i>et al.</i> , 2014
	GA <sub>1</sub> y GA <sub>4</sub>	Atzorn, 1988
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	GA <sub>1</sub> , GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> , GA <sub>9</sub> , GA <sub>12</sub> , GA <sub>15</sub> , GA <sub>19</sub> , GA <sub>20</sub> , GA <sub>24</sub> y GA <sub>53</sub>	Kang <i>et al.</i> , (2009)
<i>Arthronacter koreensis</i>	GA <sub>1</sub> , GA <sub>3</sub>	Piccoli <i>et al.</i> , 2011
<i>Azospirillum lipoferum</i>	GA <sub>1</sub> y GA <sub>3</sub>	Bastian <i>et al.</i> , 1998
<i>Azospirillum brasilense</i>	GA <sub>1</sub> , GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> , GA <sub>9</sub> y GA <sub>20</sub>	Botinni <i>et al.</i> , 1989; Piccoli <i>et al.</i> , 1996
<i>Bacillus sp</i>	GA <sub>1</sub> y GA <sub>3</sub>	Janzen <i>et al.</i> 1992
<i>Bacillus licheniformi</i>	GA <sub>4</sub> , GA <sub>9</sub> y GA <sub>34</sub>	Kang <i>et al.</i> , 2015
<i>Bacillus methylotrophicus KE2</i>	GA <sub>1</sub> , GA <sub>3</sub> , GA <sub>7</sub> , GA <sub>8</sub> , GA <sub>9</sub> , GA <sub>12</sub> , GA <sub>19</sub> , GA <sub>20</sub> , GA <sub>24</sub> , GA <sub>34</sub> y GA <sub>53</sub>	Radhakrishnan & Lee, 2016
<i>Bacillus pumilus</i>	GA <sub>1</sub> , GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> y GA <sub>20</sub>	Gutiérrez-Mañero, 2001
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GA <sub>20</sub> , GA <sub>36</sub> , GA <sub>24</sub> , GA <sub>4</sub> , GA <sub>53</sub> , GA <sub>9</sub> , GA <sub>19</sub> , GA <sub>5</sub> , GA <sub>12</sub> y GA <sub>8</sub>	Shahzad <i>et al.</i> , 2016
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	GA <sub>9</sub>	Méndez <i>et al.</i> , 2014
<i>Burkholderia sp.</i>	GA <sub>1</sub> , GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> y GA <sub>20</sub>	Gutiérrez-Mañero, 2001
<i>Enterococcus faecium</i>	GA <sub>1</sub> , GA <sub>3</sub> , GA <sub>4</sub> , GA <sub>9</sub> , GA <sub>12</sub> , GA <sub>15</sub> , GA <sub>20</sub> GA <sub>24</sub>	Kang <i>et al.</i> , 2009

<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	GA <sub>1</sub> , GA <sub>3</sub> , GA <sub>7</sub> , GA <sub>8</sub> , GA <sub>9</sub> , GA <sub>12</sub> , GA <sub>19</sub> , GA <sub>20</sub> , GA <sub>24</sub> y GA <sub>53</sub>	Lee <i>et al.</i> , 2015
<i>Leifsonia soli</i>	GA <sub>1</sub> y GA <sub>3</sub>	Bastian <i>et al.</i> , 1998
<i>Sphingomonas sp.</i>	GA <sub>1</sub> , GA <sub>4</sub> , GA <sub>7</sub> , GA <sub>8</sub> , GA <sub>9</sub> , GA <sub>12</sub> , GA <sub>19</sub> , GA <sub>24</sub> , GA <sub>34</sub> y GA <sub>53</sub>	Kang <i>et al.</i> , 2013
<i>Rhizobium phaseoli</i>	GA <sub>4</sub> , GA <sub>9</sub> , GA <sub>20</sub>	Latif-Khan <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudomonas fluorescente</i>	GA <sub>3</sub>	Kapoor <i>et al.</i> , 2016
<i>Promicromonospora sp.</i>	GA <sub>1</sub> , GA <sub>4</sub> , GA <sub>9</sub> , GA <sub>12</sub> , GA <sub>19</sub> , GA <sub>20</sub> , GA <sub>34</sub> y GA <sub>53</sub>	Kang <i>et al.</i> , 2012

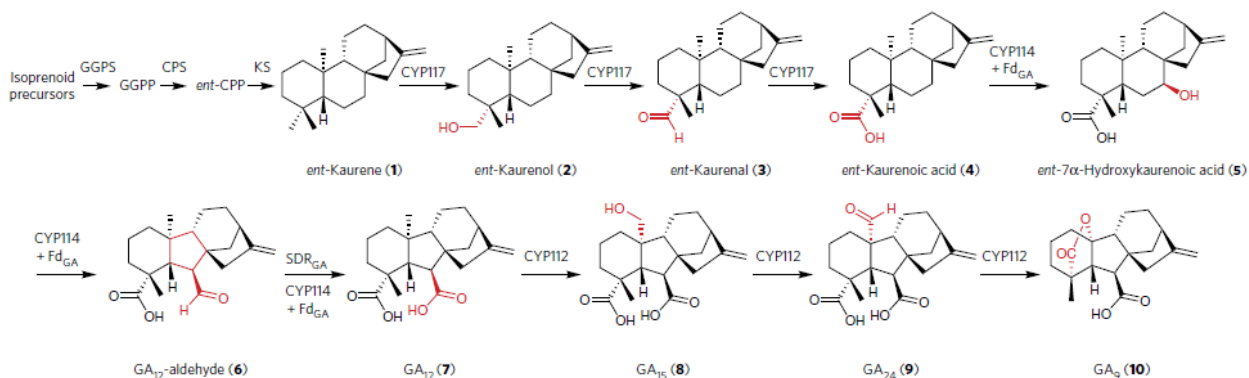
### 1.4.2 Ruta biosintética de giberelinas producidas por bacterias

Hasta hace poco no había suficiente información para elucidar la ruta biosintética que utilizan las bacterias para la producción de estas fitohormonas. La primera evidencia clara sobre el mecanismo utilizado por las bacterias fue la identificación de un *cluster* que codifica para citocromo P450 conformado por los genes *CYP112*, *CYP114* y *CYP117* en *Bradyrhizobium japonicum* (Tully *et al.*, 1998). Además, también en *B. japonicum* se demostró la existencia de genes putativos que codifican para la enzima *ent*-copalil difosfato sintetasa (CPS) y *ent*-kaurene sintetasa (KS) (Monrroe *et al.*, 2009). Adicionalmente se han encontrado homólogos para los genes mencionados en otras rizobacterias como *Sinorhizobium fredii*, *Mesorhizobium loti* y *Rizobium etli*, las cuales han resultado también ser productoras de giberelinas y han demostrado la capacidad de producir *ent*-kaurene a partir de geranil geranil difosfato (Hersey *et al.*, 2014). Hasta estas observaciones se sugería que la ruta biosintética que utilizaban las bacterias para la producción de giberelinas se asemejaba más a la utilizada por las plantas.

Posteriormente se elucidó la ruta biosintética de GAs en *Bradyrhizobium japonicum* y *Sinorhizobium fredii*. Para identificar la función asociada a cada gen; se generaron mutantes mediante “genetic knock-out” para cada uno de los genes sin caracterizar que se encontraban dentro del operón identificado en *B. japonicum* y *S. fredii* (Fig.10). Por otro lado, se expresaron los genes correspondientes al operón putativo para la síntesis de GAs de *S. fredii* NGR234 en la bacteria estrechamente relacionada *Sinorhizobium meliloti* 1021, la cual no contiene el operón. Finalmente, se monitoreó la biosíntesis de GAs mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS) para las diferentes mutantes obtenidas. De esta manera se demostró que *CYP117* actuaba como una *ent*-kaureno oxidasa (KO) convirtiendo eficientemente al alcohol (2), aldehído (3) y ácido carboxílico (4) sin depender de la co-expresión de *Fd<sub>GA</sub>*. Al incubar el compuesto 4 en células que expresaban *CYP114*, éstas eran convertidas al ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico (5) y aldehído (6). Para esta transformación se coexpresaba *Fd<sub>GA</sub>*, implicando que este gen era necesario para la completa funcionalidad de *CYP114*. Cuando se expresaba *Fd<sub>GA</sub>* el compuesto 6 era convertido

eficientemente en 7 (oxidando C7), otorgándole la función a  $Fd_{GA}$  como una GA 7-oxidasa. Cuando se expresaba CYP112, el compuesto 7 se convertía en  $GA_{15}$  (8),  $GA_{24}$  (9) y finalmente en  $GA_9$  (10), todo en ausencia de  $Fd_{GA}$ , demostrando que CYP112 actúa como una GA 20-oxidasa.

Esto indica que la ruta biosintética que siguen las bacterias es una tercera ruta diferente de lo observado en plantas y hongos, puesto que las bacterias emplean un grupo de enzimas distinto para realizar transformaciones relevantes, ya que éstas comparten poca o ninguna homología con las enzimas correspondientes a los análogos funcionales en plantas y hongos (Nett *et al.*, 2017).



**Figura 10. Ruta biosintética de giberelinas en bacterias.** El simbiote de soja *Bradyrhizobium japonicum* contiene un operón que codifica una isoprenoide sintasa (IDS), 2 diterpeno cilcasas putativas y 3 monooxigenasas del citocromo P450 (CYP112, CYP114 y CYP117) una ferredoxina ( $Fd_{GA}$ ) y una dehidrogenasa/reductasa de cadena corta ( $SDR_{GA}$ ) (Tomado de Nett *et al.*, 2017).

Por otro lado, se ha identificado un operón homólogo en el patógeno de arroz *Xanthomonas orizae* pv. *Orizicola* que de igual forma codifica para la producción de CPS y KS que son capaces de producir *ent*-kaurene. Esta cepa produce un diterpenoide *ent*-kaureno como factor de virulencia y en mutantes Knockout de CPS y KS se observó una reducida virulencia esto es consistente con el hecho que las giberelinas son antagonistas del sistema de defensa de las plantas mediadas por JA, sin embargo aún con esta información no es claro el papel que tiene la producción de giberelinas en rizobias simbióticas (Lu *et al.*, 2015)

## 2. ANTECEDENTES

A pesar de la información disponible sobre los microorganismos asociados a orquídeas, aún existe un número elevado de éstas que no han sido estudiadas y para las cuales no se tiene información sobre los microorganismos asociados a dichas plantas. Por otra parte, no existen estudios que describan los microorganismos asociados a las orquídeas endémicas de México. Dentro de estas orquídeas tenemos el caso particular de *Stanhopea tigrina* para la cual no existen reportes acerca de los microorganismos epífitos y endófitos asociados a la misma, por lo que realizar este tipo de estudios puede proporcionar información muy valiosa que ayude en la comprensión de la biodiversidad presente en diferentes nichos ecológicos, así como brindar la oportunidad de identificar microorganismos que pueden ser fuente de una variedad de metabolitos bioactivos con un gran potencial para diferentes aplicaciones.

Al inicio de este trabajo, se tomaron muestras del jardín botánico Xoxoctic localizado en los alrededores de Cuetzalán del Progreso, Puebla (México). Es importante recalcar que el jardín botánico Xoxoctic es más bien una reserva natural, esto quiere decir que las plantas de *Stanhopea tigrina* que fueron recolectadas y empleadas para este trabajo se desarrollaron en su ambiente natural.

Durante el proceso de muestreo, se recolectaron tres plantas de la orquídea *Stanhopea tigrina*, las cuales fueron identificadas por el Biólogo Raúl Álvarez Mora, del mencionado jardín. Estas plantas fueron colocadas en bolsas plásticas con cierre hermético, rotuladas y colocadas en hieleras para su transporte al laboratorio en donde fueron procesadas al siguiente día. Las plantas fueron procesadas en el laboratorio de ecología microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (BUAP) para el aislamiento de bacterias endófitas y epífitas de los siguientes tejidos: hoja, flor, raíz, pseudobulbo y rizósfera. Para asegurar la recuperación del mayor número de cepas, se utilizaron los siguientes medios: Medio Luria Bertani (LB), Medio Nutritivo (NUT) y Medio mínimo enriquecido con sales y vitaminas (MM). A partir del muestreo inicial, se recuperaron diversos aislados bacterianos epífitas y endófitas las cuales se han purificado gradualmente.

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Stanhopea trigrina* es una de las especies endémicas más espectaculares de México. La deforestación, la fragmentación de su hábitat y la excesiva colecta en Puebla y Veracruz colocan a *S. tigrina* en estado de amenaza, lo que indica que esta especie se encuentra en peligro de desaparecer a corto o mediano plazo.

En la actualidad se conoce que la microbiota asociada tiene un gran impacto sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de diversos mecanismos incluyendo la producción de fitohormonas, por lo que uno de los posibles métodos para la conservación y adaptación de orquídeas amenazadas puede venir de la asociación con bacterias que presenten efectos benéficos sobre la planta.

A la fecha la relación orquídea-bacteria ha sido poco estudiada y se desconoce la microbiota bacteriana presente en *S. tigrina*. Con este estudio se pretenden identificar bacterias presentes en *S. tigrina* con efecto promotor de crecimiento vegetal que pudieran ser empleadas en el futuro para la conservación de esta y otras especies.



## 4. OBJETIVO GENERAL

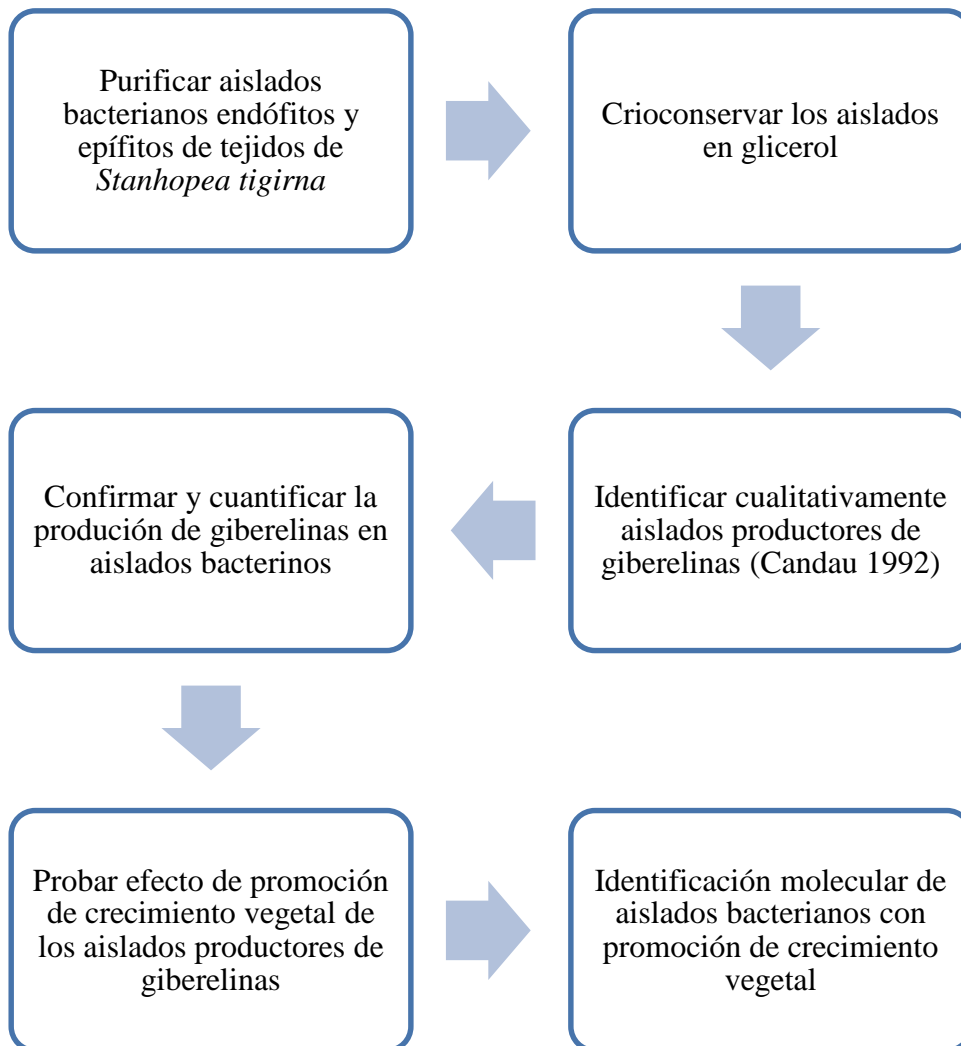
Identificar bacterias productoras de giberelinas presentes en plantas de *Stanhopea tigrina* del jardín botánico Xoxoctic (Cuetzalan, Puebla) con efecto promotor de crecimiento vegetal.

### 4.1 Objetivos particulares

- I. Obtener aislados bacterianos puros de origen epífita y endófito a partir de diferentes tejidos de *Stanhopea tigrina*.
- II. Evaluar de manera cualitativa y cuantitativa la producción de giberelinas para los aislados bacterianos obtenidos.
- III. Probar el efecto promotor de crecimiento vegetal para los aislados bacterianos con mayor producción de giberelinas.
- IV. Realizar la identificación molecular de los aislados bacterianos productores de giberelinas con efecto promotor de crecimiento vegetal.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Diagrama general de trabajo



## 5.2 Aislamiento de cepas bacterianas

Para este estudio se recolectaron 3 plantas de *Stanhopea tigrina*, a partir de las cuales se obtuvieron primoaislamientos en diferentes medios de cultivo. Para cada procedimiento y bajo condiciones de esterilidad se realizaron diluciones seriadas 1:10 colocando 100 µl de la solución de lavado en un tubo eppendorff con 900 µl de solución salina isotónica (SSI) estéril. Se tomaron 100µl de cada una de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  para sembrarse en los medios: Luria Bertani (LB), medio mínimo enriquecido con sales y vitaminas (MM) y medio nutritivo (NUT). Ver anexo 1. A partir de este aislamiento se comenzó la purificación de los aislados, en base a las diferencias morfológicas observadas.

Una vez purificadas las cepas, se identificaron de la siguiente forma:

- Número de planta
- Tejido : bulbo (B), flor (F), rizósfera (R), Hoja (H), suelo (S), Rizoma (T)
- Localización: epífita (x) o endófito (y)
- Dilución: Directo (dir),  $10^2$  (-2),  $10^3$  (-3),  $10^4$  (-4)
- Medio de aislamiento: Medio Luria Bertani (LB), Medio Nutritivo (NUT) y Medio mínimo enriquecido con sales y vitaminas (MM)
- Número de colonia

Por ejemplo: La cepa 3Fx-4-MM(1), es la cepa epífita número 1 aislada de flor de la planta número 3, obtenida del medio MM dilución  $10^4$ .

A continuación se describe el procedimiento empleado para el aislamiento a partir de cada tejido.

### 5.2.1 Aislamiento de bacterias epífitas

Se pesaron 2 gramos de cada tejido de las 3 plantas: pseudobulbo, hoja, raíz y flor. Cada muestra se lavó individualmente en 100 ml de solución salina isotónica estéril (SSI) y se agitó manualmente durante 3 minutos. Concluido el tiempo de lavado se realizaron diluciones seriadas, colocando 100 µl de la solución de lavado en un tubo eppendorf conteniendo 900 µl de agua destilada estéril. Se tomaron 100µl de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  y se colocaron en placas con medio LB, MM y NUT. Estas placas se incubaron a 37 °C.

## 5.2.2 Aislamiento de bacterias endófitas

Utilizando las muestras anteriores y bajo las mismas condiciones de esterilidad se realizó un lavado superficial con agua destilada estéril, seguido por un lavado con alcohol al 70% y después con una solución de hipoclorito de sodio al 1%, cada lavado se realizó por dos minutos y en agitación manual. Por último dos lavados en agua destilada estéril con agitación manual por un minuto para retirar el exceso de desinfectante. Al terminar los lavados, las muestras ya desinfectadas se cortaron en pequeños fragmentos y maceraron en un mortero con pistilo estéril. El extracto obtenido del macerado se pasó a un frasco estéril y se empleó para realizar las diluciones seriadas colocando 100  $\mu\text{l}$  del extracto en un tubo eppendorf conteniendo 900  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril. Una vez que se realizaron las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de cada solución y se colocaron en placas con medio LB, MM y NUT. Las placas se incubaron a 37 °C hasta la aparición de colonias.

## 5.2.3 Aislamiento de bacterias rizosféricas

Para el caso de la rizósfera, se tomó 1g de muestra y se colocó en 100 mL de SSI y mezcló para proceder a la obtención de las diluciones seriadas colocando 100  $\mu\text{l}$  de la mezcla en un tubo eppendorf conteniendo 900  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril. Una vez que se realizaron las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de cada solución y se colocaron en placas con medio LB, MM y NUT, incubándose a 37 °C hasta la aparición de colonias.

## 5.3 Conservación de cepas

Los aislados purificados se hicieron crecer en 5 mL de su correspondiente medio líquido (LB, NUT y MM) contenidos en tubos falcon de 15 mL. Se incubaron de 24 a 48 horas a 30°C en agitación a 180 rpm. Después se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 10 minutos y el botón se resuspendió en 1 mL de medio líquido correspondiente a 50% de glicerol y se transfirió un criovial, correctamente etiquetado, para su conservación a -80°C.

## 5.4 Identificación de cepas productoras de giberelinas

### 5.4.1 Técnica de Candau

Las aislados purificados se inocularon en 5 mL de medio Czapek y se incubaron a 30° C en agitación continua a 180 rpm. Transcurridas 72 hrs se tomó una alícuota de 0.2 mL del medio y se mezcló con 0.2 mL de etanol (96% v/v) para después adicionar 2 mL de mezcla fría de volúmenes iguales de ácido sulfúrico y etanol al 96%. La mezcla se incubó a 48 °C por 30 minutos. Las muestras se revelan con luz UV y se tomó como ensayo positivo (producción de giberelinas) aquellas que presentaron una fluorescencia verde.

### 5.4.2 Obtención de la fase orgánica para la determinación de GAs

La presencia de GAs se identificó en el sobrenadante del cultivo bacteriano libre de células. Para obtenerlo, se partió de un pre-inóculo de 10 mL con el aislado en medio líquido Czapek, el cual se incubó durante 24 hrs a 30 °C con agitación continua a 180 rpm. Posteriormente se tomaron 500ul de este cultivo para inocular 100 mL de medio Czapek líquido, el cual se incubó durante 72 hrs a 30 °C con agitación a 180 rpm. Al final de la incubación, se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 10 minutos y por decantación se separó el paquete celular del sobrenadante. Finalmente se ajustó el pH del sobrenadante a un valor de 2.5-3.0 empleando una solución de HCl al 0.1 N.

A partir del sobrenadante equilibrado, se realizó una extracción de la fase orgánica empleando un volumen de Acetato de etilo. La extracción se repitió tres veces y posteriormente se eliminó el disolvente con sulfato de sodio y evaporación al vacío a baja presión. Esta fase orgánica se empleó para los ensayos subsecuentes de cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución.

