



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

PROMOCION DEL CRECIMIENTO DE
Laelia speciosa MEDIADO POR
BIOFERTILIZACION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A

P R E S E N T A:
FLOR DE LIRIO LOPEZ URIBE



DIRECTOR DE TESIS: Dr. GUILLERMO CARRILLO CASTAÑEDA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MEX. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Para mi esposo José Luis Viveros, cuya inteligencia y bondad me enseñó que los proyectos que podrían parecer imposibles no lo son, solo requieren de más esfuerzo y la terminación de uno de los objetivos que forma una parte importante de nuestro proyecto de vida.

A mi madre Eulalia Uribe Olvera, Mardonio López Díaz y abuelos Tomasa Olvera y Federico Uribe Vásquez por enseñarme a amar esta carrera.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guillermo Carrillo Castañeda, por su consejo y profesionalismo, que me impulso a seguir en la realización y terminación de esta tesis, además de darme la oportunidad de trabajar conjuntamente en el Laboratorio de Genética del Colegio de Posgraduados Montecillo y la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Un reconocimiento especial al Dr. Ignacio Peñalosa Castro por el tiempo brindado para este trabajo.

M. en C. Leonor Ana María Abundiz Bonilla., Lic. Marcial García Pineda y M. en C Alberto Arriaga Frías, que hicieron las correcciones pertinentes a esta tesis.

A José Luis Viveros Legorreta por ayudarme en la planeación de objetivos, método y técnicas, por su apoyo moral y económico.

A mi madre Eulalia Uribe Olvera y padre Mardonio López Díaz cuya fortaleza e inteligencia me han impulsado para ser una mejor persona tanto profesionalmente como personalmente. Por su apoyo moral y económico.

A mi hermana Violeta que siempre tiene un pensamiento racional y positivo para conmigo, con sus logros y actitudes.

A mis amigos Augusto, Iliana, Liliana, Maricela que convivieron conmigo durante la carrera.

Índice

	Página
Índice.....	I
Índice de figuras.....	II
Resumen.....	III
Introducción.....	1
Objetivos.....	4
Revisión de literatura.....	5
<i>Laelia speciosa</i>	5
Tipos de sustratos.....	5
PGPR.....	6
Auxinas.....	8
Biofertilización.....	9
El género <i>Pseudomonas</i>	9
El género <i>Bacillus</i>	11
El género <i>Serratia</i>	12
Materiales y Método.....	13
Resultados.....	16
Discusión.....	23
Conclusiones.....	25
Referencias.....	27

Índice de figuras

	Página
Figura 1 Ubicación geográfica del municipio de Ajacuba.....	13
Figura 2 Niveles de IAA libre acumulados en las raíces frescas de las plantas...	18
Figura 3 Niveles de IAA conjugado acumulados en las raíces frescas de las plantas.....	18
Figura 4 Perfil de concentración de clorofila a en los lotes de plantas indicados. La determinación de clorofila se llevó a cabo a los 373 días de desarrollo de las plantas (mg/g).....	19
Figura 5 Perfil de concentración de clorofila b en los lotes de plantas indicados. La determinación de clorofila se llevó a cabo a los 373 días de desarrollo de las plantas (mg/g).....	19
Figura 6 Patrón de desarrollo de las hojas (longitud). Las determinaciones fueron realizadas a los 197 días de cultivo.....	20
Figura 7 Patrón de desarrollo de las hojas de las plantas, despues de 197 días como se indica. crecimiento en mm en el diametro de la hoja.....	21
Figura 8 Desarrollo del bulbo (longitud) en mm de plantas desarrolladas como se indica. Las determinaciones fueron llevadas a cabo a los 197 días.....	21
Figura 9 Desarrollo del bulbo (diametro) en mm de plantas desarrolladas como se indica. Las determinaciones fueron llevadas a cabo a los 197 días de cultivo.	22

INTRODUCCION

Las plantas ornamentales en México son un recurso económico importante. A nivel local alrededor de 2, 673,230 toneladas son producidas equivalentes a \$37, 287,600.00 y a nivel nacional alrededor de 1 145, 670 toneladas equivalentes a \$ 15, 980,400.00, lo que corresponde a 1.66% de la producción nacional en el 2003.

De las más de 160 especies cultivadas, las de mayor preferencia son las que se pueden producir todo el año y con un ciclo vegetativo corto (tres meses), como: el geranio, rosa, crisantemo, belén, entre otras. México es un país rico en diversidad y podrían incluirse otros organismos dentro de esta categoría de ornamentales, aunque no tengan un ciclo de vida corto.

Dentro de estas plantas ornamentales se encuentra la familia *Orchidaceae*, que es una de las más grandes dentro de todas las plantas que producen flores; constituyendo un importante recurso para la creciente industria en nuestro país, ya que es una familia muy diversa, comprende entre 650 géneros y 1106 a 1300 especies (Salazar, 2007). Del total de las especies el 35% son endémicas en México, como el caso de las del género *Laelia*, que son once y que se encuentran en una gran variedad de hábitats ecológicos.