### 5.4.3 Cromatografía en capa fina (TLC)

La fase orgánica se disolvió en metanol grado HPLC y con ayuda de un capilar se aplicó en una placa de sílica gel de 4x5 cm (fase estacionaria) y se corrió en un sistema Cloroformo:Acetato de etilo:Ác. Acético en una relación 5:4:1 (fase móvil). Se empleó como revelador una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% en etanol y después calentó suavemente hasta evaporar el disolvente. Finalmente se reveló la placa con luz UV de longitud larga.

### 5.4.4 Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a UV (HPLC-UV)

Los ensayos se realizaron empleando el equipo de la marca Hewlett Packard HPLC instrument (series 1100); como fase estacionaria se ocupó una columna de acero inoxidable XDB-C18 (150 × 4.6 mm de diámetro interno) y como fase móvil una solución de acetonitrilo y agua ácida (0.01% de ácido fosfórico) en relación 70:30, con una velocidad de flujo: 0.6 mL/min. Para el ensayo se inyectó una alícuota de 1 µL tanto de la muestra (disolver en metanol grado HPLC) como de los estándares. Se emplearon estándares de GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub> (Sigma-aldrich) a una concentración de 1mg/mL disueltos en metanol grado HPLC. Se realizaron las lecturas a dos diferentes longitudes de onda: 206 nm y 254 nm.

## 5.5 Ensayos de germinación

### 5.5.1 Esterilización de Semillas

Para este ensayo se seleccionaron las semillas que mostraron el ápice íntegro y se lavaron dos veces con agua destilada estéril, después se sumergieron 10 minutos en etanol al 70% agitándolas suave y constantemente, cuidando la integridad de ápice.

Una vez desinfectadas, se retiraron las semillas del etanol para sumergirlas en solución de hipoclorito de sodio comercial 1:3 durante 10 minutos. Después, las semillas se lavaron con agua destilada aproximadamente 20 veces hasta que el olor a cloro fuera imperceptible. Una vez esterilizadas las semillas, se transfirieron a una caja de Petri con medio agar-agua (12 g de agar bacteriológico por 1000 mL de agua) y se incubaron de 2 a 3 días a 30 °C en oscuridad hasta su germinación.

### 5.5.2 Preparación del inóculo

Los aislados bacteriados seleccionados se sembraron en 50 mL de medio de cultivo empleando matraces Erlen-Meyer de 250 mL estériles con tapón de algodón y se incubaron a 30 °C durante 24-48 horas. Se ajustó la densidad óptica (DO) a 620 nm en un rango de 1.5 a 2.0. Una vez realizado el ajuste, se tomaron 100 µL del cultivo y se inocularon a través de la radícula y coleoptilo de la plántula de maíz.

### 5.5.3 Drop Plate

Se utilizó el inóculo anterior (Ver apartado 5.5.2) y se hicieron diluciones seriadas con agua destilada estéril hasta obtener una dilución  $10^{-8}$ . En una placa Petri con medio nutritivo se hicieron 6 divisiones de igual tamaño, en cada una de las cuales se colocaron tres gotas de 20 µL (ensayo por triplicado) de la dilución  $10^{-3}$  a la dilución  $10^{-8}$ , se incubaron las placas por 48 horas a 30 °C y después de la incubación se contaron las UFC por gota, corrigiendo por el factor de dilución.

### 5.5.4 Siembra e inoculación de la plántula

Se seleccionaron las plántulas con un coleoptilo y radícula de tamaño similar para ser transplantadas en vermiculita estéril soportados en vasos de poliestireno de 10 onzas y se inocularon 100 µL de cultivo, los cuales se depositaron a través del coleoptilo y radícula, como se mencionó en la preparación del inóculo. Para mantener semi-asilado el sistema se cubrió con graba estéril. Las plantas fueron regadas con agua estéril a saturación hasta el surgimiento del coleoptilo sobre la graba, después se regaron con solución Hoagland 0.1x hasta saturación cada 3 días.

### 5.5.5 Promoción de crecimiento vegetal

El experimento se realizó en dos condiciones diferentes: cámara de crecimiento e invernadero. Las plantas se monitorearon hasta el estadio vegetativo V4, el experimento se realizó del 11 de agosto del 2017 al 1 de septiembre del 2017. Durante este tiempo se regaron cada tercer día a fin de mantener la humedad del sustrato y para el experimento en invernadero y cámara de crecimiento se midieron valores de temperatura, humedad relativa e iluminación. Después de este tiempo se sacrifican las plantas y se evaluaron los siguientes parámetros: longitud del tallo, longitud de la raíz, peso fresco del tallo y de la raíz, peso seco del tallo y de la raíz. Para realizar las mediciones, se separó la parte aérea de la raíz; cada porción se midió y se pesó para obtener los valores de longitud y peso fresco, los tejidos se guardaron en bolsas de papel para ser secadas durante 48 hrs a 40°C, y finalmente se volvieron a pesar los tejidos para obtener los valores de peso seco. Los valores obtenidos se analizaron por ANOVA de una variable utilizando el programa GraphPad Prism 7.03 con un valor de  $\alpha=0.05$ .

## 5.6 Identificación molecular

Para la identificación molecular se completaron las siguientes etapas: se realizó la extracción de ADN genómico de los aislados correspondientes, se verificó la integridad del ADN mediante electroforesis, se amplificó mediante PCR la región que codifica para el ARNr 16s (*rrs*), posteriormente se secuenciaron los fragmentos amplificados y finalmente se analizaron las secuencias obtenidas. A continuación se presenta el detalle metodológico para cada una de estas etapas.

### 5.6.1 Extracción de ADN genómico

Se sembró el aislado bacteriano en 5 mL de medio LB a 30°C, con agitación a 180 rpm por 24 hrs. El cultivo se centrifugó 5 min a 5 000 rpm, se decantó el líquido y se recuperó la pastilla celular, la cual se mezcló con 600  $\mu$ L de Buffer de extracción CTAB 2X (Tris-HCl 100 mM pH8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM pH 8, CTAB 2% y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.3%) y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL incubándose a 65 °C durante 40 minutos. Transcurrido este tiempo, la mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL y se adicionó 1 volumen de la solución Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclando por inversión varias veces. La mezcla resultante se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min y nuevamente el sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorf limpio y se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol frío y se dejó precipitar a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min y se eliminó

el sobrenadante por decantación. Finalmente la pastilla de ADN se lavó con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%, se centrifugó el tubo a 10000 rpm durante 5 minutos y se dejó secar la muestra para finalmente rehidratarla con 20-50  $\mu\text{L}$  de agua estéril.

### 5.6.2 Electroforesis de ADN

Para verificar la integridad del ADN extraído, así como para verificar la amplificación por PCR, se usaron geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE (40 mM de Tris-acetato pH8 y 1mM de EDTA) en presencia bromuro de etídio (1  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ). Las muestras de ADN, mezcladas con el tampón de carga, se depositaron en los pocillos de los geles solidificados y se migraron a 100 V. Como referencia se utilizó un marcador con peso molecular comercial de 1kb (New England BioLabs). Finalmente el ADN se visualizó en un transluminador de luz ultravioleta.

### 5.6.3 Amplificación de 16S rDNA

Se utilizó una secuencia de oligonucleótidos:

16SrDNAF 5'-TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

16SrDNAR 5'-CAGGGCGGTGTGTACA-3'

Correspondientes al gen 16S rDNA. La amplificación se realizó en un volumen de 25  $\mu\text{L}$  que contenía 2  $\mu\text{L}$  del ADN, 2.5  $\mu\text{L}$  de Buffer con  $\text{MgCl}_2$  (10 mM), 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM), 1  $\mu\text{L}$  de oligo y 0.125  $\mu\text{L}$  Taq ADN polimerasa (1U). Las reacciones se realizaron de acuerdo al siguiente programa de amplificación: una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos de los siguientes eventos: desnaturalización a 95 °C por 45 segundos, alinamiento a 52 °C por 45 segundos, extensión a 72 °C por 2 minutos. La amplificación se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa, como se indica en el apartado anterior (5.6.2).

### 5.6.4 Reacción se secuenciación y análisis de las secuencias

Los productos de PCR se purificaron con el kit High Pure PCR Cleanup Micro y se enviaron al Instituto de Biotecnología de la UNAM para ello se mezcló de 100 a 120 ng de DNA con 1  $\mu\text{L}$  de solución 10 pmol/ $\mu\text{L}$  del oligo 16SrDNAF en un volumen final de 16  $\mu\text{L}$ . Una vez obtenidas las secuencias, se realizará una comparación y alineamiento de éstas empleando los programas BioEdit y BLAST.



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Aislamiento de cepas bacterianas endófitas y epífitas

El 23 de Agosto del 2013 el grupo de investigación del laboratorio de Ecología Molecular Microbiana recolectó 3 plantas y una flor de *Stanhopea tigrina* del jardín botánico Xoxoctic ubicado en el municipio de Cuetzalan de progreso, Puebla (20°1'6.33"N y 97°31'21.082"O). Las plantas de *S. tigrina* localizadas dentro del jardín se identificaron con la ayuda del Biól. Raúl Álvarez Mora. Las plantas 1 y 2 se recolectaron de un hábito epífito mientras que la planta 3 se obtuvo de un hábito litófito y la flor se recolectó de una planta epífita independiente a las tres primeras (Fig. 11).



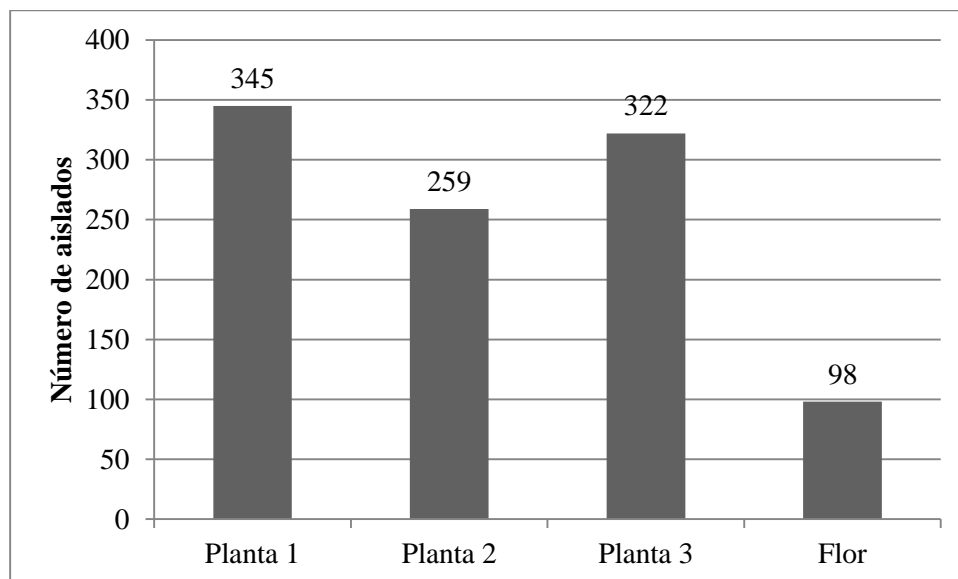
**Figura 11. Identificación de plantas de *Stanhopea tigrina*.** Fotografías de la recolección de plantas de *Stanhopea tigrina* para el aislamiento de su microbioma. Las muestras fueron recolectadas en el jardín botánico Xoxoctic ubicado en el municipio de Cuetzalan de progreso, Puebla e identificadas por el Biól. Raúl Álvarez Mora.

Las plantas de *Stanhopea tigrina* fueron guardadas y rotuladas en bolsas plásticas con cierres herméticos y se colocaron en hieleras para su transporte al laboratorio de ecología molecular microbiana (CICM-BUAP), en donde se procesaron al día siguiente de su recolección.

Para el aislamiento bacteriano se siguió la metodología descrita en el apartado 5.2 (Material y métodos), los tejidos procesados fueron: pseudobulbo, hoja, raíz, flor y también se aislaron bacterias de la rizósfera. Con el propósito de obtener el mayor número de aislados bacterianos de las muestras se utilizaron tres diferentes medios de cultivo: Medio Luria-Bertani (LB), medio nutritivo (NUT) y por último se utilizó un medio mínimo enriquecido con sales y vitaminas (MM).

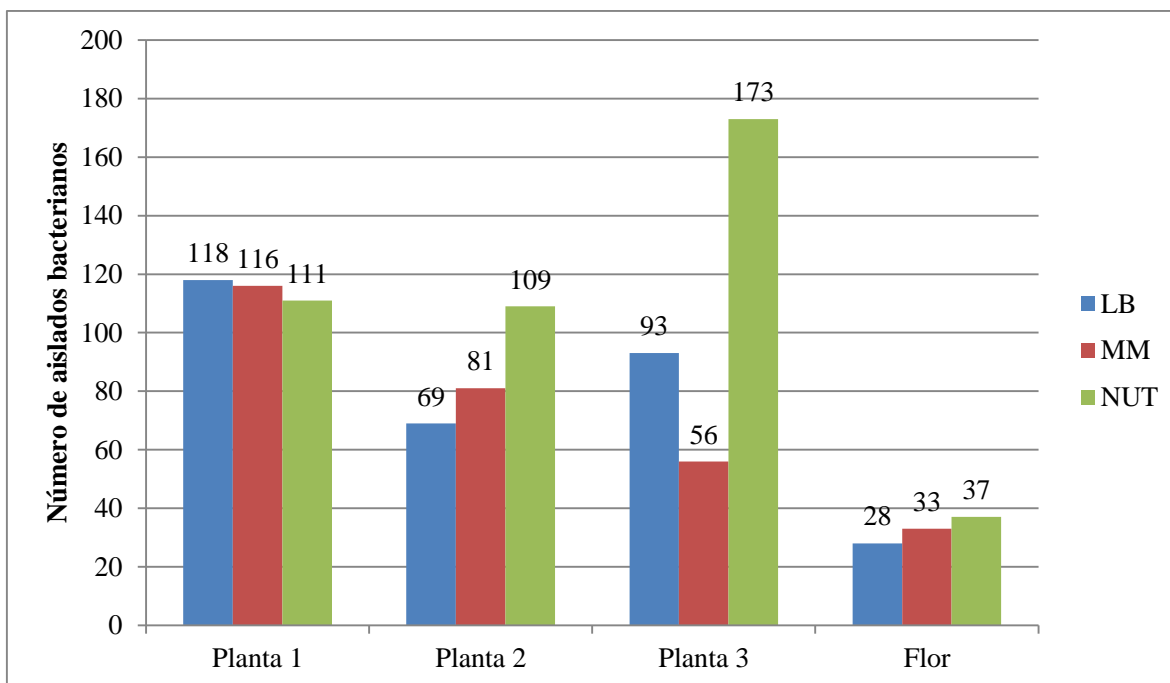
En la figura 12 se muestra el número de aislados bacterianos recuperados para cada planta, lo cual se refiere a la abundancia relativa de bacterias presentes en cada individuo. Para la planta

1 se obtuvieron 345 aislados, para la planta 2 se recuperaron 259 aislados y para la planta 3 fueron 322 aislados, mientras que 98 aislados bacterianos se recuperaron para el caso de la flor. Considerando estas cantidades, tenemos un total de 1024 aislados bacterianos obtenidos de las muestras analizadas de *S. tigrina*. Es interesante observar que el número de aislados es similar en la planta 1 y 3, a pesar de sus diferentes hábitos (una epífita y otra litófito). La flor se consideró de manera independiente.



**Figura 12. Abundancia de aislados bacterianos en *S. tigrina*.** Se muestra el número de aislados obtenidos de cada una de las tres plantas, así como para la flor muestreada.

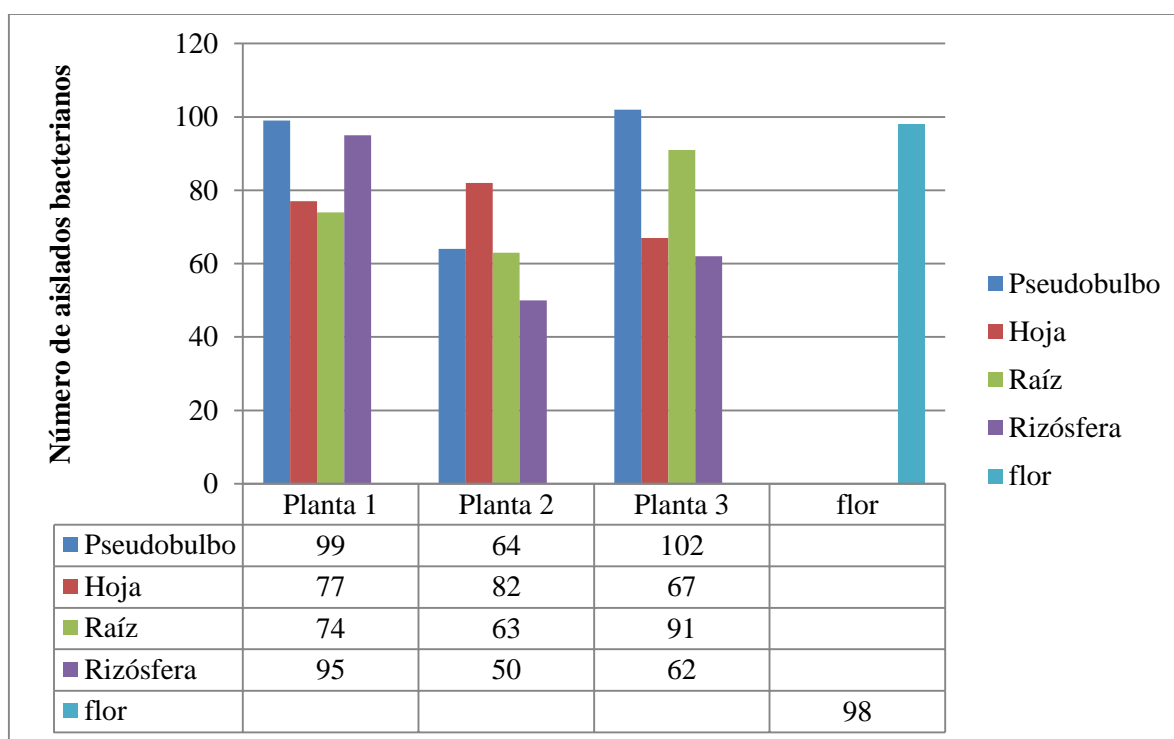
Posteriormente se hizo un análisis del número de aislados bacterianos recuperados respecto al medio de cultivo del cual fueron obtenidos (Fig. 13). Para el caso de la planta 1 se recuperó un número similar de aislados al emplear los 3 diferentes medios de cultivo, como se desglosa a continuación: 118 aislados en medio LB, 116 en el MM y 111 aislados en medio NUT. Para el caso de planta 2, el mayor número de aislados se recuperó en el medio NUT (109), seguido de 81 aislados en medio MM y 69 aislados en el medio LB. Para la planta 3 también se recuperó el mayor número de aislados al emplear el medio NUT (173), seguido en este caso de 93 aislados con el medio LB y 56 del medio MM. Finalmente, para el caso de la flor también se obtuvo un número similar de aislados para los tres medios empleados, siendo 28 aislados bacterianos al emplear el medio LB, 33 con el medio MM y 37 del medio NUT. Con estos resultados podemos indicar que no existe una preferencia aparente por algún medio de cultivo en particular. EL único comportamiento diferente se observó para la planta tres, en donde se recuperó un mayor número de aislados al emplear el medio NUT.



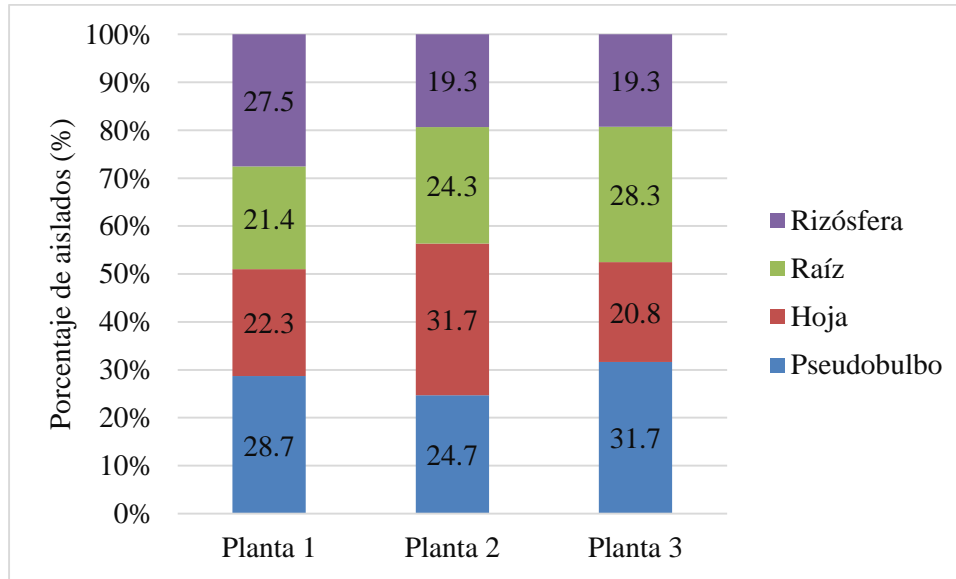
**Figura 13. Abundancia de aislados bacterianos recuperados en función del medio de cultivo utilizado.** Se muestran los resultados para las 3 plantas muestreadas, así como para la flor, indicando con barras de diferente color el conteo arrojado en los diferentes medios de cultivo.

Con el propósito de obtener una idea general de la distribución de los aislados en los diferentes tejidos, se analizó el número de aislados recuperados en las diferentes muestras analizadas y los resultados se muestran en la figura 14, en donde se puede observar que recuperamos un número de aislados variable en los diferentes tejidos, siendo el pseudobulbo el tejido con mayor riqueza de aislados para la planta 1 y 3, mientras que para la planta 2 el mayor número de aislados se encontró en la hoja. Sin embargo, para poder realizar un análisis comparativo de la distribución de los aislados bacterianos entre los diferentes tejidos por planta se realizó una relación porcentual y los resultados graficados se muestran en la figura 15. Empleando este análisis se puede observar que del 100 % de los aislados recuperados de la planta 1, el 28.7 % provenían de pseudobulbo, 26.5% de rizósfera, 22.3% de hoja y 21.4 % de raíz correspondientes a la planta 1. En la planta 2 se observa que el 31.7% de los aislados se recuperaron de la hoja, 24.7% de pseudobulbo, 24.3% de la raíz y un 19.3% de rizosfera. En el caso de la planta 3, el 31.7% de los aislados se recuperó de pseudobulbo, el 28.3 de raíz, el 20.8% de hoja y el 19.3 de la rizósfera. Esta valoración nos indicó que existe una distribución relativamente homogénea de la población bacteriana en los diferentes tejidos de la planta analizada.

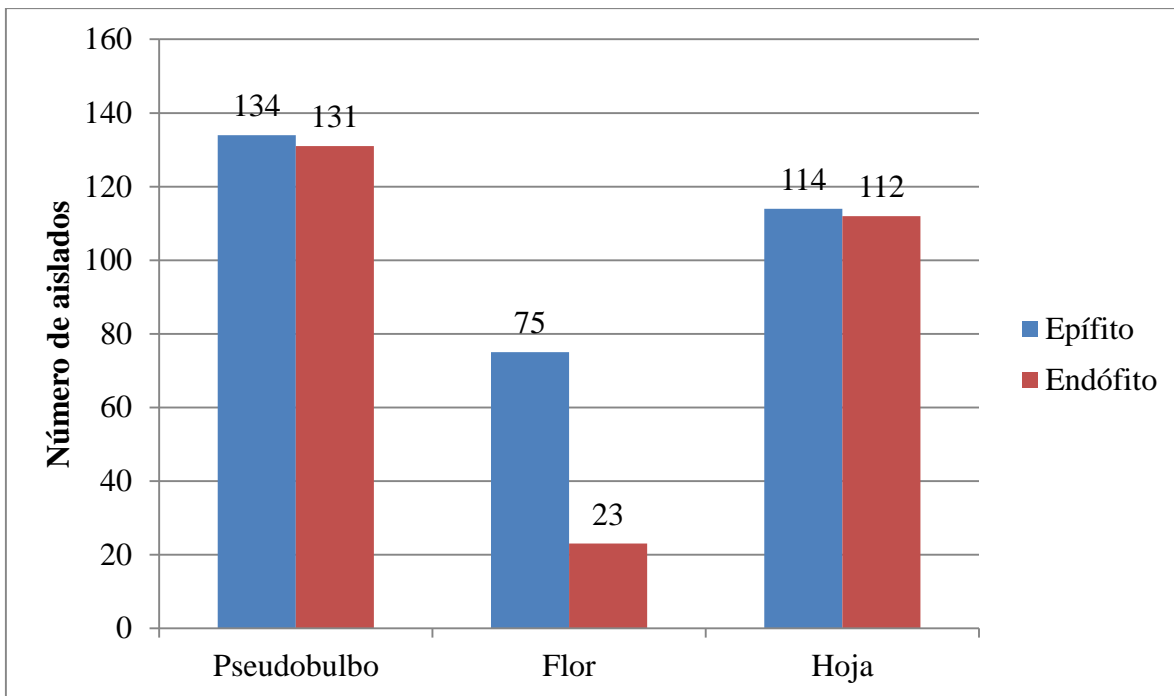
Además de analizar la distribución de los aislados bacterianos en los diferentes tejidos, se determinó también su distribución de acuerdo a su origen en la planta; es decir, establecimos el número de aislados bacterianos considerados como epífitos (aquellos que viven sobre la superficie de la planta) o como endófitos (aquellos recuperados después de una desinfección superficial). En la figura 16 se muestra el número de aislados que se encontraban como epífitos o como endófitos en los diferentes tejidos de las plantas estudiadas. De esta manera, se obtuvieron 134 aislados epífitos y 131 endófitos del pseudobulbo, 75 epífitos y 23 endófitos de la flor, así como 114 epífitos y 112 endófitos de la hoja. Nuevamente, se puede observar que existe un número similar de aislados epífitos y endófitos en pseudobulbo y en la hoja. Por otro lado, en la flor se encontró el triple de organismos epífitos en comparación con el número de endófitos aislados.



**Figura 14. Distribución de aislados bacterianos en los diferentes tejidos de *S. tigrina*.** Se obtuvo un total de 1024 aislados recuperados de los diferentes tejidos de las plantas de *S. tigrina*. En la parte inferior de la gráfica se muestra el conteo de los aislados recuperados para cada tejido de origen y de lado derecho se muestra el color para cada uno de ellos.



**Figura 15. Relación porcentual de los aislados bacterianos presentes en cada planta de *S. tigrina*.** Se indica también la distribución porcentual para los diferentes tejidos muestreados.



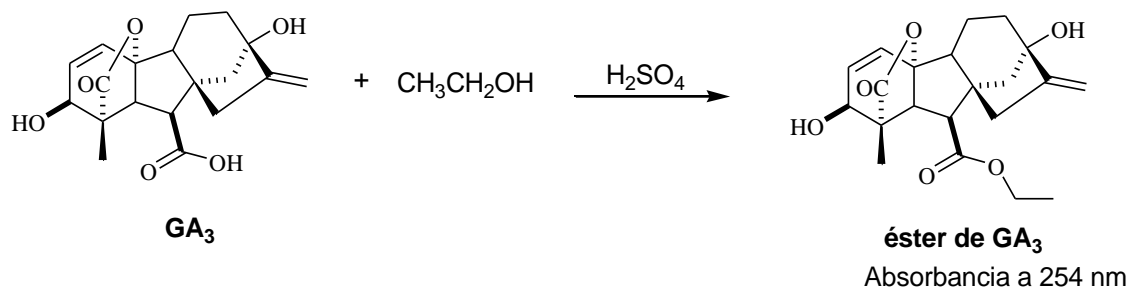
**Figura 16. Abundancia de aislados epífitos y endófitos en los diferentes tejidos de *S. tigrina*.** Se muestra en colores diferentes los aislados epífitos y endófitos para los diferentes tejidos y el total de aislados se incluye para cada barra.

## 6.2 Identificación de aislados productores de giberelinas

### 6.2.1 Método de Candau

El número total de aislados bacterianos que se obtuvo fue de 1024, por lo que para evaluar si éstos eran capaces de producir giberelinas se empleó un método de tamizaje que nos ayudó a identificar de manera cualitativa aquellos aislados que tuvieran la capacidad de producir giberelinas. En este sentido se empleó el protocolo descrito por Candau en 1992, el cual se diseñó originalmente para identificar la producción por hongos de estos metabolitos, por lo que fue necesario modificar algunos aspectos de la técnica para que pudiera ser aplicada a bacterias.

El método original consiste en permitir el crecimiento del microorganismo en el medio ICI, el cual contiene 8% Glucosa y 0.48%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Candau *et al.*, 1992). El empleo de este medio se debe a que presenta bajos niveles de nitrógeno y esto favorece a la producción de giberelinas. Esta técnica se fundamenta en lo siguiente (Fig. 17): si existe la presencia de giberelinas se llevará a cabo una reacción de esterificación del grupo carboxilo al adicionar etanol y ácido sulfúrico y el éster formado tendrá una absorción en el rango del UV (Bhalla *et al.*, 2009).

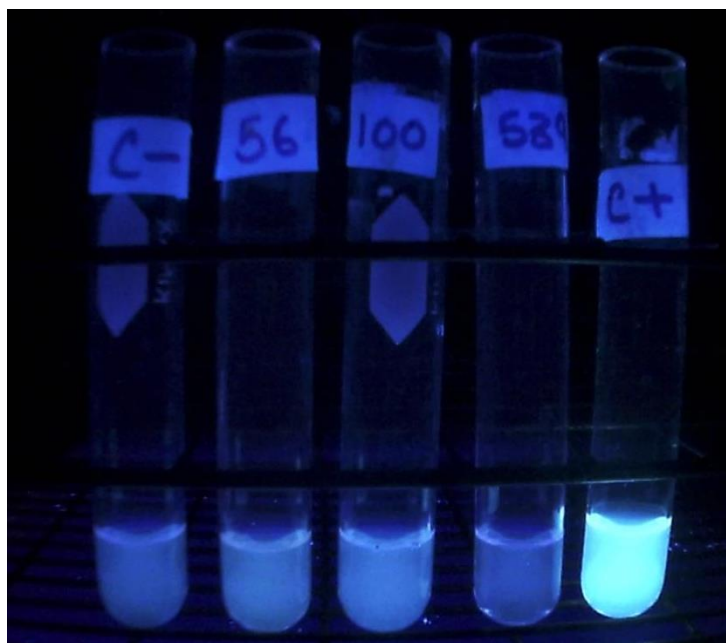


**Figura 17. Reacción de esterificación del ácido giberélico.** El éster formado tendrá una absorción en el rango C del ultravioleta, lo cual nos permitirá la identificación de estas estructuras.

Al principio del tamizaje se utilizó el medio ICI descrito en la técnica original y el tiempo de incubación fue de 72 horas a 30°C en agitación constante de 200 rpm; sin embargo, observamos que algunos aislados bacterianos no crecían en este medio. Para confirmar dicha observación, se midieron las densidades ópticas a 620 nm de algunos cultivos al azar y se comprobó que no había un aumento en el valor de OD conforme aumentaba el tiempo de incubación e inclusive observamos que estos valores disminuían pasadas las 72 horas. Considerando estos resultados, se decidió utilizar otro medio de cultivo que favoreciera la producción de giberelinas pero también el crecimiento bacteriano. Por lo que se utilizó el

medio Czapek que contiene 1% de glucosa y peptona y también ha sido reportado que este medio favorece la producción de giberelinas (Hassan *et al.*, 2002). Utilizando este nuevo medio de cultivo, observamos que nuestros aislados tenían un mejor crecimiento, lo cual se confirmó nuevamente por la medición de la densidad óptica para algunos cultivos al azar y se obtuvo un notable aumento en las densidades a comparación del medio ICI. Para asegurar el crecimiento y viabilidad de las células se inocularon 10  $\mu$ L de cada cultivo analizado en agar nutritivo.

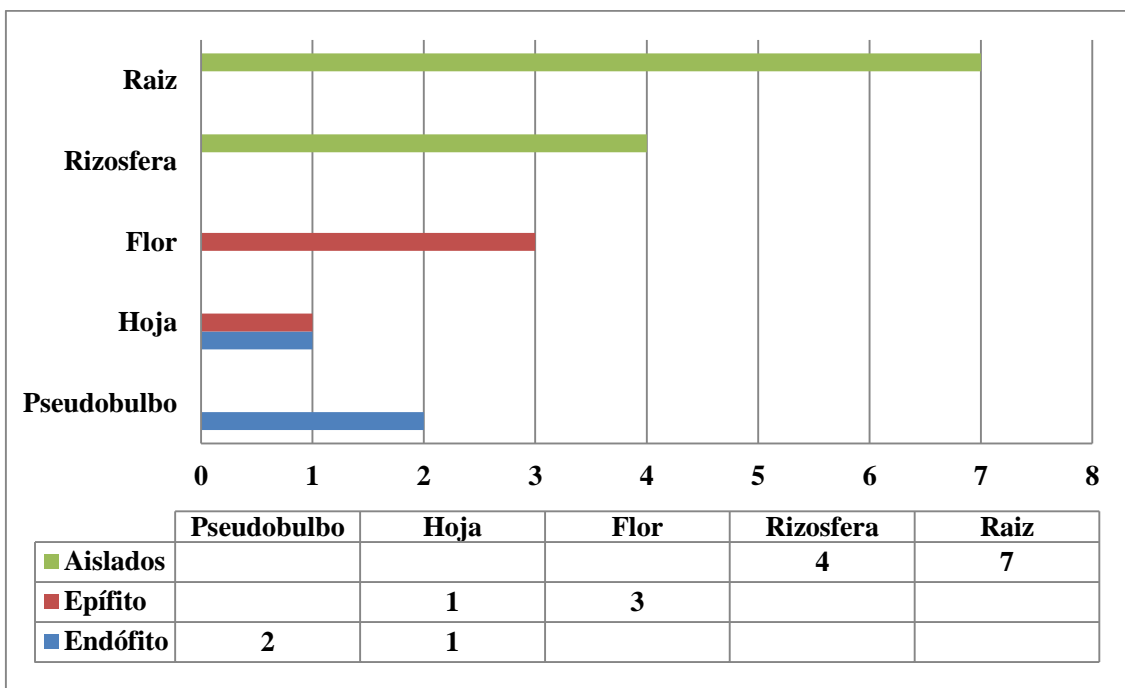
Una vez establecidas las características necesarias del medio de cultivo para la realización del método de Candau a partir de aislados bacterianos, se procedió a evaluar de manera cualitativa la producción de GAs de acuerdo a las condiciones del apartado 5.3 (Material y métodos). Para dichos ensayos se empleó el medio de cultivo sin inocular como control negativo y como control positivo se utilizó la cepa STF149 disponible en el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana correspondiente a un hongo de género *Penicillium sp.* productor de GAs. Como control positivo también se empleó una solución de 1  $\mu$ g/mL ácido giberélico ( $GA_3$ ) en etanol. Cada aislado se evaluó por duplicado y aquellas muestras positivas se confirmaron por triplicado en un experimento adicional (Fig. 18).



**Figura 18. Evaluación de la producción de GAs mediante la técnica de Candau.** Se muestra la ausencia de fluorescencia para el control negativo (extrema izquierda) y una intensa fluorescencia verde para el control positivo (extrema derecha) que corresponde al aislado fúngico productor de GAs STF149. Los aislados bacterianos 56 y 100 mostraron una fluorescencia moderada, mientras que el aislado 539 no presentó la fluorescencia característica.

Después de evaluar de manera cualitativa la producción de GAs para la totalidad de los aislados bacterianos y bajo nuestras condiciones experimentales, se obtuvieron un total de 18

aislados positivos: 7 aislados fueron recuperados de la raíz, 2 de pseudobulbo, 4 de rizósfera, 2 de hoja y 3 de flor (Fig. 19). En la tabla 4 se muestra una lista con la identidad del aislado que resultó positivo de acuerdo a la prueba cualitativa de giberelinas, además de la clave que resume las características de obtención para cada aislado. Finalmente, de acuerdo con la ubicación del aislado en la planta, encontramos que de los aislados bacterianos obtenidos como positivos a la prueba cualitativa de giberelinas 4 son de origen epífita y 3 de origen endófito (Fig. 19).



**Figura 19. Aislados bacterianos positivos a la prueba cualitativa de producción de giberelinas.**

En la parte superior se muestra la gráfica correspondiente al tejido de origen para los diferentes productores identificados mientras que en la parte inferior se indica además la ubicación del aislado.



**Tabla 4. Aislados bacterianos positivos a la prueba cualitativa de producción de giberelinas.**

Aislado	Nombre del aislado
<b>42</b>	3RX-DIR-NUT(1B)2
<b>56</b>	3RX-2-LB(5)
<b>79</b>	3RX-2-NUT(6)
<b>100</b>	3RX-3-NUT(5)
<b>101</b>	3RX-3-NUT(2)
<b>147</b>	2RX-2-LB(3B)1
<b>148</b>	2RX-2-LB(3B)2
<b>224</b>	1TY-DIR-LB(1A)2
<b>291</b>	3TY-DIR-LB(2)
<b>338</b>	1SX-DIR-MM(7A)
<b>350</b>	1SX-4-NUT(17A)
<b>354</b>	1SX-3-NUT(1)
<b>439</b>	3SX-3-MM(4)
<b>546</b>	2HY-DIR-LB(5B)
<b>565</b>	2HX-DIR-MM(3C)
<b>633</b>	1FX-3-LB(3)
<b>663</b>	1FX-DIR-LB(2B)
<b>713</b>	1FX-DIR-NUT(6B)

Una vez realizado el tamizado de los aislados bacterianos de *S. tigrina* fue necesario validar los resultados obtenidos empleando una técnica analítica más específica y sensible a la presencia de giberelinas. Inicialmente se propuso el empleo de una técnica de cromatografía sencilla, rápida y económica, que es la cromatografía en capa fina (TLC), la cual ha sido empleada para la determinación cualitativa de giberelinas (Castillo *et al.*, 2007). Sin embargo, para poder determinar de manera cuantitativa la producción de giberelinas, se decidió utilizar también la técnica de cromatografía de alta resolución (HPLC). Esta técnica se basa en la separación de diferentes componentes de una mezcla con base a sus diferentes tipos de características fisicoquímicas y consiste en pasar una alícuota de la muestra a través de la una fase estacionaria (columna cromatográfica) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. Los componentes de la muestra se retrasan diferencialmente y esto depende de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria, de tal manera que cada compuesto muestra un tiempo de retención particular. De esta manera, el tiempo de retención (RT) se define como el tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna y es característico de cada componente de la mezcla.

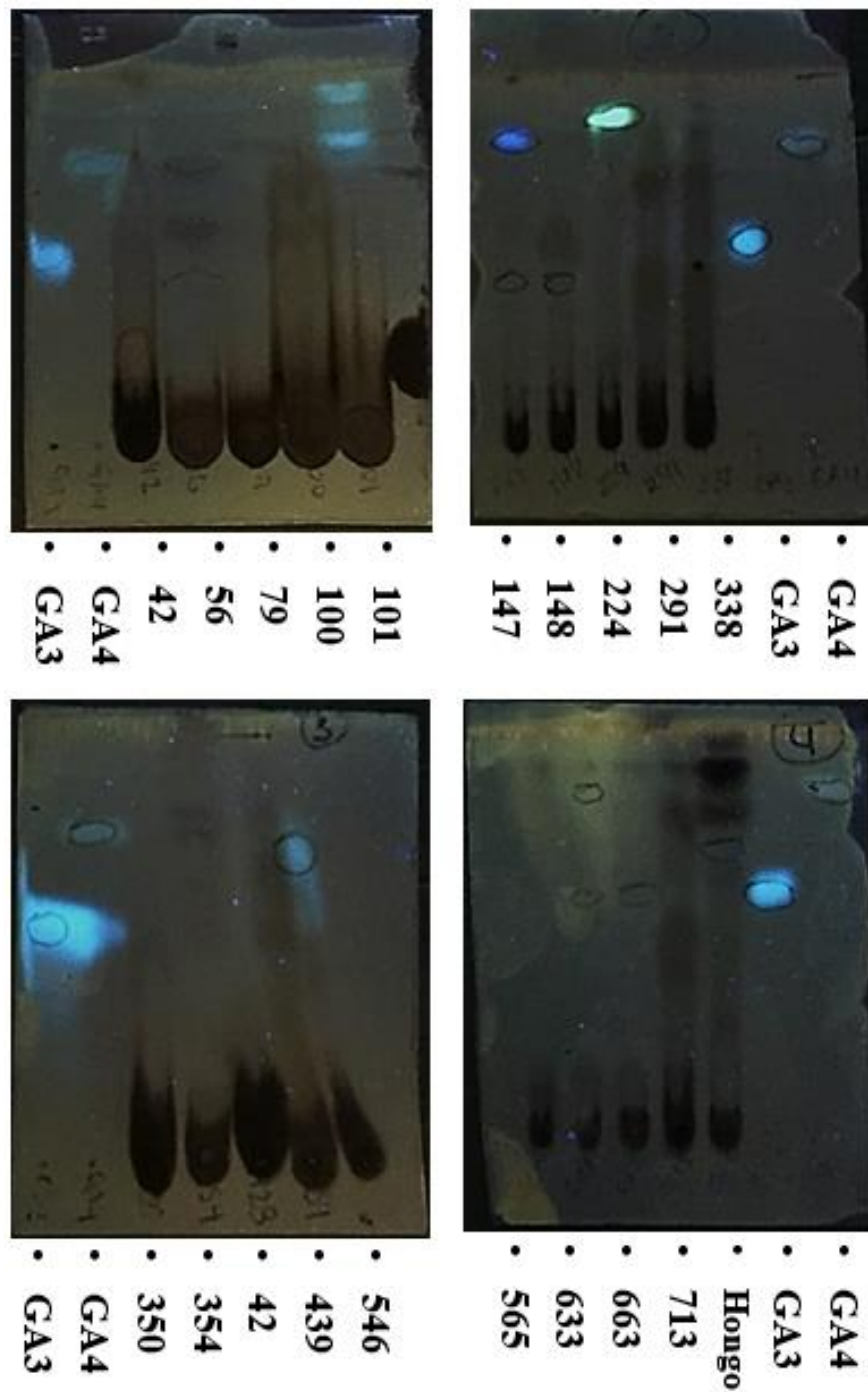
Comparando los diferentes tiempos de retención de nuestra muestra con un estándar conocido podemos determinar la presencia o ausencia de cierto compuesto en la mezcla. De igual manera, si conocemos la concentración de nuestro estándar es posible calcular la

concentración de los compuestos en nuestra muestra, de acuerdo con una fórmula que se describirá más adelante.

### 6.2.2 Cromatografía de capa fina (TLC)

Los 18 aislados considerados como productores de GAs de acuerdo a la técnica de Candau se emplearon para el análisis cromatográfico. Para realizar ambas pruebas de cromatografía se realizó en primera instancia un cultivo en medio Czapek a pH 5. A partir de este cultivo, se recuperó el sobrenadante y se realizó un tratamiento para acidificar el medio y los componentes de interés fueron extraídos con acetato de etilo (ver apartado 5.4.2 de material y métodos). Después de obtener el extracto de cada muestra se procedió a realizar las pruebas de TLC y HPLC acoplado a UV simultáneamente (ver apartados 5.4.3 y 5.4.4 de material y métodos)

En la figura 20 podemos observar las placas de sílice vistas al UV que se obtuvieron como resultado de la cromatografía en capa fina. Se emplearon como estándar GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub>, los cuales desarrollaron una fluorescencia azul y presentaron un valor de R<sub>f</sub> de 0.52 y 0.78, respectivamente. En los aislados 147, 224, 101 y 546 se observaron manchas fluorescentes que podrían corresponder a los metabolitos buscados; sin embargo, la coloración y la distancia que recorrieron a través de la fase estacionaria no coincide con la de los estándares. De acuerdo con estas observaciones iniciales no fue posible determinar de manera contundente la producción de GAs en los aislados evaluados. Por otro lado, aunque esta técnica es rápida y económica no es lo suficientemente sensible para detectar la presencia de giberelinas en determinadas concentraciones; por lo que decidimos realizar la cuantificación de giberelinas en nuestros aislados bacterianos mediante HPLC acoplada a UV.

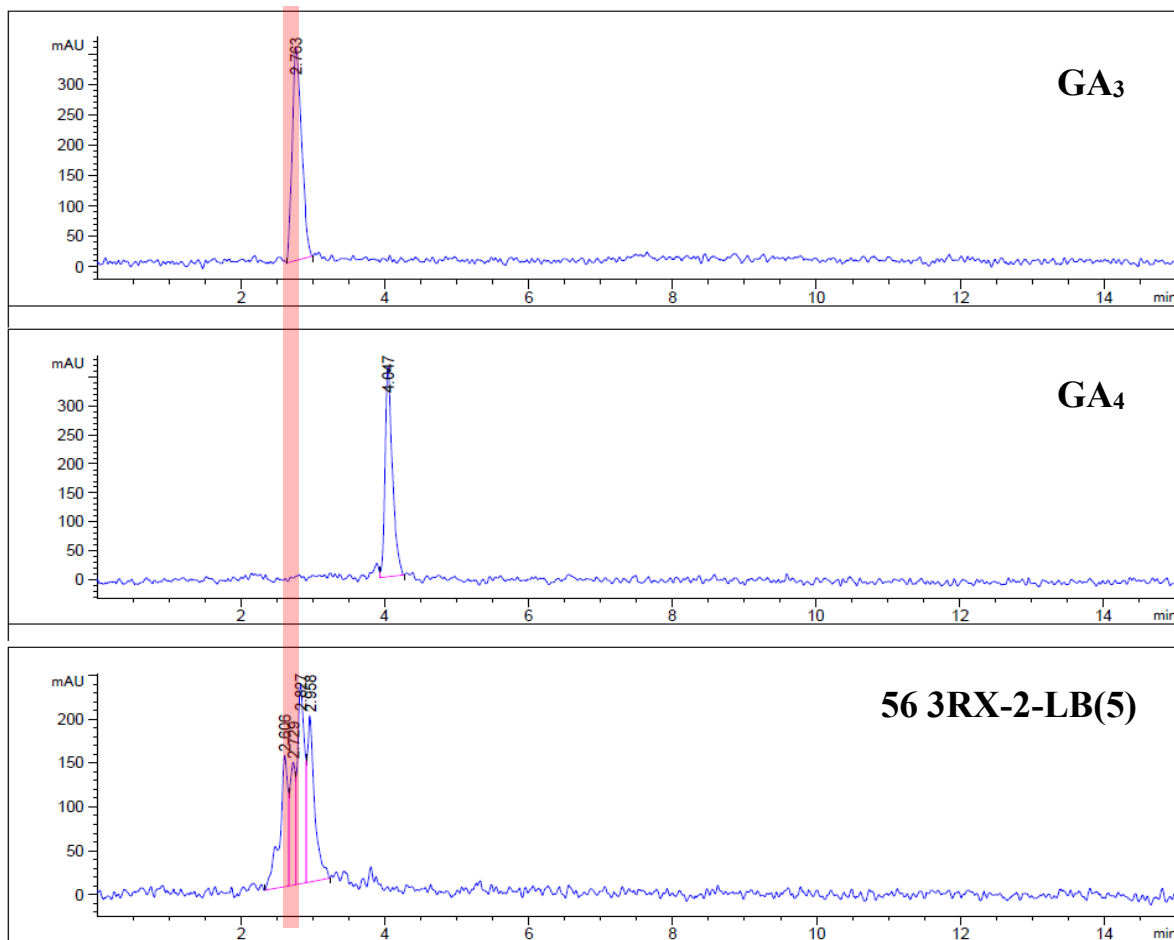


**Figura 20. Identificación de GAs mediante cromatografía en capa fina (TLC).** En la parte inferior se indica el número de aislado analizado; se usó como estándares GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub>, las cuales mostraron una fluorescencia azul característica. Se observa el desarrollo de fluorescencia por algunos de los aislados evaluados.

### 6.2.3 Cromatografía líquida de alta resolución acoplado a UV (HPLC-UV)

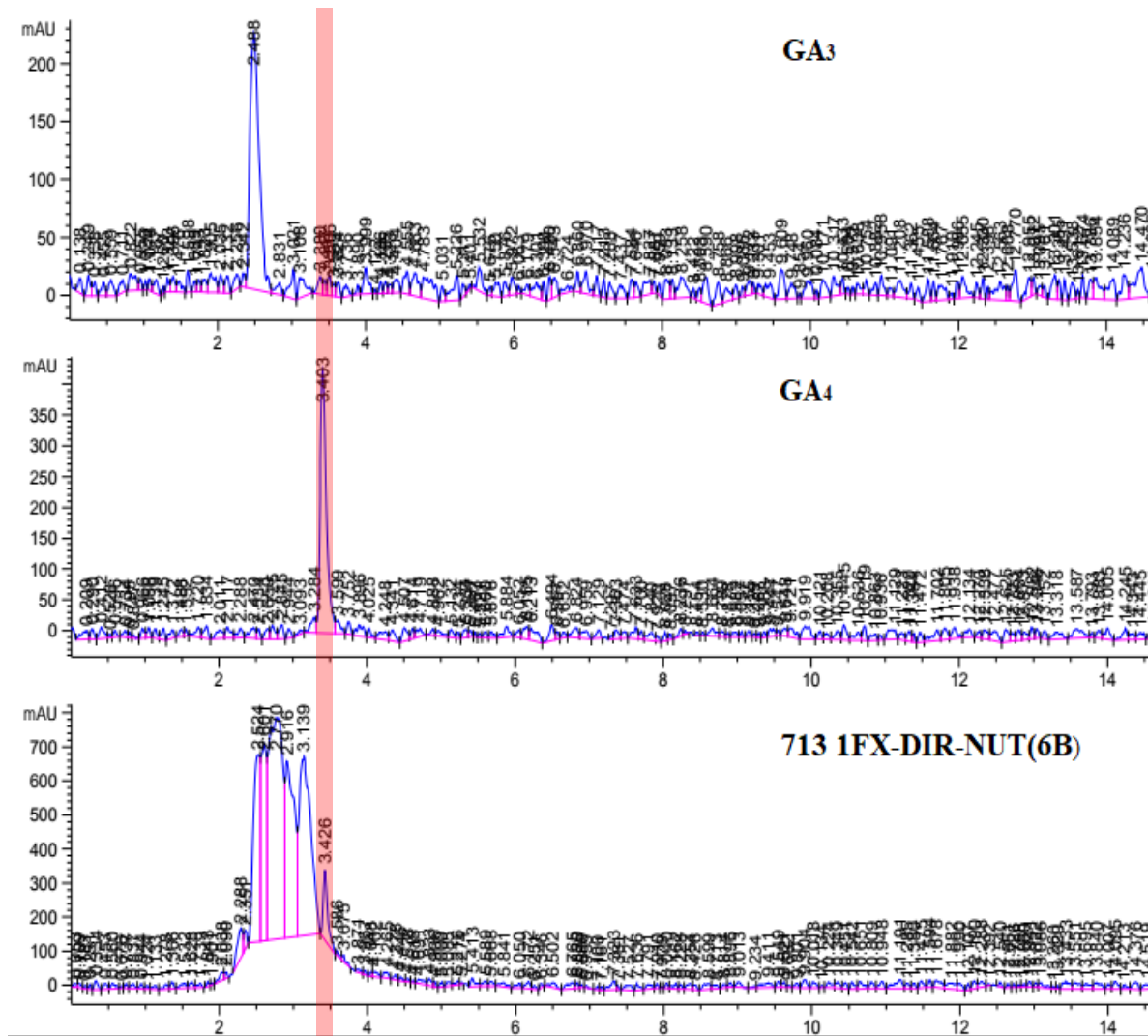
Para realizar la técnica de HPLC se utilizó el equipo Hewlett Packard HPLC instrument (series 1100), como fase estacionaria se ocupó una columna de acero inoxidable XDB-C18 (150 × 4.6 mm de diámetro interno) y como fase móvil una solución de acetonitrilo y agua ácida (0.01% de ácido fosfórico) en relación 70:30, con 3 repeticiones (a, b y c), con una velocidad de flujo: 0.6 mL/min. Para nuestros ensayos se inyectó una alícuota de 1 µL tanto de la muestra como de los estándares (GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub>) a una concentración de 1 mg/mL. Se realizaron lecturas a dos diferentes longitudes de onda: 206 nm y 254 nm. Los estándares empleados como referencia absorbían a 206 pero no a 254 nm, por lo que cualquier pico que tuviera una absorción a 254 se puede descartar ya que no se trata de GAs.

En las figuras 21 y 22 se muestran los cromatogramas para los aislados 56 y 713, así como para los estándares. Al comparar los cromatogramas para GA<sub>3</sub> y para la muestra 56, se observa en ambos casos un pico con un tiempo de retención similar (2.763 y 2.729 min respectivamente) pero no se observó ningún pico que pudiera corresponder al tiempo de retención de GA<sub>4</sub> (4.047 min), por lo que para el aislado 56 podemos confirmar la presencia solamente de ácido giberélico o GA<sub>3</sub>.



**Figura 21. Identificación de la producción de GA<sub>3</sub> en aislados bacterianos mediante HPLC.** En la parte superior se muestran los cromatogramas para las muestras de referencia correspondientes a GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub>. En la parte inferior se muestra el cromatograma obtenido para la muestra 56. La línea roja indica el tiempo de retención para GA<sub>3</sub>, el cual es similar a uno de los picos observados para la muestra 56.

Al analizar el cromatograma del aislado 713 (Fig. 22) se observa la presencia de un pico que cae en 3.426 min y es similar al tiempo de retención de nuestro estándar GA<sub>4</sub>, 3.403 min. Sin embargo, se descarta la presencia de GA<sub>3</sub> debido a que los picos que caen a una tiempo de retención similar al de GA<sub>3</sub> muestran también una absorción a 254 nm.



**Figura 22. Identificación de la producción de GA<sub>4</sub> en aislados bacterianos mediante HPLC.** En la parte superior se muestran los cromatogramas para las muestras de referencia correspondientes a GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub>. En la parte inferior se muestra el cromatograma obtenido para la muestra 713. La línea roja indica el tiempo de retención para GA<sub>4</sub>, el cual es similar a uno de los picos observados para la muestra 713. La presencia de GA<sub>3</sub> se descarta debido a que los picos cercanos al tiempo de retención para este estándar también se observaron a 254 nm.

De la misma manera como se muestra en las figuras 21 y 22, se analizaron los cromatogramas para todas las muestras evaluadas mediante HPLC, para determinar de esta manera los tiempos de retención obtenidos, así como para calcular la concentración de GAs de acuerdo a la fórmula previamente reportada por Bhalla & Singh, 2010.

$$\gamma = \alpha \times c \times v / \beta$$

Donde:

$\gamma$ = concentración de analíto

$\alpha$ = área del pico de la alícuota muestra

$c$ = concentración de la solución estándar ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

$V$ = volumen de la muestra

$\beta$ = área del pico del estándar

Con estos resultados se determinó de manera cualitativa la producción de  $\text{GA}_3$  y  $\text{GA}_4$  en los 18 aislados bacterianos evaluados. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5, en donde se enlistan cada uno de los aislados bacterianos estudiados, los tiempos de retención y la concentración calculada para cada uno de los picos correspondientes al estándar. Aquellos tiempos de retención marcados con un asterisco (\*) corresponden a ensayos en los cuales se observó el pico correspondiente al tiempo de referencia en dos de los tres ensayos realizados. Los valores marcados en rojo corresponden a las muestras para las cuales se observó que el pico tiene absorción también a una longitud de onda de 254 nm, de tal manera que no se puede asegurar que los picos observados a 206 nm para estas muestras correspondan a GAs.

Con base a los resultados resumidos en la tabla 5, se observó que al menos 8 aislados mostraron una producción de  $\text{GA}_3$  o  $\text{GA}_4$  de manera reproducible y en cantidades que van de 1.2 a 3.4  $\mu\text{g}$ , sin mostrar absorbancia de fondo a 254 nm. Estos ocho aislados validados de manera cuantitativa para la producción de GAs se seleccionaron para el ensayo de promoción vegetal y son los siguientes: 42, 56, 79, 147, 224, 291, 350 y 713.

**Tabla 5. Determinación de la producción de GAs mediante HPLC-UV para diferentes aislados bacterianos.**

Aislado	Nombre del aislado	Tiempo de retención (RT) <sup>1</sup>		Concentración de la muestra (µg)	
		GA <sub>3</sub> RT = 2.483 Límites de lectura (2.433 - 2.533)	GA <sub>4</sub> RT = 3.394 Límites de lectura (3.344 - 3.444)	GA <sub>3</sub>	GA <sub>4</sub>
42	3RX-DIR-NUT(1B)2	2.492 ± 0.008	0.000	1.64 ± 0.72	0.00
56	3RX-2-LB(5)	2.500 ± 0.010	0.000	4.05 ± 0.63	0.00
79	3RX-2-NUT(6)	2.495 ± 0.012	0.000	1.43 ± 0.24	0.00
100	3RX-3-NUT(5)	2.469 ± 0.006*	0.000	1.31 ± 0.13	0.00
101	3RX-3-NUT(2)	2.504 ± 0.003	0.000	2.25 ± 0.39	0.00
147	2RX-2-LB(3B)1	2.490 ± 0.004	0.000	1.44 ± 0.43	0.00
148	2RX-2-LB(3B)2	2.497 ± 0.007*	0.000	2.32 ± 0.19	0.00
224	1TY-DIR-LB(1A)2	2.489 ± 0.009	0.000	1.20 ± 0.32	0.00
291	3TY-DIR-LB(2)	0.000	3.427 ± 0.010	0.00	1.31 ± 0.36
338	1SX-DIR-MM(7A)	2.493 ± 0.008	0.000	1.69 ± 0.41	0.00
350	1SX-4-NUT(17A)	2.494 ± 0.009	0.000	3.36 ± 0.53	0.00
354	1SX-3-NUT(1)	2.496 ± 0.007	0.000	2.57 ± 0.40	0.00
439	3SX-3-MM(4)	2.513 ± 0.006*	0.000	1.47 ± 0.16	0.00
546	2HY-DIR-LB(5B)	2.501 ± 0.006	0.000	3.90 ± 0.73	0.00
565	2HX-DIR-MM(3C)	2.493 ± 0.016	0.000	2.48 ± 1.57	0.00
633	1FX-3-LB(3)	2.507 ± 0.024	0.000	5.82 ± 1.82	0.00
663	1FX-DIR-LB(2B)	2.512 ± 0.009	0.000	3.65 ± 1.04	0.00
713	1FX-DIR-NUT(6B)	0.000	3.428 ± 0.011	0.00	1.48 ± 0.31



## **6.3 Efecto promotor de crecimiento vegetal**

### **6.3.1 Determinación de modelo vegetal**

Debido al tiempo limitado para la realización de este proyecto, resulta imposible utilizar semillas de *Stanhopea tigrina* o de cualquier otro tipo de orquídea para ensayos en planta, ya que solo para su germinación son necesarios de 4 a 6 meses. De esta manera, para valorar el efecto promotor de crecimiento vegetal de las cepas positivas a la producción de giberelinas se determinó, en primera instancia, un modelo vegetal sobre el cual trabajar. El modelo sobre el cual se trabajó fue el maíz, que es el principal cultivo en México, cultivado en todas las entidades del país, el cual ocupa el 18% de valor de la producción del sector agrícola ocupando el 33% de la superficie sembrada en la nación (SAGARPA, 2014).

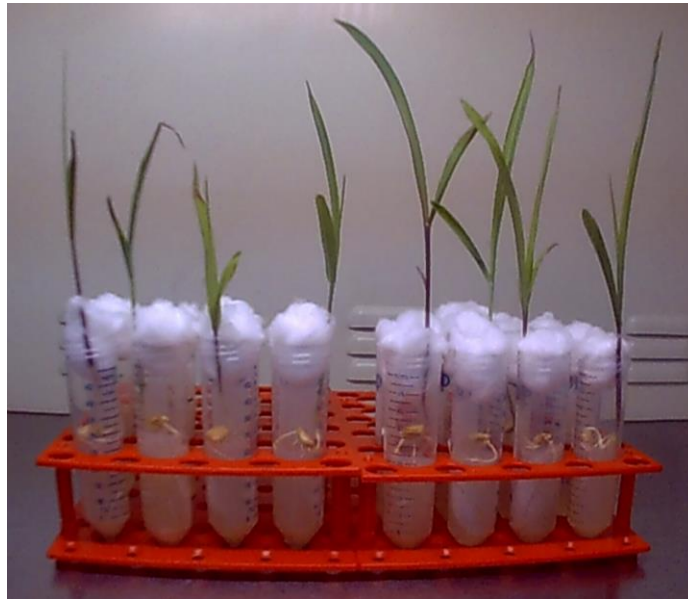
Para no descartar algunos otros posibles modelos alternativos, se realizaron ensayos de germinación con maíz, soya, sorgo y trigo. De acuerdo a la técnica descrita en el apartado de material y métodos, se realizaron ensayos de germinación con los cereales mencionados y encontramos que algunas semillas presentan un alto grado de contaminación intrínseca y se valoró además el tiempo necesario para la germinación, así como la longitud de la plántula obtenida. Considerando las observaciones resultantes, se decidió continuar trabajando con el maíz, ya que se trataba de semillas sanas, de rápida germinación y con un tamaño manejable de plántula. Posteriormente se realizaron 3 diferentes ensayos de germinación empleando las semillas de maíz. Este ensayo nos permitió verificar la salud de las semillas, así como la reproducibilidad de la manipulación y obtuvimos porcentajes de germinación del 55%, 94% y 81% en tres ensayos independientes, arrojando como porcentaje promedio de germinación un 76.6%. Con estos datos fue posible establecer el número de semillas que era necesario emplear para contar con el material biológico suficiente para los ensayos de promoción de crecimiento vegetal.

### **6.3.2. Ensayos preliminares de promoción de crecimiento vegetal**

Se realizaron dos experimentos pilotos antes de realizar el experimento de promoción de crecimiento vegetal, en el primer experimento se evaluó la concentración del inóculo en semillas de maíz criollo y en el segundo se determinaron las condiciones de riego, el tipo de semilla y la concentración del control positivo a utilizar.

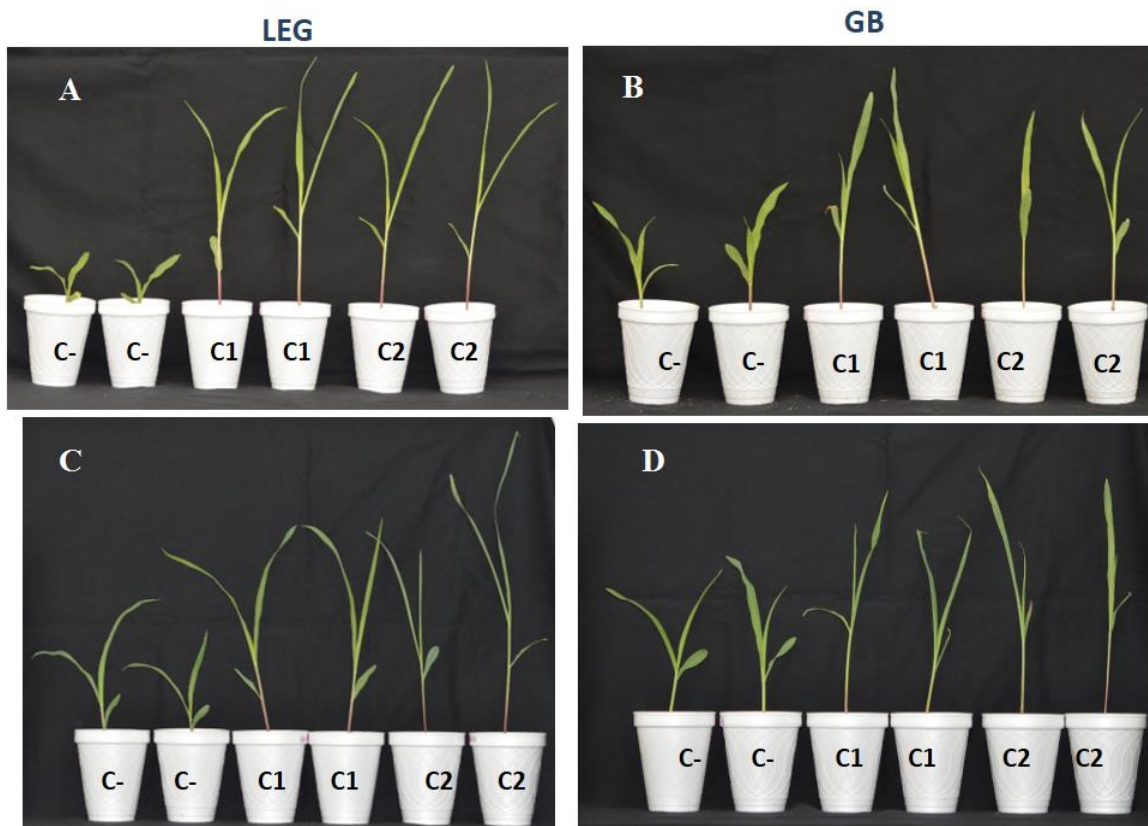
Se utilizó el aislado 56 para evaluar la promoción del crecimiento vegetal, de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado de material y métodos. De esta manera, se desinfectaron las semillas y se incubaron en oscuridad a 30°C por 3 días en medio agar-agua. Posteriormente, se seleccionaron las plántulas del mismo tamaño y éstas se traspararon a tubos falcon de 50 mL con soporte de agar-agua y medio murashige-skoog (Murashige *et al.*, 1962). La mitad de

las plántulas se inocularon con 50 $\mu$ L de un cultivo del aislado 56, el cual contenía aproximadamente  $5 \times 10^9$  UFC (Viruel *et al.*, 2014). Transcurridas dos semanas, se pudo apreciar una diferencia evidente (Fig. 23) entre las plántulas adicionadas con el inóculo bacteriano y las que se desarrollaron en ausencia de inóculo. Así, aquellas plantas de maíz que habían sido inoculadas con el aislado 56, mostraron una mayor elongación respecto a las que no fueron inoculadas.



**Figura 23. Ensayo preliminar para evaluar la promoción de crecimiento vegetal.** De izquierda a derecha: las primeras 4 plantas de maíz no fueron inoculadas, la siguientes 4 plantas de maíz fueron inoculadas con  $5 \times 10^9$  UFC del aislado 56 y se observa una mayor longitud de la parte aérea.

En el segundo experimento se usaron con dos variedades distintas de maíz, Golden Batam (GB) y Legendario (LEG). La primera variedad de maíz es de origen francés y la segunda variedad es de origen mexicano y es una cruce simple modificada. De acuerdo con el protocolo descrito en el apartado de material y métodos se desinfectaron las semillas y se incubaron en oscuridad a 30°C por 3 días en medio agar-agua, sin embargo para la primera variedad se obtuvo un porcentaje de germinación del 34% y para la variedad legendario se alcanzó un porcentaje de germinación del 90%. Las plántulas se seleccionaron y se inocularon con dos diferentes soluciones de GA<sub>3</sub> 0.2 mM y 0.4 mM y como control negativo las plántulas fueron inoculadas con agua destilada de acuerdo al protocolo descrito. Esta prueba piloto se llevó a cabo en condiciones de cámara de crecimiento e invernadero y se monitorearon los parámetros: Temperatura, humedad relativa e iluminancia. Se observó que para el caso de la cámara de crecimiento los valores varían poco y se tienen condiciones más controladas, lo que difiere de invernadero en donde los valores están sujetos a las condiciones ambientales. Sin embargo, estas últimas condiciones son las más cercanas a las que se pueden obtener en un cultivo real en campo (ver anexo 2 y 3).



**Figura 24. Prueba piloto de promoción de crecimiento vegetal en V2.** A) Maíz variedad legendario en condiciones de invernadero B) Maíz variedad Golden Batam en condiciones de invernadero C) Maíz variedad legendario en condiciones de cámara de crecimiento D) Maíz variedad Golden Batam en condiciones de cámara de crecimiento. C- (control negativo, C1 (Solución de GA<sub>3</sub> 0.2 mM) y C2 (Solución de GA<sub>3</sub> 0.4 mM).

En la figura 24 se observan las dos variedades distintas de maíz tratadas con las dos diferentes concentraciones de ácido giberélico se determino que la solución con menor concentración mostraba un efecto de elongación similar a las plantas tratadas con la solución de hormona de mayor concentración.

Con estas observaciones se determino utilizar la variedad de maíz legendario y se decidio utilizar como control positivo una solución de ácido giberélico al 0.2 mM y finalmente las condiciones para el experimento de promoción de crecimiento vegetal se llevarían a cabo tanto en cámara de crecimiento como en invernadero.

### 6.3.3. Ensayos de promoción de crecimiento vegetal

Para realizar el experimento de promoción de crecimiento vegetal se utilizó un maíz variedad legendario, que es un híbrido resultado de una cruce simple modificada adquirida a la empresa

Starseeds™. El experimento de promoción de crecimiento vegetal se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación de Biotecnología Aplicada (CIBA) del Instituto politécnico nacional. El experimento inició el 11 de Agosto del 2017, se realizó en condiciones de invernadero y cámara de crecimiento de manera simultánea.

El primer paso fue la selección y desinfección de semillas (ver apartado 5.5.1), una vez obtenidas las plántulas se seleccionaron las más homogéneas y se inocularon con los aislados a una concentración de  $10^8$  o  $10^9$  UFC. Como control negativo se inoculó el medio de crecimiento (Medio Czapek) sin inóculo y como control positivo se depositó una solución de GA<sub>3</sub> 0.2 mM. (Ver apartado 5.5.4 y 5.5.5). Durante el curso del experimento las plantas de maíz se regaron en primera instancia con agua estéril hasta el surgimiento del coleoptilo, una vez surgido se regó cada planta con una solución estéril Hoagland 0.1x cada tercer día hasta saturación, también se midieron los parámetros de temperatura, humedad e iluminancia en ambas condiciones: invernadero y cámara de crecimiento. A diferencia del invernadero, la cámara de crecimiento tiene dos lecturas: Iluminancia-D y Iluminancia-I que corresponden a las lecturas arrojadas por aquellas muestras colocadas a la derecha e izquierda de la cámara, respectivamente. Los valores promedios de estos parámetros se muestran a continuación en las tablas 6 y 7.

**Tabla 6. Valores promedio de los parámetros variables en condiciones de invernadero.**

Invernadero			
Tiempo del día	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Iluminancia (lx)
Mañana	18.7	54.3	16935
Mediodía	35.3	16.9	34100
Tarde	33.7	23.1	22150

**Tabla 7. Valores promedio de los parámetros variables en condiciones de cámara de crecimiento.**

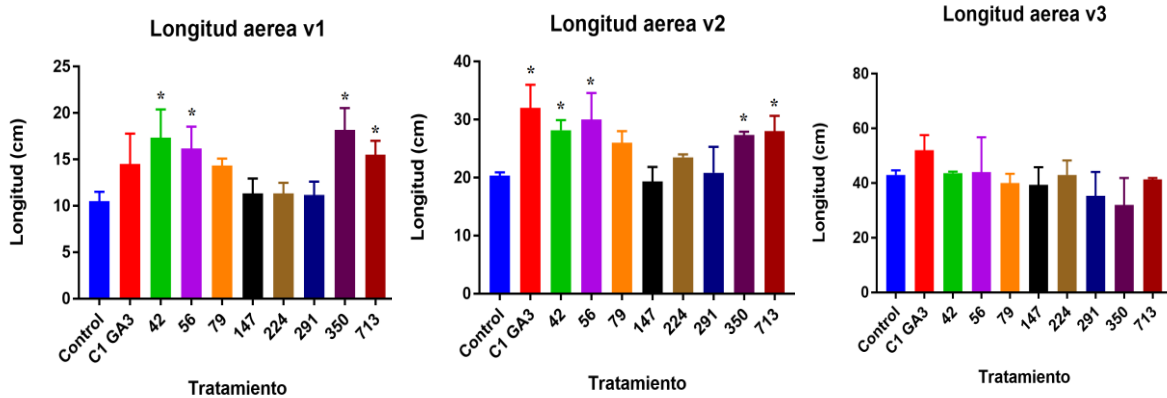
Cámara de crecimiento				
Tiempo del día	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Iluminancia-D (lx)	Iluminancia-I (lx)
Mañana	29.7	40.0	2392	2298
Mediodía	33.4	22.8	1912	2048
Tarde	34.5	18.8	2370	2210

Durante el transcurso del experimento se monitoreó el crecimiento de las plantas de maíz tanto en cámara de crecimiento como en invernadero y se seleccionaban al azar 3 plantas de cada tratamiento para medir la parte aérea (del surgimiento de la parte aérea a través del sustrato hasta la última hoja) durante cada cambio de estadio (ver anexo 4 y 5).

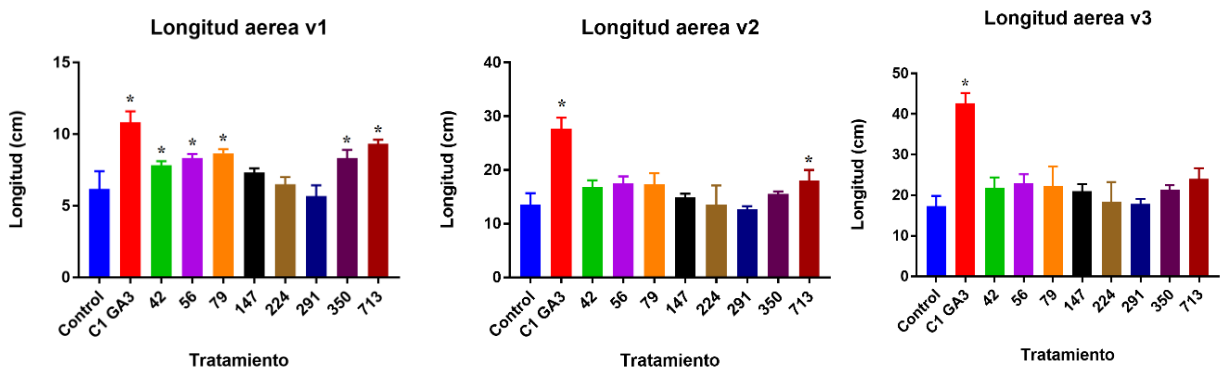
A los valores recolectados durante el monitoreo se les realizó una prueba de ANOVA de una variable utilizando el programa GraphPad Prism 7.03 y se consideró que había una diferencia significativa en los tratamientos si se obtenía un valor de  $p \leq 0.05$ . Si existía una diferencia, el siguiente paso era averiguar cuál de los tratamientos era diferente. Para esto se realizó la prueba de Dunnett, la cual nos compara las medias de las muestras contra un control, en este caso el control negativo (los valores de  $p$  obtenidos del análisis durante el crecimiento de las plantas se encuentran en los anexos 6 y 7).

En el estadio V1 se observaron diferencias significativas entre el control y algunas de las plantas inoculadas con aislados bacterianos tanto en cámara de crecimiento como en invernadero. Los tratamientos que mostraron una diferencia significativa en ambas condiciones de acuerdo a la prueba de Dunnett fueron las plantas inoculadas con los aislados 42, 56, 350 y 713 tanto en cámara de crecimiento como en invernadero, así como el aislado 79 en condiciones de invernadero. En el estadio V2 fue posible observar un efecto positivo en el crecimiento de las plantas para el control positivo en condiciones de cámara de crecimiento, así como para los aislados bacterianos señalados anteriormente. En la condición de invernadero, solo el tratamiento 713 seguía presentando una diferencia junto con el control positivo. Al llegar al estadio V3, tanto en cámara de crecimiento como en invernadero se dejaron de observar diferencias entre las plantas tratadas con los inóculos en comparación al control negativo (figuras 25 y 26).

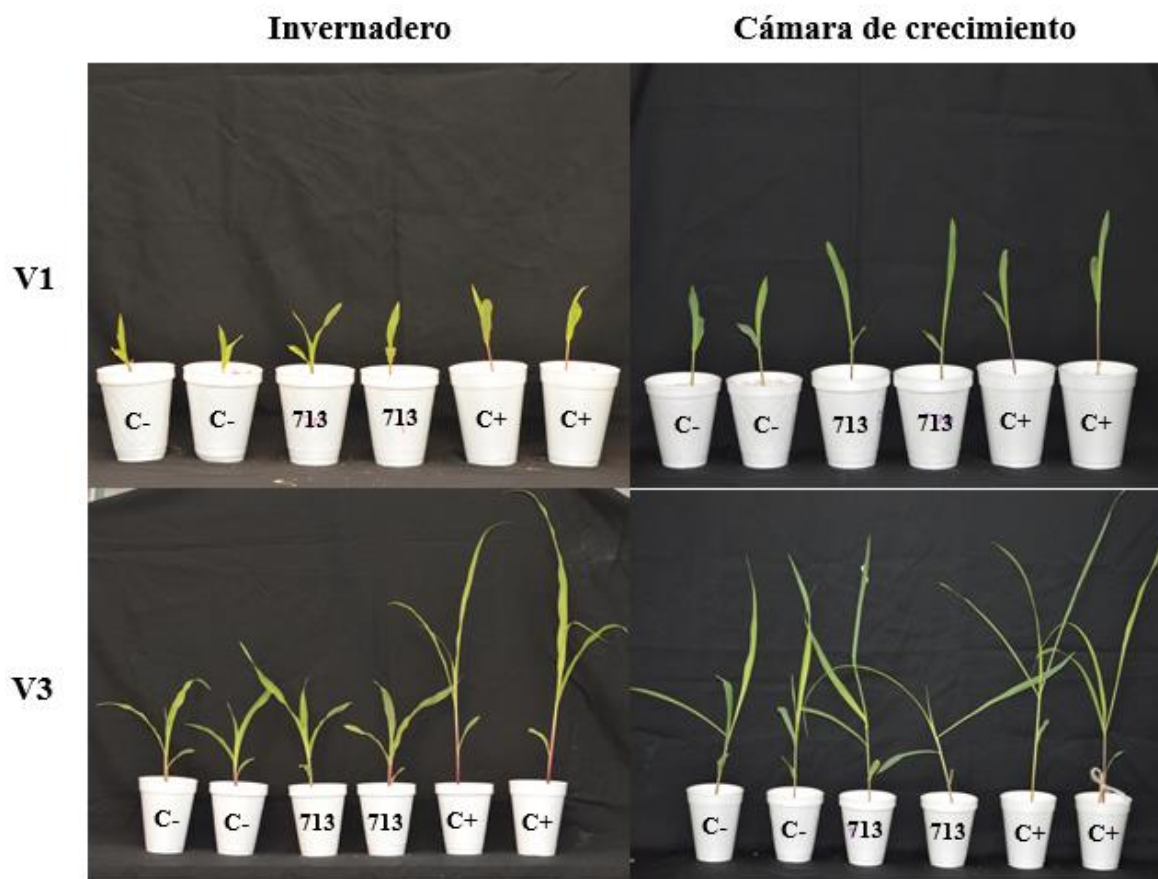
Para ilustrar las observaciones realizadas, en la figura 27 se observan las plantas de maíz tratadas con el aislado 713, tanto para las plantas crecidas en condiciones de invernadero como aquellas crecidas en cámara de crecimiento, en donde se puede notar que en estadio V1, para ambas condiciones, hay una elongación mayor de la parte aérea de las plantas tratadas con el aislado, así como para el control positivo correspondiente a la solución de GA<sub>3</sub>. Sin embargo en el estadio V3 se deja de ver este efecto para ambas condiciones.



**Figura 25. Longitud de la parte aérea para plántulas inoculadas con aislados bacterianos en condiciones de cámara de crecimiento.** Se muestran las gráficas para los diferentes estadios vegetativos. Se observa una diferencia significativa para los tratamientos con los aislados 42, 56, 350 y 713 (\* $p \leq 0.05$ ) en los estadios V1 y V2.

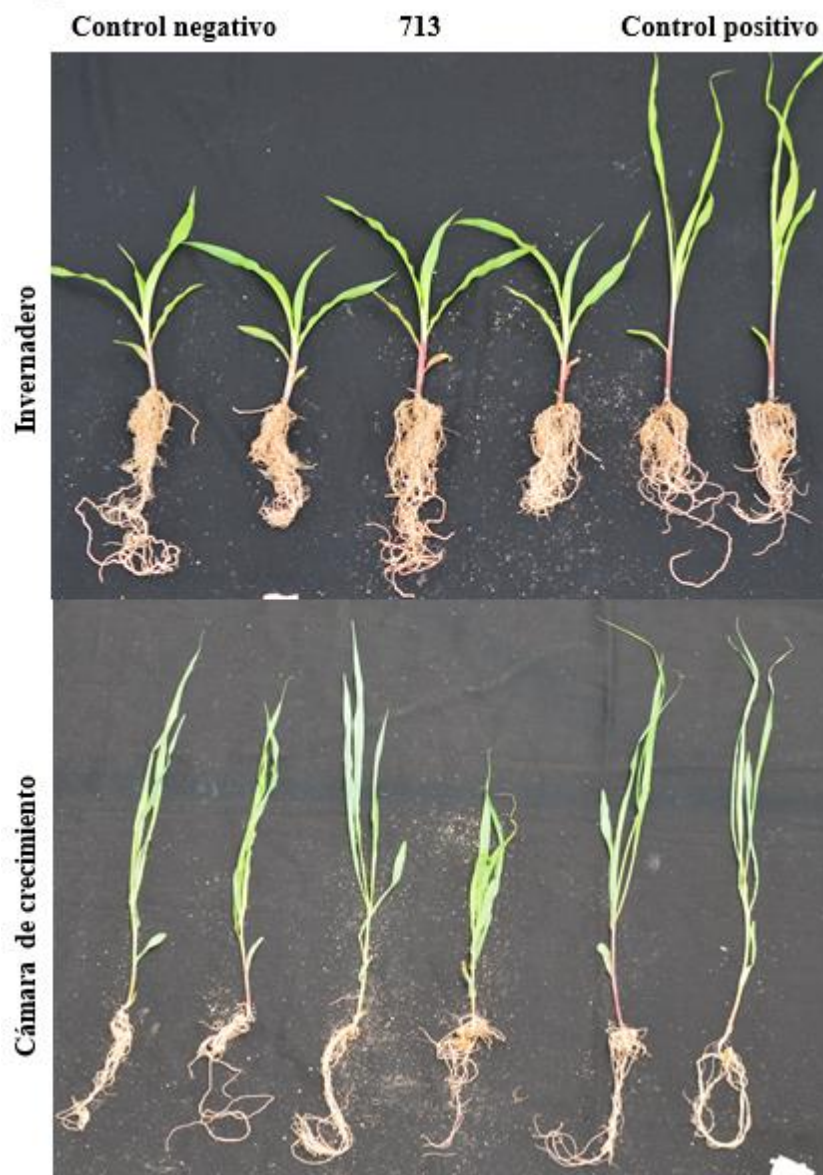


**Figura 26. Longitud de la parte aérea para plántulas inoculadas con aislados bacterianos en condiciones de invernadero.** Se muestran las gráficas para los diferentes estadios vegetativos. Se observa una diferencia significativa para los tratamientos con los aislados 42, 56, 79, 350 y 713 en el estadio V1 y 713 en el estadio V2 (\* $p \leq 0.05$ ).



**Figura 27. Crecimiento de plantas de maíz var. Legendario tratadas con el aislado 713.** En el estadio V1 se observa una mayor elongación de la parte aérea de las plantas de maíz en invernadero y cámara de crecimiento. Para el estadio V3 este efecto se pierde conservándose únicamente el efecto en las plantas tratadas con una solución de GA<sub>3</sub>. Se incluyen los controles negativos a la izquierda y los positivos a la derecha de las plantas inoculadas con el aislado.

Ambos experimentos terminaron en diferentes fechas debido a que alcanzaron el estadio V4 a diferentes tiempos. El 28 de Agosto del 2017 se completó el experimento de promoción de crecimiento vegetal que se llevó a cabo en cámara de crecimiento y el 1 de septiembre siguiente se completó el experimento que se llevó a cabo en invernadero (Fig. 28). En ambos casos se sacrificaron las plantas y se separó la parte aérea de la raíz para ser medidas y pesadas, y finalmente se colocaron en bolsas de papel para secar el tejido y obtener el parámetro de peso seco. Una vez obtenidos todos los parámetros (ver anexos 8 y 9) se realizó el mismo análisis estadístico descrito anteriormente (prueba de ANOVA de una variable y prueba de Dunnett) utilizando el programa GraphPad Prism 7.03. En los anexos 10 y 11 se muestran los valores de  $p$  obtenidos de cada uno de los parámetros medidos en las dos diferentes condiciones.

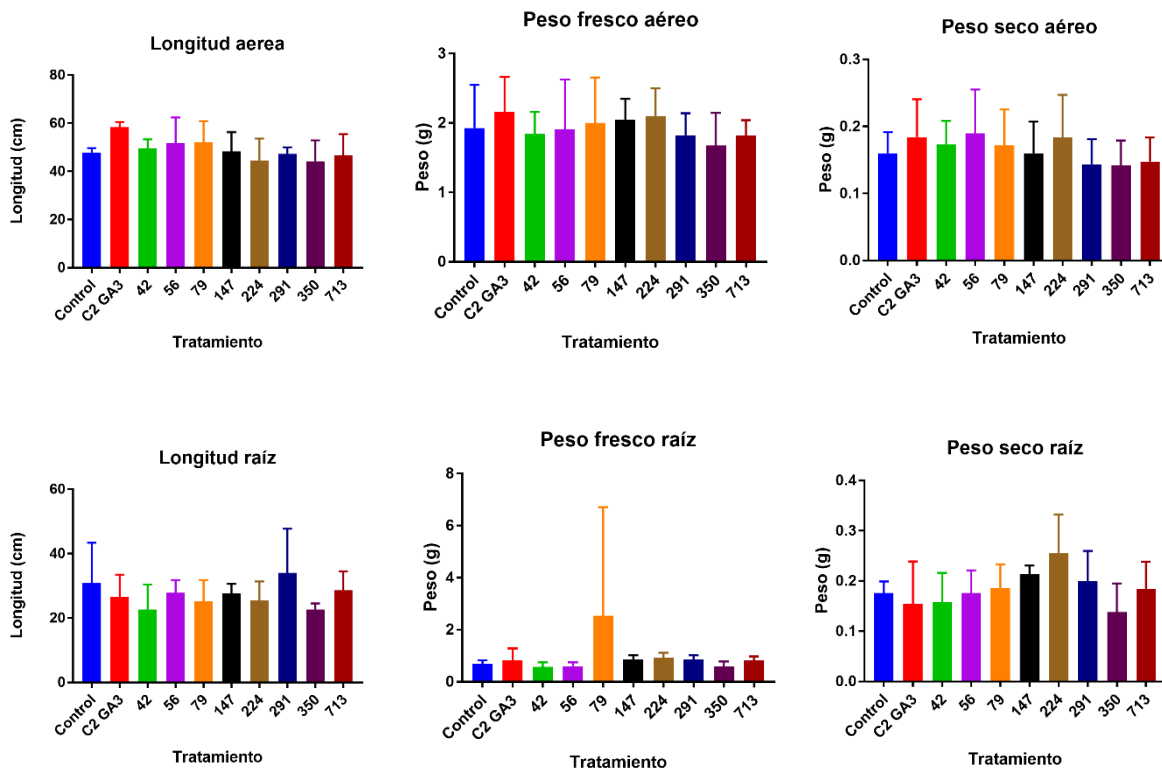


**Figura 28. Efecto del aislado 713 en plantas de maíz var. legendario en el estadio V4.** Se muestran las plantas tratadas con el aislado 713, así como los controles positivos y negativos al momento del sacrificio.

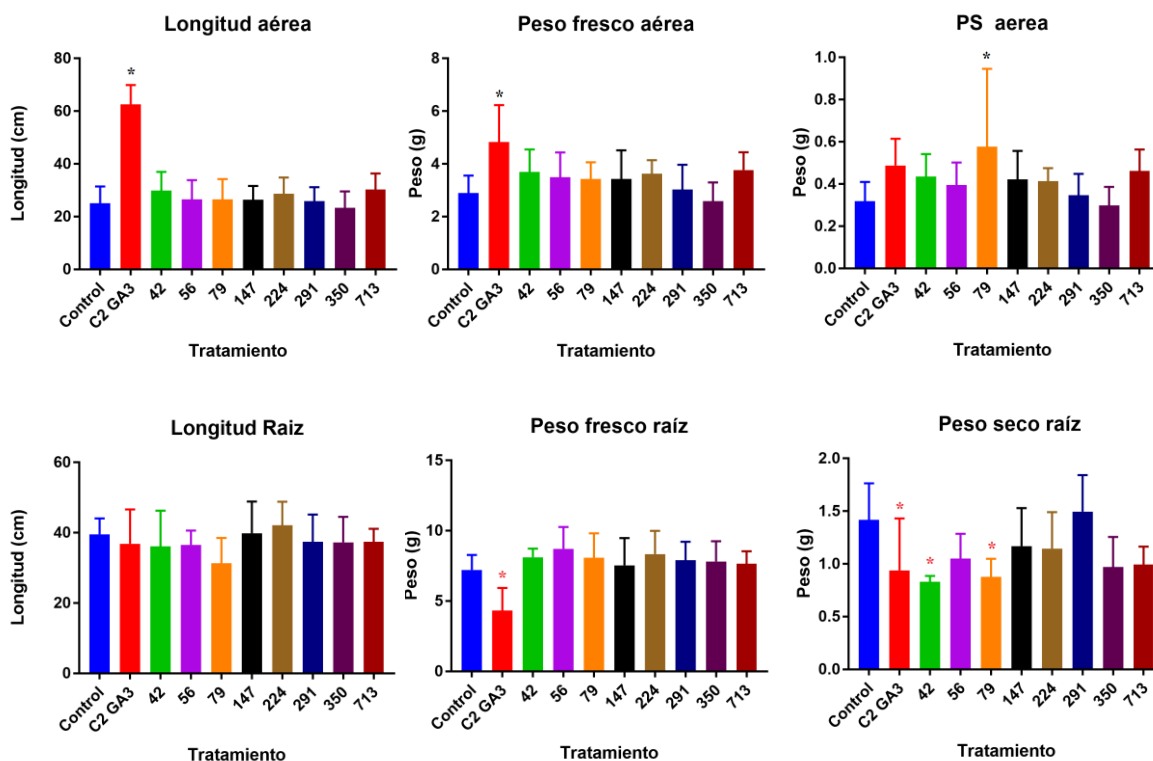
En el caso de las plantas crecidas bajo condiciones de cámara de crecimiento, observamos que al final del experimento las plantas no presentan diferencias entre los diferentes tratamientos con los inóculos bacterianos y el control positivo correspondiente a la solución 0.2 mM de GA<sub>3</sub> (Fig.29). Sin embargo, se observó una diferencia en algunas condiciones para las plantas que crecieron en invernadero, encontrando una diferencia significativa para los parámetros de peso seco de la parte aérea, siendo mayor en las plantas tratadas con el aislado 79 respecto al control negativo. También se observaron diferencias significativas en el peso seco de raíz en



presencia de los aislados 42 y 79. Como se esperaba, se obtuvo también una diferencia significativa en los parámetros de longitud aérea, peso fresco aéreo y peso fresco de raíz para el grupo correspondiente al control positivo, el cual fue tratado con una solución de GA<sub>3</sub> 0.2 mM, de acuerdo a la prueba de Dunnett (Fig. 30).



**Figura 29. Efecto de los aislados bacterianos productores de GAs en la promoción de crecimiento vegetal en cámara de crecimiento.** Se muestran las gráficas del efecto de los aislados bacterianos sobre los diferentes parámetros de crecimiento medidos. No se observa una diferencia significativa para ninguno de los tratamientos (\* $p \leq 0.05$ ).



**Figura 30. Efecto de los aislados bacterianos productores de GAs en la promoción de crecimiento vegetal en cámara de invernadero.** Se muestran las gráficas del efecto de los aislados bacterianos sobre los diferentes parámetros de crecimiento medidos. Se observa una diferencia significativa para los tratamientos de GA<sub>3</sub> sobre longitud aérea, peso fresco aéreo, peso fresco raíz y peso seco raíz (\*p ≤ 0.05) y del aislado 79 sobre peso seco aéreo y de raíz.

En conjunto, los resultados muestran que los aislados 42, 56, 79, 350 y 713 producen un incremento en la parte aérea de las plantas de maíz en el estadio V1 en ambas condiciones. Este efecto se mantuvo a lo largo del experimento en las plantas que crecieron en la cámara de crecimiento, mientras que en invernadero el efecto favorable se mantuvo solo en las plantas tratadas con el aislado 713. En ambos casos, el efecto observado se perdió al alcanzar el estadio V3, teniendo como resultado global un aumento en la elongación por efecto del tratamiento con los aislados mencionados en los primeros estadios vegetativos de la planta de maíz.

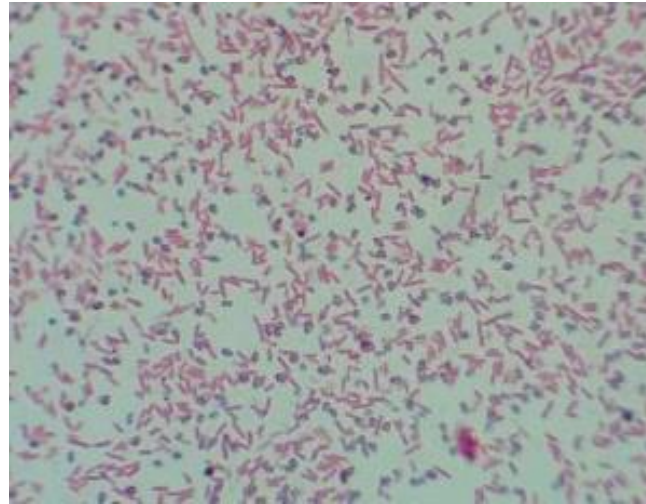
#### 6.4 Identificación molecular de los aislados bacterianos productores de giberelinas con efecto promotor de crecimiento vegetal.

Los esquemas tradicionales de identificación bacteriana se basan en las características fenotípicas de las mismas, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas. Estos métodos son bastante asequibles y rápidos por lo que antes de realizar la

identificación molecular se determinaron las características macroscópicas y microscópicas de nuestros aislados productores de GAs, para lo cual se realizó tinción de gram y caracterización morfológica a cada uno de los aislados productores que se emplearon en los ensayos de promoción de crecimiento vegetal (anexo 12). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 9. Para el aislado 350 se realizó también la tinción de schaeffer fulton, la cual fue positiva la formación de endosporas, lo que nos sugiere que el aislado 350 puede pertenecer al género *Bacillus* (Fig. 31).

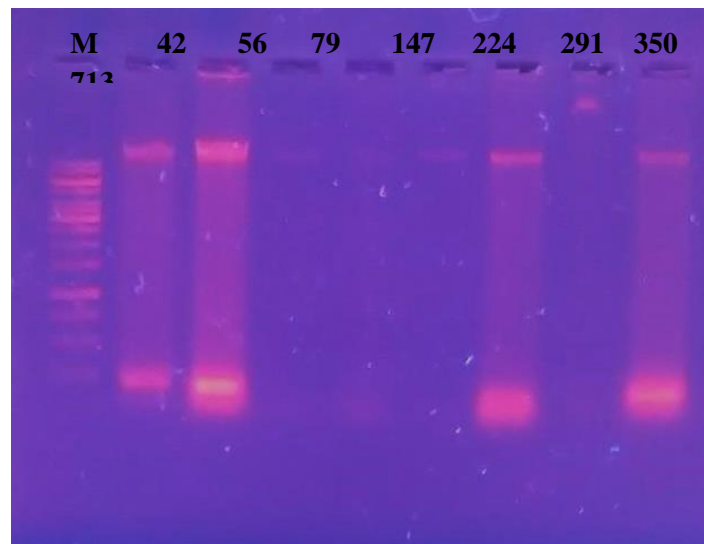
**Tabla 8. Características microscópicas de los aislados bacterianos utilizados en el experimento de promoción de crecimiento vegetal.**

Número de aislado	Clave	Tinción de Gram
56	3RX-2-LB(5)	Bacilos Gram(-)
42	3RX-DIR-NUT(1B)2	Cocobacilos Gram(-)
79	3RX-2-NUT(6)	Cocobacilos Gram(-)
147	2RX-2-LB(3B)1	Cocos Gram(+)
224	1TY-DIR-LB(1A)2	Bacilos Gram(-)
291	3TY-DIR-LB(2)	Bacilos Gram(-)
350	1SX-4-NUT(17A)	Bacilos Gram(+)
713	1FX-DIR-NUT(6B)	Bacilos Gram(-)

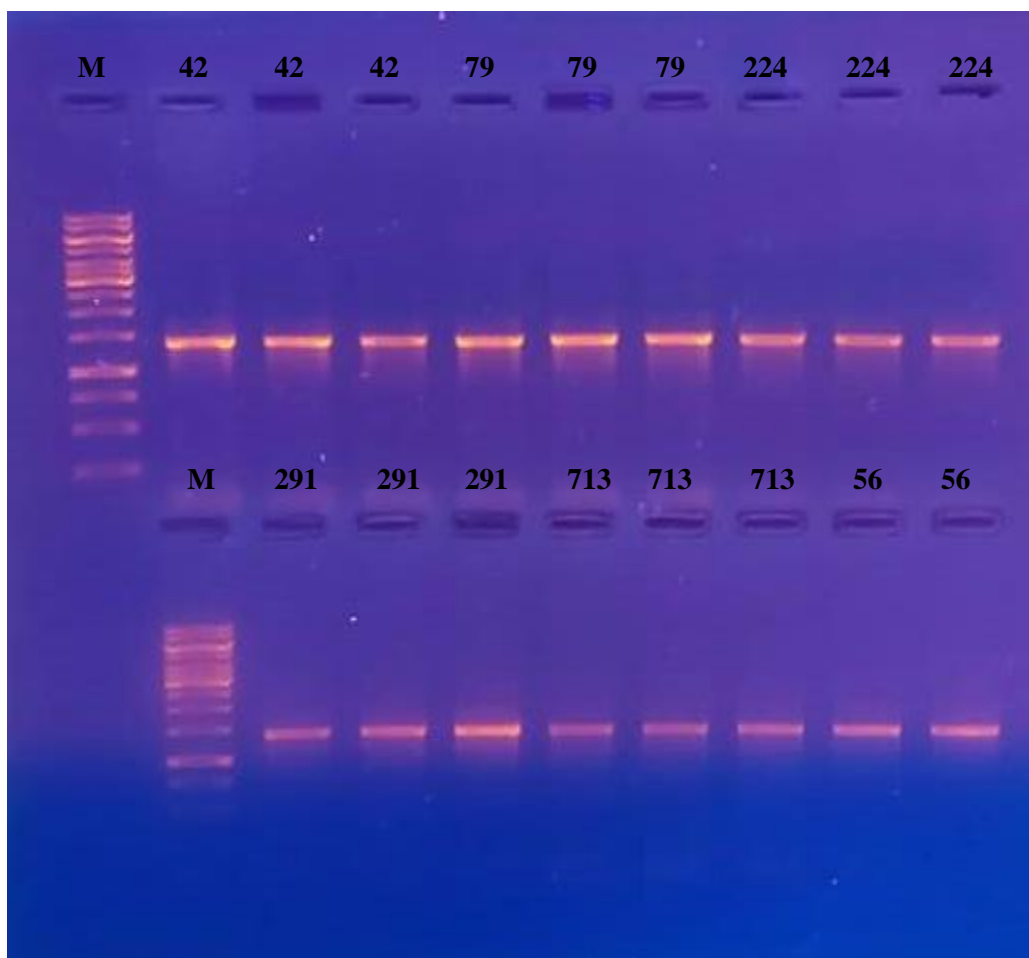


**Figura 31. Tinción de Schaeffer-fulton al aislado 350.** Se puede observar la presencia de endosporas, como estructuras ovoides teñidas con verde de malaquita.

Para complementar la caracterización de los aislados productores de GAs, se realizó una identificación genotípica parcial mediante la amplificación y secuenciación de la región correspondiente al ARNr 16S. Inicialmente se realizó la extracción de ADN genómico de los aislados productores (ver apartado 5.6.1) y el resultado de dicho procedimiento se muestra en la figura 32, en donde se observan cantidades variables de ADN genómico recuperado de los aislados 42, 56, 79, 147, 224, 291 y 713. La única muestra para la cual no fue posible recuperar ADN genómico correspondió al aislado 350.



**Figura 32. ADN genómico extraído de los aislados bacterianos productores de GAs.** Se muestra el marcador de peso molecular de 1Kb (M) en el primer carril y a continuación el ADN de los diferentes aislados.



**Figura 33. Amplicones correspondientes al gen 16S rARN obtenidos para los aislados bacterianos productores de GAs.** En esta figura se pueden observar las bandas de los productos de PCR con un peso esperado de aproximadamente 1400 pb. M de los diferentes aislados mencionados y el marcador de peso molecular de 1Kb (M).

A partir del ADN genómico, se realizó la amplificación por PCR, utilizando los *primers* universales correspondientes al gen de interés (Morales-García *et al.*, 2011), de acuerdo a las condiciones descritas en la sección de material y métodos (Ver apartado 5.6). En la figura 33 se muestran los productos de la amplificación, en donde se puede observar que en todas las reacciones se obtuvo el producto esperado de aproximadamente 1400 pb.

Para cumplir con nuestro último objetivo se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la unam aquellos aislados que mostraron un efecto positivo en el crecimiento de las plantas de maíz durante los primeros estadios vegetativos que fueron los aislados 42, 56, 79 y 713 (Tabla 9). Para el aislado 350 podemos sugerir de acuerdo a sus características macro y microscópicas que pertenece al género *Bacillus*.

**Tabla 9. Identidad de los aislados productores de GAs con efecto positivo en elongación de parte aérea durante estadios tempranos en maíz var. Legendario.**

No. Aislado	Descripción	Max score	Total score	Query cover	E-value	Identidad
42	<i>Psuedomonas fluorescens</i>	1622	1622	100%	0.0	99%
56	<i>Lelliottia amnigena</i>	1670	1670	100%	0.0	99%
79	<i>Pseudomonas synxantha</i>	1657	1657	100%	0.0	99%
713	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1696	1696	99%	0.0	99%

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1 Aislamiento de cepas bacterianas endófitas y epífitas

La microbiología clásica involucra el aislamiento y cultivo de microorganismos del ambiente utilizando diferentes medios nutritivos, dependiendo de nuestro propósito serán las condiciones que usemos (Turner *et al.*, 2013); y debido a que el microbioma de una planta es fundamental para su salud, la manipulación de los microorganismos asociados a las plantas puede reducir potencialmente su incidencia en enfermedades, incrementar su producción agrícola, reducir el uso de insumos de origen químico resultando en prácticas agrícolas sustentables (Turner *et al.*, 2013). En este sentido fue primordial para nuestro grupo de investigación tratar de recuperar la mayor parte del microbioma asociado a esta orquídea, por lo que se decidió aislar tantos microorganismos bacterianos y fúngicos cultivables.

En el caso de las bacterias la literatura sugiere que solo se puede recuperar del 0.001% al 1% de endófitos cultivables presentes en los tejidos de la planta después de una desinfección superficial, aun con estas cifras desalentadoras el uso de medios nutritivos pueden eficientizar el aislamiento (Eevers *et al.*, 2015).

Para el aislamiento de bacterias endófitas y epífitas de nuestro modelo de utilizamos tres medios diferentes de cultivo (fig 13): Medio Luria-Bertani (LB), que contiene peptona de caseína y extracto de levadura que son esenciales para el desarrollo óptimo de la mayoría del microorganismo, medio nutritivo (NUT) que contiene pluripeptona y extracto de carne y es ideal para el desarrollo de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales y por último se utilizó un medio mínimo enriquecido con sales y vitaminas (MM) que contiene la base de un medio mínimo (glucosa y diferentes sales) así como la adición de vitaminas del

complejo B, peptona de caseína y extracto de levadura y este fue utilizado para el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes.

Con el uso de los medios de cultivo anteriores se obtuvo un total de 1024 aislados bacterianos de las muestras recolectadas de *S. tigrina* (fig. 12) de los cuales 345 aislados se recuperaron de la planta 1, 259 de la planta 2, 322 de la planta 3 y 98 aislados se obtuvieron de la flor. Sin embargo, no observamos alguna predilección por parte de las bacterias aisladas por algún medio en específico, excepto en la planta 3 que hay un mayor aislamiento en medio nutritivo y esto podría deberse a que las bacterias obtenidas de esta planta estaban restringidas nutricionalmente en comparación de las plantas 1 y 2 debido al hábito litófito de la planta 3 (fig. 13).

Como se ha venido mencionando la asociación bacteria orquídea es poco conocida, pero no por ello menos importante, en un estudio realizado en orquídeas terrestres del este de Australia (Wilkinson *et al.*, 1993) se observó que los géneros que conforman la microflora de estas orquídeas siguen un patrón temporal, también se ha visto que la abundancia de microorganismo en raíces depende del hábito de la orquídea. Se ha reportado que las raíces aéreas de orquídeas epífitas tienen 30 veces más densidad bacteriana en comparación con las raíces de orquídeas terrestres (Tsavkelova *et al.*, 2006). En este sentido hubiésemos esperado encontrar una diferencia entre el número de aislados bacterianos en función de su hábito, sin embargo, como observamos en la figura 12, el número de aislados bacterianos entre las plantas epífitas (planta 1 y 2) es muy similar a los aislados de la planta litófito (planta 3).

En la figura 14 podemos observar que, el número de aislados de raíz y rizósfera entre las diferentes plantas de *Stanhopea tigrina* es muy similar, al realizar una relación porcentual de los aislados bacterianos de cada planta por tejido, obtuvimos de las plantas 1 y 2 un porcentaje de 21.4 % y 24.3% respectivamente y de la planta 3 un 28.3% de aislados de raíz. En cuanto los aislados de rizósfera se obtuvo un porcentaje de 27.5 % y 19.3% de las plantas 1 y 2 y un 19.3% de la planta 3. Los microorganismos obtenidos de raíz y rizósfera son de gran interés biotecnológico debido a que los exudados de la raíz pueden contener una gran variedad de compuestos entre los que podemos encontrar ácidos orgánicos azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, factores de crecimiento, hormonas y compuestos antimicrobianos (Turner *et al.*, 2013). Los porcentajes de aislados bacterianos en raíz y rizósfera son similares a los porcentajes obtenidos en otros tejidos y no se observó que existiese una mayor cantidad aislados en las plantas epífitas a comparación con la planta litófito o en comparación a otros tejidos diferentes.

Como se mencionó los microorganismos obtenidos de raíz y rizósfera son los más estudiados debido a que estas zonas, se encuentran altamente colonizadas pero, otro tejido de gran importancia es la filósfera. La filósfera es la superficie aérea de la planta, se considera que es pobre en nutrientes comparada con la rizósfera, la colonización microbiana de hojas no es

homogénea y se ve afectada por estructuras como venas, pelos y estoma. Es un ambiente mucho más dinámico que la rizósfera, puesto que sus residentes están sujetos a los cambios de temperatura, humedad y radiación. La precipitación y el viento contribuyen a la residencia temporal de los microorganismos. (Turner *et al.*, 2013).

En nuestras muestras de *Stanhopea tigrina* se obtuvieron de las plantas 1 y 2 un número de aislados de 77 y 82 que corresponde al 22.3 % y 31.7% respectivamente. En cuanto a la planta 3 se obtuvieron 67 aislados que corresponde al 20.8%. Hay un mayor porcentaje de aislados en las plantas epífitas en comparación a la planta litófitas y esto se puede deber a que las plantas epífitas al crecer sobre un árbol se encuentran en un ambiente mucho más dinámico que aquella que creció sobre una roca.

Otro microambiente importante y característico de la familia *Orchidaceae* es el pseudobulbo, que sirve de almacenamiento de agua y alimento, sin embargo, ha sido poco estudiado y hasta el momento solo existe un reporte en *Laelia furfuracea* y *Oncidium Sphacelatum* de géneros bacterianos asociados a los pseudobulbos de estas orquídeas (Zambrano *et al.*, 2007), en este reporte se aislaron géneros como *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Acetobacteras*, pero a comparación con otros tejidos estudiados, raíz y hoja, se encontró una menor cantidad de bacterias. A diferencia lo reportado por Zambrano en el 2007, podemos observar un número significativo de aislados bacterianos de pseudobulbo (figura 14 y 15) e inclusive en las plantas 1 y 3 este tejido contiene la mayor cantidad de aislados, lo cual nos sugiere que también el pseudobulbo es un nicho importante para bacterias simbióticas asociadas a *S. tigrina*.

*Stanhopea tigrina* es una especie conocida por su espectacular floración entre los meses de julio y agosto, sus flores producen fragancias fuertes que sirven para atraer a su polinizador *Euglossa viridissima*, esto es importante debido a que levaduras y bacterias son transportadas a la flor por sus insectos polinizadores, aunque también la lluvia y los microorganismos del aire pueden contribuir a la microbioma de las flores (Jacquemyn *et al.*, 2013). Hasta el momento no hay reportes de bacterias asociadas a flores de orquídeas sin embargo en un estudio realizado en flores de vid, demostraron que las bacterias endófitas recuperadas de flor se encontraban en otros tejidos de la vid (raíz, hoja, tallo) es decir que también puede haber una colonización de la rizósfera hasta las partes reproductivas de la planta (Compant *et al.*, 2011).

En total obtuvimos 98 aislados de flor (Figura 14) y como observamos en la figura 15 y a diferencia de pseudobulbo y hoja hay una mayor presencia de bacterias epífitas en que de endófitas. Este número es consistente con lo reportado en la bibliografía donde se menciona que la concentración de bacterias epífitas es usualmente más grande que aquellas que son endófitas, para el caso de *herbaspirillum* es mayor en un factor de 10 (Turner *et al.*, 2013). Y, a pesar de haber mayores estudios de bacterias endófitas que epífitas debido a su potencial



uso biotecnológico no debemos menospreciar a las bacterias epífitas como productoras de metabolitos secundarios.

## 7.2 Identificación de aislados productores de giberelinas

Por décadas ha sido aceptado que las bacterias tienen la capacidad de producir giberelinas. El primer reporte de la caracterización de giberelinas en bacterias, utilizando métodos fisicoquímicos, fue el de Atzorn en 1988, quien demostró la presencia de GA1, GA4, GA9 y GA20 en cultivos de *Rhizobium meliloti* (Atzorn *et al.*, 1988). Sin embargo, pocas son las técnicas espectrofotométricas para la determinación rápida y confiable de estas estructuras en un cultivo microbiológico. Candau en el 1992 describió una técnica, basándose en el hecho que la producción de giberelinas comienza después de agotarse la fuente de nitrógeno en este sentido, ellos utilizan el medio mínimo ICI para crecer al hongo *Gibberella fujikuroi* 8% Glucosa y 0.48%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Candau *et al.*, 1992), para después determinar la presencia de la giberelinas utilizando un método fluorométrico simple (ver apartado 5.4.1). Esta técnica parecía ser ideal para nuestras condiciones, ya que, contábamos con 1024 aislados por analizar. Al inicio de los ensayos se notó que el medio ICI reportado no favorecía el crecimiento de nuestros aislados bacterianos por lo que se optó por la utilizar el medio Czapek para el crecimiento de los aislados y este medio contiene 1% de peptona y 1% de glucosa. A pesar que se observa siempre cierto ruido en nuestro control negativo (fig. 18) logramos obtener, bajo nuestras condiciones, 18 aislados positivos a esta prueba cualitativa, 7 aislados fueron obtenidos de raíz, 4 de rizósfera, 2 de pseudobulbo ambos endófitos, 2 de uno endófito y otro epífito y 3 de flor epífito (figura 19). Consistente con lo reportado las bacterias recuperadas de raíz y rizósfera tienen una mayor presencia en la producción de metabolitos secundarios aun incluso sin ser estos los tejidos de donde se recuperó la mayor cantidad de aislados bacterianos de nuestras plantas de *S. tigrina* (fig 15).

Otro dato relevante que llama la atención fue que 4 aislados productores de giberelinas fueron de origen epífito y 3 de origen endófito (figura 19); esto último resulta interesante ya que parece ser que las bacterias epífitas tienen una función en el desarrollo de la planta y no solo fungen como una barrera protectora en ellas para que estas puedan sobrevivir en condiciones de estrés o impidan la colonización por parte de patógenos (Fenella *et al.*, 2014). Hasta aquí es importante mencionar que no hay reportes de bacterias productoras de giberelinas aisladas de orquídeas y usualmente las bacterias con capacidad de producir de giberelinas son obtenidas de raíz o rizósfera (tabla 3). Sin embargo, con el uso de esta técnica podíamos solo sugerir la presencia de giberelinas en nuestros aislados positivos pero esto nos ayudó a tamizar 1024 aislados bacterianos a solo 18 para los siguientes experimentos que fueron confirmar la presencia de giberelinas en nuestros cultivos bacterianos.

Para caracterizar la presencia de estas estructuras es usual utilizar la cromatografía de gases acoplada espectrometría de masas (GC-MS), sin embargo, debido a la naturaleza polar de las giberelinas hacía poco sensible el uso de esta técnica (Bhalla, K y Singh, S. 2010). Por lo que para nuestro propósito utilizamos un método para HPLC descrito por Bhalla en 2010, donde se usó sistema isocrático de elución, este mismo método nos ayudó a realizar una estimación cuantitativa de giberelinas producidas. Además de utilizar HPLC para caracterización de esas estructuras decidimos utilizar también la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) como una técnica complementaria ya que también se pueden separar varias estructuras de giberelinas empleando diferente sistemas de disolventes y agentes reveladores (Castillo *et al.*, 2007).

Siguiendo la metodología descrita de los apartados 5.4.2 al 5.4.4 se realizaron las técnicas de TLC y HPLC acoplado a UV sobre los sobrenadante de nuestros cultivos bacterianos. Castillo y colaboradores reportan que la presencia de GA<sub>3</sub> y GA<sub>1</sub> se observan con una fluorescencia de color azul y GA<sub>4</sub> presenta una fluorescencia menos intensa respecto al ácido giberélico tal como observamos en la figura 19, lamentablemente en los sobrenadantes de nuestros cultivos no encontramos ninguna mancha correspondiente a nuestros patrones, ni con la misma fluorescencia ni con valores similares de R<sub>f</sub>, La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa. Y esto probablemente se explica a que la producción de giberelinas por parte de nuestros aislados es menor respecto a la concentración mínima que esta técnica puede detectar, que de acuerdo a Torres en 2000 la concentración mínima detectable para ácido giberélico utilizando cromatografía en capa fina es de 0.05 ug/mL. En este sentido la técnica de HPLC se convirtió en la única disponible para confirmar dichas estructuras. Como se mencionó en los resultados se hicieron lecturas a dos longitudes de onda diferentes: 206 nm y a 254 nm ya que nuestros estándares absorbían a 206 pero no a 254 nm. Utilizar dos longitudes diferentes nos ayudó a distinguir entre nuestros compuestos y otras estructuras químicamente similares y también aseguró la confiabilidad de nuestros resultados.

En las figuras 21 y 22 observamos los resultados de los cromatogramas correspondientes a los sobrenadantes de los aislados 56 y 713 respectivamente. En la primera figura observamos un pico que cae en el mismo tiempo de retención que GA<sub>3</sub> pero, no se observa lectura al tiempo de retención de GA<sub>4</sub> al mismo tiempo se compararon esas mismas lecturas pero a 254 y no se observó pico alguno que cayera al mismo tiempo de retención de GA<sub>3</sub> por lo que podíamos decir que en el sobrenadante de la muestra 56 encontramos la presencia de ácido giberélico. Para el caso del aislado 713 se pueden observar dos picos que caen a los tiempos de retención de GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub>, empero, al observar el cromatograma a 254 nm se podía observar un pico al mismo tiempo de retención de GA<sub>3</sub>, por ende, se sugirió la presencia de GA<sub>4</sub> pero no la de GA<sub>3</sub>. En la figura 17 se ejemplifica como se fueron descartando los picos correspondientes a nuestros patrones de los que no. Este análisis además de la repetitividad de los picos observados nos ayudó a descartar aquellos aislados de bacterianos productores de GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub>

de los que no (tabla 5), empero, es importante mencionar que no estamos descartando la posibilidad que todos nuestros aislados tengan la capacidad de producir algún otro tipo de giberelinas puesto que no contamos con los estándares para poder asegurar o descartar la producción de los demás compuestos giberélicos. Al final del análisis únicamente nos quedamos con 8 aislados bacterianos para realizar las pruebas de promoción de crecimiento vegetal.

### 7.3 Efecto promotor de crecimiento vegetal

Hasta este momento de los 1024 aislados bacterianos recuperados de plantas de *S. tigrina*, habían pasado por varios tamices (prueba culitativa de Candau, TLC y HPLC) para quedarnos solamente con 8 aislados bacterianos como los mejores productores de giberelinas. Sin embargo demostrar que estos aislados tengan la capacidad de producir fitohormonas no asegura que estas tuvieran un efecto positivo en un sistema biológico, como se mencionó anteriormente el modelo sobre el cual se trabajaron las cepas es totalmente diferente del cual se aislaron las bacterias, empero, a pesar de sus diferencias ecológicas las bacterias rizosfericas y endófitas poseen la capacidad de establecer una asociación benéfica (Amerasan *et al.*, 2012).

En este sentido el uso de microorganismos promotores de crecimiento vegetal ha tomado importancia en los sistemas agrícolas sustentables, el éxito u eficiencia de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) esta influenciado por varios factores como la habilidad de las bacterias por colonizar las raíces de las planta y una eficiente colonización esta asociada con una competencia microbiológica, asi como la modulación de la expresión de genes y la comunicación célula-célula via quorum sensing. Diferentes bacterias pueden promover el crecimiento de la planta a diferentes estadios del ciclo de vida de la planta hospedera utilizando diversos mecanismos (Souza *et al.*, 2015). Hasta aquí podemos sugerir que diferentes factores están involucrados para que pueda ser observado un efecto benéfico de la bacteria en la planta, empezando por el reconocimiento por ambos organismos. Y esto puede ser afectada por múltiples condiciones, incluyendo las ambientales por lo que el experimento de promoción de crecimiento vegetal se llevó a cabo bajo dos diferentes condiciones: Cámara de crecimiento e invernadero.

En el caso de las condiciones establecidas en cámara de crecimientos estas variables fueron mejor controladas (ver tabla 7) la variabilidad entre la temperatura, humedad e iluminación era mínima durante el transcurso del día, en cambio, bajo condiciones de invernadero los parámetros estaba sujetos a los cambios de clima o ambiente de tal manera que observamos una mayor variación en cuanto a temperatura, humedad e iluminancia a lo largo del día (ver tabla 6), sin embargo, estas condiciones son las mas cercanas a las que se tendría si el experimento se llevara a cabo *in situ*.

Durante el transcurso del experimento se fue monitoreando el crecimiento de las plantas de maíz y se observó que los estadios vegetativos se alcanzaban más rápido en condiciones de cámara de crecimiento que de invernadero (ver anexo 4 y 5) una de las posibles explicaciones es que la planta de maíz es una planta tropical y su mayor producción ocurre donde las isoterms de los meses más cálidos están en el rango de 21 a 27 °C (Fassio *et al.*, 1998) al tener los parámetros de temperatura y humedad controlados además de ideales estos fueron más favorables para el desarrollo de las plantas en cambio durante el montaje del experimento (11 de Agosto de 2017) se presentaron lluvias con chubascos debido a la onda tropical No. 24 y esto probablemente ocasiono el retraso del desarrollo de las plantas en invernadero. El experimento se interrumpió una vez que las plantas alcanzaron el estadio V4, cuando la cuarta hoja está completamente desarrollada. Las plantas fueron sacrificadas para obtener los parámetros de: longitud aérea, peso fresco aéreo, peso seco aéreo, longitud de raíz, peso fresco de raíz y peso seco aéreo. Una vez obtenidos todos los datos se realizó un análisis de ANOVA de una variable utilizando el programa GraphPad Prims 7.03 con una  $P < 0.05$  con diferencia significativa.

Para el caso de las plantas crecidas en cámara de crecimiento no hubo diferencia significativa entre los tratamientos al final del experimento, incluso no se observó diferencia para el control positivo (anexo 6). Para el caso de las plantas que crecieron en invernadero si se observa diferencia significativa en todos los parámetros excepto en el de longitud de raíz, sin embargo, al realizar la prueba de Dunnett se demostró que esta diferencia era debido al control positivo en el caso de longitud aérea, peso fresco aéreo y peso fresco de raíz. Sin embargo hubo un incremento significativo en el peso seco de la parte aérea de las muestras tratadas con el aislado 79. También se observa una diferencia de medias en peso seco de raíz por parte de las plantas tratadas con el control positivo, el aislado 42 y 79; pero, esta diferencia de medias no es favorable.

En vista de los resultados obtenidos, se realizó el mismo análisis estadístico con las datos que se obtuvieron durante la medición de la parte de área de las plantas de maíz a través de los diferentes estadios vegetativos (anexo 6 y 7). En ambas condiciones si se observa diferencias significativas en todos los estadios, excepto en V3 de cámara de crecimiento. Al realizar la prueba de Dunnett llama la atención que tanto en cámara de crecimiento y en invernadero los aislados bacterianos 42, 56, 350, 713 y 79 (solo en invernadero) muestran una diferencia entre medias favorables en el crecimiento de la longitud aérea en el estadio de hoja 1 (V1) (figuras 25 y 26). Para el estadio de hoja 2 (V2) el efecto es el mismo en cámara de crecimiento con los mismos aislados, pero para el estadio V2 en invernadero el único tratamiento que sigue siendo diferente es el del aislado 713. En ambos casos a partir de V3 las diferencias significativas dejan de observarse, en este sentido, para el momento del sacrificio de la planta ya no se observa un incremento, en este caso, en la longitud de la parte aérea.

Esto parece sugerir que los aislados 42, 56, 350, 713 y 79 son potencialmente promotoras de crecimiento vegetal en los estadios vegetativos tempranos de la planta de Maíz

#### 7.4 Identificación molecular de los aislados bacterianos productores de giberelinas.

Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) han sido implicadas en la estimulación del crecimiento de la planta, un diverso grupo de microorganismos aisladas de suelo, epífitas o endófitas han sido descritas como productoras de fitohormonas (Patel & Saraf, 2017). Varios géneros como *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Pseudomonas* se han catalogado como BPCV en maíz (Kuan *et al.*, 2016).

Para el caso de las orquídeas la rizosfera se encuentra habitada por diferentes organismos fototróficos y heterotróficos. El velamen de las orquídeas provee un nicho favorable para varias bacterias “satélite” y esta población se ve afectada por el hábitat de la orquídea, sin embargo, se pueden encontrar diferentes géneros de bacterias promotoras del crecimiento en común como *Bacillus*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* (Tsavkelova, 2011). Consistente con esta información y después de comparar las secuencias obtenidas de la amplificación de una región del gen 16S rDNA con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank se identificaron para los aislados: 42 *Pseudomonas fluorescens*, 56 *Lelliottia amnigena*, 79 *Pseudomonas synxantha* y 713 *Stenotrophomonas maltophilia*. Para el aislado 350 de acuerdo a sus características macro y microscópica se sugiere que pertenece al género *Bacillus*.

En concordancia con Tsavkelova en 2011 encontramos que 3 de los 4 géneros aislados de nuestra orquídea *S. tigrina* ya habían sido reportados en la orquídea epífita *Pholidota articulata* que son *Bacillus*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*. Y se terminó una cuarta especie que no ha sido reportada como microbiota de las orquídeas, *Lelliottia amnigenus* (anteriormente conocida como *Enterobacter amnigenus*).

*Pseudomonas* son bacterias ubicuas ampliamente extendidas en suelos y tienen muchos rasgos que la catalogan como BPCV. *Pseudomonas fluorescens* es una bacteria Gram negativa no entérica y pertenecen a las  $\gamma$ .proteobacterias, son habitantes comunes del suelo, agua, filósfera pero predominan en la rizósfera debido a los exudados que producen las plantas (Pathma *et al.*, 2011) y ha sido reportada como productora de giberelinas, en 2013 Sivasakthi aisló 10 cepas de *P. fluorescens* y se demostró que todas las cepas producían en diferentes concentraciones ácido indol acético y ácido giberélico, esta última se produjo en una concentración máxima de 5.96  $\mu\text{g/mL}$ . En 2016 Kapoor reporta que *P. fluorescens* aisladas de la rizósfera de árboles de pera y manzana y reporta un rango de producción de giberelinas

de 25-60  $\mu\text{g/ml}$  si bien la concentración que se obtuvo de ácido giberélico por parte del aislado 42 es menor a los anteriores mencionados es importante mencionar que las concentraciones obtenidos son variadas y dependen del medio de cultivo empleado. *P. synxantha* no ha sido reportada como productora de giberelinas y es una de las especies poco exploradas a comparación de otras especies de *Pseudomonas*, sin embargo, se sabe que esta bacteria tiene actividad nematocida y también secreta un biosurfactante que es activo contra diferentes cepas de micobacterias (Mukherjee *et al.*, 2014).

Para el caso de *Strenotrophomonas maltophilia*, se aisló una cepa de esta bacteria de tejidos micorrizicos de orquídeas australianas, este aislado y otros fue capaz de promover la germinación simbiótica de *Pterostylis vittata*, también se detectó que era capaz de producir IAA. En otro estudio se aisló esta misma especie de la rizósfera de *coleus forskohlii*, planta medicinal, la bacteria mostró solubilizar fosfato inorgánico, producir de IAA sideróforos entre otros lo cual demuestra a esta bacteria como potencial promotora de crecimiento (Patel & Saraf, 2017)

Varios géneros dentro de esta familia *Enterobacterae* se han descrito como bacterias promotoras del crecimiento vegetal como: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* tienen el potencial para contribuir al desarrollo de sistemas agrícola. En general funcionan por tres vías distintas: sintetizando compuestos particulares para las plantas, facilitando la absorción de nutrientes del suelo, inmunizando a la planta, por desgracia no existe información de *C* o *Enterobacter amnigenus* como bacteria promotora vegetal pero esto no la descarta como tal (Jha *et al.*, 2011).

Por último, si bien podemos solo sugerir que el aislado 350 pertenece al género *Bacillus*, *Bacillus* es el más abundante genero en la rizósfera y su actividad como BPCV en algunas cepas ha sido conocida por años. Hay un sinnúmero de metabolitos producidos por este género que afectan fuertemente el ambiente e incrementa la disponibilidad de los nutrientes en la planta, son capaces también de solubilizar fosfatos, también han sido reportados productores de fitohormonas como las giberelinas (tabla 3).

Es importante mencionar la mayor parte de los aislados que mostraron una capacidad temprana de promoción de crecimiento vegetal, 42, 56, 79 y 713 son  $\gamma$ .proteobacterias, siendo el aislado 350 el único probable perteneciente al filo *Firmicutes*. 3 de los 4 géneros encontrados en la orquídea ya habían sido reportados en otra especie de orquídeas epífitas y solo un aislado, *Lelliottia amnigenus*, no ha sido reportado hasta el momento con una bacteria asociada a la orquídea. De las 4 especies obtenidas solo una de ellas ha sido previamente reportada como productoras de giberelinas, *Pseudomonas fluorescens*, por lo que este podría ser el primer reporte de *Lelliottia amnigena*, *Pseudomonas synxantha* y *Strenotrophomonas maltophilia* como productoras de giberelinas con efecto de promoción de crecimiento vegetal en los primeros estadios vegetativos de plantas de maíz.

## 8. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un total de 1024 aislados bacterianos. El pseudobulbo fue el tejido mas colonizada para las plantas 1 y 2 y la hoja para las 2. Hay un mayor número de epífitos en flor.
2. Se identificaron 18 aislados bacterianos como productores de GAs de manera cualitativa.
3. Se determinó la producción de GA<sub>3</sub> o GA<sub>4</sub> en un rango de 1.2 a 3.4 ug, para los aislados 42, 56, 79, 147, 224, 291, 350 y 713 mediante HPLC-UV.
4. Los aislados productores de GAs 42, 56, 79, 350 y 713 tuvieron un efecto positivo sobre la elongación de la parte aérea en los primeros estadios de desarrollo de la planta.
5. Los aislados productores de GAs se asociaron a las siguientes especies bacterianas: *Pseudomonas fluorescens* (42), *Lelliottia amnigena* (56), *Pseudomonas synxantha* (79) y *Stenotrophomonas maltophilia* (713).
6. De acuerdo a sus características macro y microscópica se sugiere que el aislado 350 pertenece al género *Bacillus*.

## 9. PERSPECTIVAS

- Determinar la presencia de otras estructuras de giberelinas, además de GA<sub>3</sub> y GA<sub>4</sub> en el sobrenadante de los 18 aislados positivos a la prueba cualitativa de giberelinas mediante Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS).
- Probar todos los aislados con giberelinas bioactivas sobre la germinación de semillas de *Stanhopea tigrina*.
- Identificar *in silico* las enzimas putativas responsables la formación del *ent*-kaureno: *ent*-copalil difosfato sintetasa (CPS) y *ent*-kaurene sintetasa (KS). Sobre los aislados bacterianos productores de giberelinas bioactivas.
- Identificar *in silico* monooxigenazas del citocromo P450 (CPY) que pudiesen ser las responsables de las reacciones de oxigenación para la formación de giberelinas.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Amaresan, N., Jayakumar, V., Kumar, K., & Thajuddin, N. (2012). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annum*) seedling growth. *Annals of microbiology*, 62(2), 805-810.
2. Atzorn, R., Crozier, A., Wheeler, C. T., & Sandberg, G. (1988). Production of gibberellins and indole-3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta*, 175(4), 532-538.
3. Adékambi, T., Drancourt, M., & Raoult, D. (2009). The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in microbiology*, 17(1), 37-45.
4. Arditti, J. (1992). *Fundamentals of orchid biology*. John Wiley & Sons.
5. Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Bottini, R., & Baraldi, R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant growth regulation*, 24(1), 7-11.
6. Bottini, R., Cassán, F., & Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(5), 497-503.
7. Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D., & Pharis, R. P. (1989). Identification of gibberellins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology*, 90(1), 45-47.
8. Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608.
9. Brown, M. E. (1972). Plant growth substances produced by micro-organisms of soil and rhizosphere. *Journal of Applied Microbiology*, 35(3), 443-451.
10. Candau, R., Avalos, J., & Cerdá-Olmedo, E. (1992). Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant physiology*, 100(3), 1184-1188.
11. Cano, M. A. (2011). Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 14(2), 15-31.
12. Castillo, G., Ortega, G., Carabeo, V., Delgado, G., & Michelena, G. (2007). Determinación cualitativa de giberelinas y auxinas por cromatografía de capa fina. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 41(1).
13. Cox, L. (2013). Orquídeas: importancia y uso en México. *Bioagrobiencias*, 6(2), 4-7.
14. Cribb, P. J., Kell, S. P., Dixon, K. W., & Barrett, R. L. (2003). Orchid conservation: a global perspective. *Orchid conservation. Natural History Publications, Kota Kinabalu*, 1-24.

15. Escamilla, A. L. L., & Flores, G. P. (Eds.). (2007). *Simposio de biodiversidad y conservación de algunos recursos florísticos en el Estado de Hidalgo*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
16. Evans, H. J., & Burris, R. H. (1992). Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Chapman and Hall, 1-42.
17. Faria, D. C., Dias, A. C. F., Melo, I. S., & de Carvalho Costa, F. E. (2013). Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(2), 217-221.
18. Fassio, A. (1998). Maíz, aspectos sobre fenología, Alberto Fassio, Ana Inés Carriquiry, Cecilia Tojo, Ricardo Romero. *Serie técnica*. 101.
19. Fenollar, F., Roux, V., Stein, A., Drancourt, M., & Raoult, D. (2006). Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *Journal of clinical microbiology*, 44(3), 1018-1028.
20. Freuler, M. J. (2008). *Orquídeas*. Editorial Albatros.
21. Galdiano Júnior, R. F., Pedrinho, E. A. N., Castellane, T. C. L., & Lemos, E. G. D. M. (2011). Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35(3), 729-737.
22. Gerlach, G. (2009). Stanhopeinae Mesoamericanae, V. El aroma floral de las Stanhopeas de México. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 9(3), 431-442.
23. Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., R Tadeo, F., & Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111(2), 206-211.
24. Hasan, H. A. H. (2002). Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. *Rostlinna vyroba*, 48(3), 101-106.
25. Hershey, D. M., Lu, X., Zi, J., & Peters, R. J. (2014). Functional conservation of the capacity for ent-kaurene biosynthesis and an associated operon in certain rhizobia. *Journal of bacteriology*, 196(1), 100-106.
26. Hori, S. (1898). Some observations on 'Bakanae' disease of the rice plant. *Mem Agric Res Sta (Tokyo)*, 12, 110-119.
27. Jha, C. K., Aeron, A., Patel, B. V., Maheshwari, D. K., & Saraf, M. (2011). Enterobacter: role in plant growth promotion. In *Bacteria in agrobiolgy: Plant growth responses* (pp. 159-182). Springer Berlin Heidelberg.
28. Joo, G. J., Kang, S. M., Hamayun, M., Kim, S. K., Na, C. I., Shin, D. H., & Lee, I. J. (2009). Burkholderia sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. *The Journal of Microbiology*, 47(2), 167-171.

29. Kang, S. M., Waqas, M., Khan, A. L., & Lee, I. J. (2014). Plant-growth-promoting rhizobacteria: potential candidates for gibberellins production and crop growth promotion. In *Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses, Volume 1* (pp. 1-19). Springer New York.
30. Kang, S. M., Joo, G. J., Hamayun, M., Na, C. I., Shin, D. H., Kim, H. Y., ... & Lee, I. J. (2009). Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnology letters*, *31*(2), 277-281.
31. Kang, S. M., Khan, A. L., Hamayun, M., Hussain, J., Joo, G. J., You, Y. H., ... & Lee, I. J. (2012). Gibberellin-producing *Promicromonospora* sp. SE188 improves *Solanum lycopersicum* plant growth and influences endogenous plant hormones. *The Journal of Microbiology*, *50*(6), 902.
32. Kang, S. M., Khan, A. L., You, Y. H., Kim, J. G., Kamran, M., & Lee, I. J. (2014). Gibberellin production by newly isolated strain *Leifsonia soli* SE134 and its potential to promote plant growth. *J. Microbiol. Biotechnol*, *24*(1), 106-112.
33. Kang, S. M., Radhakrishnan, R., Lee, K. E., You, Y. H., Ko, J. H., Kim, J. H., & Lee, I. J. (2015). Mechanism of plant growth promotion elicited by *Bacillus* sp. LKE15 in oriental melon. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*, *65*(7), 637-647.
34. Kapoor, R., Soni, R., & Kaur, M. (2016). Gibberellins production by fluorescent *Pseudomonas* isolated from Rhizospheric soil of *Malus* and *Pyrus*. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, *9*(2), 193.
35. Kuan, K. B., Othman, R., Rahim, K. A., & Shamsuddin, Z. H. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PloS one*, *11*(3).
36. Kurosawa, E. (1926). Experimental studies on the nature of the substance secreted by the "bakanae" fungus. *Nat. Hist. Soc. Formosa*, *16*, 213-227.
37. Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S. M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., ... & Lee, I. J. (2014). Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology*, *52*(8), 689-695.
38. Lee, K. E., Radhakrishnan, R., Kang, S. M., You, Y. H., Joo, G. J., Lee, I. J., ... & Kim, J. H. (2015). *Enterococcus faecium* LKE12 Cell-Free Extract Accelerates Host Plant Growth via Gibberellin and Indole-3-Acetic Acid Secretion. *J. Microbiol. Biotechnol*, *25*(9), 1467-1475.
39. Loredó-Ostí, C., & Espindola-Victoria, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. *Terra Latinoamerica*, *22*(2), 225-239.
40. Martínez-Meyer, E., Sosa-Escalante, J. E., & Álvarez, F. (2014). El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección?. *Revista mexicana de biodiversidad*, *85*, 1-9.

41. Méndez, C., Baginsky, C., Hedden, P., Gong, F., Carú, M., & Rojas, M. C. (2014). Gibberellin oxidase activities in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *Phytochemistry*, 98, 101-109.
42. McKendrick, S. (2000). Manual para la germinación in vitro de Orquídeas. *Ceiba Fundación para la Conservación Tropical. Universidad San Francisco de Quito*.
43. Morales-García, Y. E., Juárez-Hernández, D., Aragón-Hernández, C., Mascarua-Esparza, M. A., Bustillos-Cristales, M. R., Fuentes-Ramírez, L. E., ... & Muñoz-Rojas, J. (2011). Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Rev Argent Microbiol*, 43(4), 287-293.
44. Moreno Martínez, D., & Menchaca García, R. A. (2007). Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación in vitro de *Stanhopea Tigrina* Bateman (Orchidaceae). *Foresta Veracruzana*, 9(2).
45. Morrone, D., Chambers, J., Lowry, L., Kim, G., Anterola, A., Bender, K., & Peters, R. J. (2009). Gibberellin biosynthesis in bacteria: Separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEBS letters*, 583(2), 475-480
46. Mukherjee, K., Mandal, S., Mukhopadhyay, B., Mandal, N. C., & Sil, A. K. (2014). Bioactive compound from *Pseudomonas synxantha* inhibits the growth of *Mycobacteria*. *Microbiological research*, 169(9), 794-802.
47. Nagel, R., Turrini, P. C., Nett, R. S., Leach, J. E., Verdier, V., Van Sluys, M. A., & Peters, R. J. (2017). An operon for production of bioactive gibberellin A4 phytohormone with wide distribution in the bacterial rice leaf streak pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *New Phytologist*, 214(3), 1260-1266.
48. Nett, R. S., Montanares, M., Marcassa, A., Lu, X., Nagel, R., Charles, T. C., ... & Peters, R. J. (2017). Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution. *Nature chemical biology*, 13(1), 69.
49. Patel, T., & Saraf, M. (2017). Exploration of Novel Plant Growth Promoting Bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* MTP42 Isolated from the Rhizospheric Soil of *Coleus forskohlii*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 6(11), 944-955.
50. Pathma, J., Kennedy, R. K., & Sakthivel, N. (2011). Mechanisms of fluorescent pseudomonads that mediate biological control of phytopathogens and plant growth promotion of crop plants. In *Bacteria in agrobiology: Plant growth responses* (pp. 77-105). Springer Berlin Heidelberg.
51. Pérez-Bravo, R., Salazar, G. A., & Mora-Guzmán, E. (2010). Orquídeas de Las Lomas-La Manzanilla, Sierra Madre Oriental, Puebla, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (87), 125-129.
52. Pierik, R. L. M. (1990). Producción de plantas libres de enfermedades In: PIERIK, RLM (Ed.) Cultivo in vitro de las plantas superiores. *Madrid: Ediciones Mundi-Pronsa*, 169-180.

53. Peng, J., Carol, P., Richards, D. E., King, K. E., Cowling, R. J., Murphy, G. P., & Harberd, N. P. (1997). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes & development*, *11*(23), 3194-3205.
54. Phillips, A. L. (1998). Gibberellins in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, *36*(1-2), 115-124.
55. Phinney, B. O. (1956). Growth response of single-gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *42*(4), 185-189.
56. Piccoli, P., Masciarelli, O., & Bottini, R. (1996). Metabolism of 17, 17 [2H<sub>2</sub>]-gibberellins A<sub>4</sub>, A<sub>9</sub> and A<sub>20</sub> by *Azospirillum lipoferum* in chemically-defined culture medium. *Symbiosis*.
57. Piccoli, P., Travaglia, C., Cohen, A., Sosa, L., Cornejo, P., Masuelli, R., & Bottini, R. (2011). An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. *Plant Growth Regulation*, *64*(2), 207-210.
58. Radhakrishnan, R., & Lee, I. J. (2016). Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, *109*, 181-189
59. Rasmussen, H. N. (1995). *Terrestrial orchids: from seed to mycotrophic plant*. Cambridge University Press.
60. Semarnat. Resumen Ejecutivo. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave, de Desempeño Ambiental y de Crecimiento Verde. Edición 2015. Semarnat. México. 2016
61. Shahzad, R., Waqas, M., Khan, A. L., Asaf, S., Khan, M. A., Kang, S. M., ... & Lee, I. J. (2016). Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *106*, 236-243.
62. Shimada, A., Ueguchi-Tanaka, M., Nakatsu, T., Nakajima, M., Naoe, Y., Ohmiya, H., ... & Matsuoka, M. (2008). Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature*, *456*(7221), 520-523.
63. Simmon, K. E., Croft, A. C., & Petti, C. A. (2006). Application of SmartGene IDNS software to partial 16S rRNA gene sequences for a diverse group of bacteria in a clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*, *44*(12), 4400-4406.
64. Srivastava, L. M. (2002). *Plant growth and development: hormones and environment*. Academic press
65. Sivasakthi, S., Kanchana, D., Usharani, G., & Saranraj, P. (2013). Production of plant growth promoting substance by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* isolated from paddy rhizosphere soil of Cuddalore district, Tamil Nadu, India. *International journal of microbiological research*, *4*(3), 227-233.
66. Soto-Arenas, M. A. y Solano-Gómez, A. R. 2007. Ficha técnica de *Stanhopea tigrina*. En: Soto-Arenas, M. A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de

- orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoin A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México. D.F
67. Souza, R. D., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology*, 38(4), 401-419.
  68. Swarts, N. D., & Dixon, K. W. (2009). Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. *Trends in plant science*, 14(11), 590-598.
  69. Tsavkelova, E. (2011). Bacteria associated with orchid roots. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses* (pp. 221-258). Springer Berlin Heidelberg.
  70. Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
  71. Téllez-Velasco, M. A. A. (2011). Diagnóstico de la familia Orchidaceae en México. *Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Edo. de México*.
  72. Wilkinson, K. G., Dixon, K. W., Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E. L. (1994). Effect of IAA on symbiotic germination of an Australian orchid and its production by orchid-associated bacteria. *Plant and soil*, 159(2), 291-295
  73. Yang, S., Zhang, X., Cao, Z., Zhao, K., Wang, S., Chen, M., & Hu, X. (2014). Growth-promoting *Sphingomonas paucimobilis* ZJSH1 associated with *Dendrobium officinale* through phytohormone production and nitrogen fixation. *Microbial biotechnology*, 7(6), 611-620
  74. Yanez, M. A., Catalan, V., Apraiz, D., Figueras, M. J., & Martinez-Murcia, A. J. (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), 875-883.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Preparación de Medios de Cultivo

#### Medio Nutritivo (NUT)

Componentes	Cantidad para 1 L
Caldo Nutritivo	8 g
Agar bacteriológico (para medio sólido)	15 g

Disolver los componentes en un litro de agua destilada y esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

#### Medio Luria-Bertani (LB)

Componentes	Cantidad para 1 L
Peptona de caseína	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar bacteriológico (para medio sólido)	15 g

Disolver los componentes en un litro de agua destilada y esterilizar a 15 lb durante 15 minutos.

#### Medio Mínimo enriquecido con sales y vitaminas (MM)

Componentes	Cantidad para 1 L
Base de medio	
Peptona de caseína	10g
Glucosa	10 g
Extracto de levadura	10 g
Agar bacteriológico (para medio sólido)	15 g
Sales	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.1 g/ml)	12 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.1 g/ml)	6.2 ml
CaCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O (0.01 g/ml)	5 ml
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O (0.1 g/ml)	2 ml
NaCl (0.1 g/ml)	1 ml
FeCl <sub>3</sub> * 6H <sub>2</sub> O (0.001 g/ml)	1 ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.0001 g/ml)	50 µl
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O (0.1 mg/ml)	50 µl
MnSO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O (0.1 mg/ml)	100 µl
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O (0.1 mg/ml)	100 µl
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (0.1 mg/ml)	100 µl
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O (0.1 mg/ml)	700 µl
CaCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O (0.1 mg/ml)	50 µl

Vitaminas	
Vitaminas del complejo B (tribedoce)	250 mL

Para la preparación del medio primero se disuelve los componentes de la base y se afora a 1 L con agua destilada, por otro lado se preparan los stocks de las sales que se adicionaran al medio y se esterilizan por separada la base y las sales a 15 lb durante 15 minutos. Después de esterilizar se atempera los componentes lo suficiente para manipularlos sin que se solidifique la base (en caso de prepara medio sólido) y se adicionan las sales. Finalmente, cuando podamos sostener el medio con las manos desnudas, se adicionan las vitaminas.

### Medio ICI (Candau *et al*, 1992)

Componentes	Cantidad para 1 L
Glucosa	10 g
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	2 ml
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	50µl
Solución trazas	50 µl

Para la preparación del medio se disuelven los componentes en agua destilada (excepto la solución de trazas). Después se esteriliza el medio y la solución de trazas por separado a 15 lb durante 15 minutos, finalmente se adiciona la solución de trazas al medio.

Solución de trazas (100 mL): FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0.1g, CuSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 0.015 g, ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0.161g, MnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0.01g, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>\*24H<sub>2</sub>O 0.01g

### Medio Czapek

Componentes	Cantidad para 1 L
Peptona de caseína	10g
Glucosa	10 g
NaNO <sub>3</sub>	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.01 g

Se disuelven todos los componentes en agua destilada y se ajusta el pH a 5 con una solución de HCl 2M y después se esteriliza a 15 lb durante 15 minutos.

### Anexo 2. Valores de los parámetros promedios en Invernadero (experimento piloto).

Invernadero	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Iluminancia (lx)
Mañana	21 ± 3.6	43.3 ± 13.8	11,927 ± 9717



Mediodía	34.4 ± 4.1	17.6 ± 5.6	37,267 ± 3,057
Tarde	37.1 ± 5.6	13.0 ± 4.4.	16,533 ± 9,820

**Anexo 3. Valores de los parámetros promedios en cámara de crecimiento (experimento piloto).**

Cámara de crecimiento	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Iluminancia (lx)	
			Izquierda	Derecha
Mañana	32.1 ± 3.1	24.4 ± 5.7	2,953± 261	2,000 ± 24
Mediodía	35.1 ± 1.0	17.9 ± 3.9	2,870 ± 268	1,990± 248
Tarde	35.2 ± 2.0	14.4 ± 2.4	3,087 ± 189	2,027 ± 75

**Anexo 4. Longitud de la parte aérea de plántulas en cámara de crecimiento.**

Estadio Vegetativo	V1			V2			V3			V4		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>Aislado</b>												
<b>42</b>	20	18	14	30	28	26.5	44	44	43	50	44	50
<b>56</b>	17	18	13.5	35	29	26	47	55	30	60	45	53
<b>79</b>	15	13.5	14.5	24	28	26	38	44	38	50	59	57
<b>147</b>	12.5	12	9.5	22	19	17	39	46	33	55	55	52
<b>224</b>	12	12	10	23	23.5	24	37	47	45	39	44	48
<b>291</b>	12	12	9.5	26	18	18.5	45	28	33	46	52	49
<b>350</b>	20	19	15.5	27	27	28	39	25		51	45	34
<b>713</b>	14	15.5	17	31	26	27	41	41	42	41	55	42
<b>C (-)</b>	11.5	10.5	9.5	20	20	21	41	44	44	44	44	43
<b>C (+)</b>	11.5	18	14	32	28	36	58	51	47	57	59	61

**Anexo 5. Longitud de la parte aérea de plántulas en invernadero.**

Fecha (E.V.)	16-08-17 (V1)			21-8-17 (V2)			24-08-17 (V3)			1-09-17 (V4)		
Tratamiento	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>42</b>	7.5	8	8	17	18	15.5	22.5	24	19	25	17	31
<b>56</b>	8.5	8.5	8	18	16	18.5	24	20.5	24.5	30	32	16
<b>79</b>	9	8.5	8.5	18	19	15	24	26	17	18	16	19
<b>147</b>	7	7.5	7.5	15	15.5	14	22	22	19	29	25	17
<b>224</b>	7	6	6.5	17.5	12.5	10.5	24	16	15	31	26	26
<b>291</b>	5	5.5	6.5	13	13	12	19	18	16.5	31	26	26
<b>350</b>	8	8	9	15	15.5	16	20	22	22	30	29	19
<b>713</b>	9.5	9	9.5	18	16	20	25	21	26	34	31	34
<b>Control negativo</b>	7.5	6	5	15	14.5	11	21.5	20	15	17	28	28
<b>Control positivo</b>	11	11.5	10	27	26	30	43	40	45	68	55	78

**Anexo 6. Valor de P.** Se muestran los valores de P de las mediciones de la parte aérea durante los diferentes estadios vegetativos en condiciones de cámara de crecimiento.

Estadio vegetativo	Valor de P	Diferencia significativa entre las medias	Prueba de Dunnett (Tratamiento diferente/valor de P)
$\alpha=0.05$			
V1	0.0006	Si	42/0.0038 56/0.0181 350/0.0012 713/0.0428
V2	0.0001	Si	Control positivo/0.0004 42/0.0180 56/0.0030 350/0.0394 713/0.0212
V3	0.1342	No	-

**Anexo 7. Valor de P.** Se muestran los valores de P de las mediciones de la parte aérea durante los diferentes estadios vegetativos en condiciones de invernadero.

Estadio vegetativo	Valor de P	Diferencia significativa entre las medias	Prueba de Dunnett (Tratamiento diferente/valor de P)
$\alpha=0.05$			
V1	<0.0001	Si	Control positivo/0.0001 42/0.0221 56/0.0024 79/0.0005 350/0.0024 713/0.0001
V2	<0.0001	Si	Control positivo/0.0001 713/0.0407
V3	<0.0001	Si	Control positivo/0.0001

**Anexo 8.** Valores obtenidos al finalizar el experimento en V4 en plantas de maíz crecidas en invernadero (P. peso).

Invernadero		Parte aérea			Raíz		
Tratamiento	Repetición	Longitud	P. fresco	P. seco	Longitud	P. fresco	P. seco
42	1	34	3.6	0.41	50	7.77	0.8
	2	29	3.99	0.47	31	7.64	0.77

	3	20	2.42	0.3	26	7.69	0.88
	4	36	4.24	0.52	36	8.16	0.76
	5	20	2.82	0.31	23	7.65	0.91
	6	35	4.96	0.6	46	8.88	0.84
	7	35	3.82	0.43	41	9.05	0.85
56	1	20	3.31	0.38	30	7.73	0.91
	2	35	4.94	0.54	38	9.18	1.06
	3	32	3.78	0.41	36	11.54	1.48
	4	18	1.88	0.2	42	6.63	0.75
	5	34	4.01	0.46	37	8.23	1.1
	6	27	3.57	0.44	40	9.45	1.16
	7	20	2.94	0.33	33	8.25	0.9
79	1	20	3.42	0.41	20	8	0.87
	2	35	4.19	0.48	40	11.26	1.2
	3	19	2.73	1.32	28	8.56	0.9
	4	33.5	4.1	0.5	34	7.34	0.79
	5	32	3.4	0.43	37	6.86	0.8
	6	20	2.72	0.32	29	6.43	0.7
147	1	27	2.43	0.35	33	4.9	0.66
	2	30	5.07	0.6	51	8.41	1.4
	3	29	3.24	0.4	49	8.51	1.28
	4	19	2.13	0.23	37	6.1	0.9
	5	19	2.73	0.31	34	10.86	1.7
	6	30	4.34	0.52	47	7.33	1.34
	7	31	4.06	0.54	28	6.66	0.9
224	1	34	4.57	0.51	33	7.67	0.96
	2	30	3.37	0.36	41	8.88	1.43
	3	32	3.45	0.38	55	8.2	1.01
	4	33	3.43	0.4	40	6.53	0.81
	5	21	3.47	0.4	40	11.71	1.8
	6	32	4.06	0.49	41	7.97	1.02
	7	19	3	0.35	45	7.42	0.99
291	1	19	2.08	0.23	41	5.85	0.9
	2	30.5	3.69	0.42	43	8.43	1.54
	3	29	3.45	0.4	43	9.27	1.69
	4	30	4.57	0.51	32	8.74	1.86
	5	27	2.75	0.3	46	6.26	1.14
	6	28	2.79	0.32	25	8.46	1.74
	7	18	1.89	0.25	32	8.33	1.6
350	1	18	1.73	0.21	28	7.1	0.88
	2	18	1.96	0.23	33	8.45	1.17

	3	19	2.36	0.25	35	7.08	0.78
	4	32	3.87	0.47	36	10.79	1.52
	5	19	2.38	0.28	35	7.32	0.93
	6	30	2.87	0.33	49	7.51	0.82
	7	27.5	2.92	0.32	45	6.49	0.7
713	1	20	2.56	0.3	37	6.9	0.84
	2	24	3.46	0.39	40	6.81	0.86
	3	30.5	3.83	0.46	35	8.4	1.02
	4	31.5	3.6	0.41	41	7.64	1.07
	5	35	4.5	0.52	42	9.22	1.33
	6	36	4.52	0.57	32	7.63	0.9
	7	35	3.91	0.58	35	7.03	0.94
C. negativo	1	18	2.29	0.25	40	9.32	2.11
	2	21.5	2.5	0.23	42	7.02	1.14
	3	16	1.86	0.2	31	7	1.6
	4	30	3.53	0.43	42	6.71	1.2
	5	30	3.43	0.41	43	7.78	1.42
	6	30	3.15	0.36	43	6.62	1.3
	7	30	3.46	0.35	36	6.12	1.15
0.2 mM GA3	1	58	4.57	0.43	20	3.85	0.68
	2	60	6.65	0.66	42	7.34	1.79
	3	73	7.59	0.72	46	3.04	0.66
	4	51	3.74	0.31	30	3.53	0.65
	5	60	4.61	0.4	25	4.59	1.03
	6	66	3.61	0.45	48	3.11	0.43
	7	68	4.86	0.48	41	6.66	1.66
	8	71	4.35	0.46	43	3.01	0.51
	9	56	3.52	0.48	37	3.76	1.04

**Anexo 9.** Valores obtenidos al finalizar el experimento en V4 en plantas de maíz crecidas en cámara de crecimiento (P. peso).

Cámara de crecimiento		Parte aérea			Raíz		
Tratamiento	Repetición	Longitud	P. fresco	P. seco	Longitud	P. fresco	P. seco
42	1	52	1.71	0.2	22	0.59	0.15
	2	45	2.03	0.16	31	0.83	0.19
	3	52	1.74	0.15	16	0.53	0.1
	4	53	2.28	0.22	30	0.6	0.24
	5	46	1.45	0.14	14	0.35	0.11
56	1	54	1.57	0.15	27	0.74	0.18

	2	37	1.36	0.12	22	0.46	0.12
	3	48	1.52	0.18	28	0.43	0.15
	4	67	3.13	0.29	29	0.76	0.24
	5	52	1.97	0.21	33	0.6	0.19
79	1	62	2.41	0.19	21	0.69	0.14
	2	45	1.18	0.1	21	0.5	0.14
	3	60	2.86	0.24	27	10	0.25
	4	42	1.92	0.14	21	0.9	0.21
	5	51	1.64	0.19	36	0.61	0.19
147	1	47	1.71	0.1	26	0.75	0.21
	2	49	2.01	0.16	29	0.95	0.24
	3	36	1.92	0.17	30	0.66	0.2
	4	51.5	2.52	0.23	30	1.03	0.2
	5	58	2.09	0.14	23	0.95	0.22
224	1	47	1.8	0.16	20	0.84	0.2
	2	47	2.53	0.27	31	1.26	0.39
	3	31	1.8	0.13	30	0.82	0.24
	4	56	2.55	0.23	28	0.9	0.23
	5	42	1.84	0.13	18	0.86	0.22
291	1	50	2.37	0.21	55	0.86	0.23
	2	50	1.68	0.13	25	0.85	0.15
	3	45	1.67	0.13	25	0.79	0.15
	4	47	1.82	0.13	24	1.12	0.29
	5	44	1.58	0.12	41	0.69	0.18
350	1	36	2.05	0.15	25	0.79	0.23
	2	51	2.06	0.17	20	0.65	0.14
	3	47	1.31	0.14	22	0.41	0.09
	4	53	1.92	0.17	22	0.73	0.14
	5	34	1.04	0.08	24	0.36	0.09
713	1	50	1.54	0.12	21	0.64	0.12
	2	50	1.86	0.17	35	0.83	0.23
	3	37	1.94	0.13	24	1.06	0.23
	4	58	2.1	0.2	30	0.79	0.21
	5	38	1.64	0.12	33	0.81	0.13
Control negativo	1	49	1.67	0.14	34	0.68	0.18
	2	48	1.65	0.16	50	0.68	0.2
	3	50	1.86	0.18	25	0.49	0.19
	4	45	1.46	0.12	29	0.79	0.17
	5	47	3.01	0.2	16	0.84	0.14
0.2 mM GA3	1	55	2.87	0.25	23	1.83	0.29
	2	58	1.72	0.14	24	0.54	0.13

	3	57	2.51	0.21	26	0.85	0.1
	4	58	1.6	0.12	17	0.61	0.12
	5	61	1.73	0.12	31	0.57	0.08
	6	60	2.61	0.24	39	0.63	0.1
	7	60	2.09	0.21	26	0.74	0.26




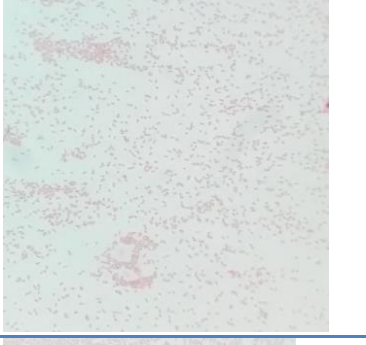

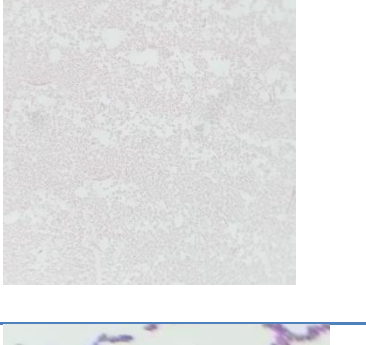


**Anexo 10. Valor de P.** Se muestran los valores de P calculados para cada parámetro medido en condiciones de cámara de crecimiento.




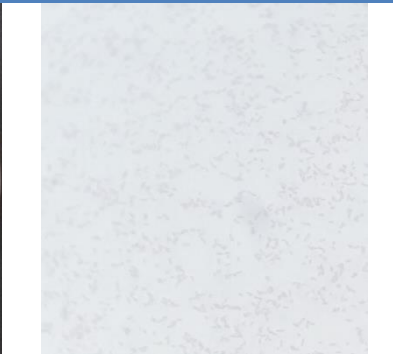


Parámetro medido	Valor de P	Diferencia significativa entre las medias
$\alpha=0.05$		
Longitud aérea	0.05	No
Peso fresco aéreo	0.8453	No
Peso seco aéreo	0.7039	No
Longitud raíz	0.4203	No
Peso fresco raíz	0.4659	No
Peso seco raíz	0.1058	No

**Anexo 11. Valor de P.** Se muestran los valores de P calculados para cada parámetro medido en condiciones de invernadero.

Parámetro medido	Valor de P	Diferencia significativa entre las medias	Prueba de Dunnett (Tratamiento diferente/valor de P)
$\alpha=0.05$			
Longitud aérea	<0.0001	Si	Control positivo/0.0001
Peso fresco aéreo	0.0011	Si	Control positivo/0.0006
Peso seco aéreo	0.0367	Si	79/0.0173
Longitud raíz	0.4927	No	-
Peso fresco raíz	<0.0001	Si	Control positivo/0.0013
Peso seco raíz	0.0016	Si	Control positivo/0.0262 42/0.0069 79/0.0217

**Anexo 12. Características macroscópicas y microscópicas de los aislados productores de giberelinas.**

Número de aislado	Clave	Tinción de Gram	Morfología	Microscopia
56	3RX-2-LB(5)	Bacilos Gram(-)		
42	3RX-DIR-NUT(1B)2	Cocobacilos Gram(-)		
79	3RX-2-NUT(6)	Cocobacilos Gram(-)		
147	2RX-2-LB(3B)1	Cocos Gram(+)		

224	1TY- DIR- LB(1A) 2	Bacilos Gram(-)		
291	3TY- DIR- LB(2)	Bacilos Gram(-)		
350	1SX-4- NUT(1 7A)	Bacilos Gram(+)		
713	1FX- DIR- NUT(6 B)	Bacilos Gram(-)	