En las distintas regiones ecológicas se han cultivado tradicionalmente especies como: *L. albida*, *L. anceps*, *L. gouldiana*, *L. autumnalis*, *L. furfuracea*, y *L. speciosa*; debido al alto valor que se le atribuye, las flores se han utilizado durante siglos, como parte de las ofrendas en las festividades de día de muertos; en cambio, otras especies que florecen en distintos meses del año, están relacionadas con festividades religiosas. Por esta razón es uno de los taxa más vulnerable, básicamente por la destrucción de sus hábitats y uso comercial, debido a su estructura floral (Santos *et al.*, 2006).

La estructura de la flor en las orquídeas es compleja, el cáliz está compuesto de tres sépalos, la corola de tres pétalos internos, dos de ellos laterales y simétricos y uno posterior de forma variable llamado labelo, que puede ser entero, lobulado o dentado.

El androceo y el gineceo están unidos, formando una columna en cuyo ápice se localiza la antera con la polinia, el ovario es ínfero y las semillas son producidas en los frutos

(capsulas dehiscentes que contienen miles de semillas). Las semillas son muy pequeñas y el embrión, al carecer de suficientes reservas nutritivas, depende de la relación simbiótica con un hongo, que en muchos de los casos es también muy particular de cada especie, el establecimiento de la simbiosis con un hongo micorriza es crucial para la supervivencia y desarrollo de la semilla, pues este le abastecerá de nutrientes y azúcares hasta que la plántula sea capaz de generar su propio alimento, además de que acelera el proceso de germinación. Estudios actuales demuestran que algunas especies de orquídeas dependen enteramente del hongo durante toda su vida como fuente de carbono (Munguía, et al. 2005).

Por esta razón, aunque para orquídeas terrestres ha habido avances en cuanto a la germinación simbiótica, los avances para epifitas son pocos. Una manera exitosa de propagación para estas especies es el cultivo *in vitro* o propagación asimbiótica (Santos *et al.*, 2006). El cultivo asimbiótico de orquídeas a partir de semillas, requiere una inversión de tiempo muy importante, además de las complicaciones que se tienen durante este proceso, por ello se ha buscado la forma de contribuir al desarrollo de estas plantas, para su cultivo post *in vitro* en invernadero, por medio de sustratos, ya que la búsqueda de un sustrato de fácil obtención, económico y adecuado para cada especie es de suma importancia, debido al ciclo de vida y uso local que se les da a estas flores, ya que son organismos que se colectan y no se cultivan, dejándose de encontrar de manera silvestre.

Para seleccionar el tipo, cantidad y tamaño del sustrato a utilizar, las raíces son un indicador. Se pueden dividir en dos categorías: orgánicos e inorgánicos. De los considerados propicios para el género *Laelia* son: corteza de pino, *Cyatea* sp. llamado comúnmente maquique, roca volcánica roja o tezontle (en México funciona con géneros de importancia económica), *Prosopis* para especies de *L. Brassavola*, entre otros. Se ha propuesto que el tamaño de los fragmentos a utilizar varíe con la proporción de la raíz.

Además del tipo de sustrato se han buscado otras formas de contribuir a su desarrollo, ya que en las orquídeas el desarrollo y germinación de plántulas es notablemente diferente de otras plantas con flor; estructuralmente hay dos grupos de semillas de orquídeas que pueden ser distinguidos, un pequeño número de especies que tienen relativamente embriones diferenciados, incluyendo un cotiledón rudimentario como:

Sobralia macrantha y *Bletilla hyacinthina* y el mayor grupo de especies que tienen semillas indiferenciadas sin endospermo ni cotiledones.

La materia de reserva está almacenada en el embrión. Las pequeñas semillas (que usualmente miden 1 mm de longitud) aumentan de volumen antes de que el embrión rompa la cubierta, formando en su parte superior un cono cóncavo llamado protocormo. En condiciones naturales permanece en este estadio, hasta que el protocormo es infectado en su parte medio basal por un hongo endofítico apropiado, después de la infección los ápices producen las primeras hojas y tiempo después las primeras raíces. (Harrison, 1977; Arditti, 1967).

Los reguladores de crecimiento son sustancias orgánicas que controlan procesos del desarrollo vegetal, además de la quiescencia, florecencia y frutos (Tsavkelova *et al.*, 2006).

Considerando la clasificación convencional, hay 5 grupos de reguladores: ácido abscísico, etileno, giberelinas, citocinas y auxinas (Taylor *et al.*, 2006). La auxina natural más activa es el ácido indolacético (AIA) (Castillo *et al.*, 2005; Tsavkelova *et al.*, 2005 y 2007).

Como se ha mencionado, las orquídeas establecen relaciones simbióticas con hongos micorrizicos de manera natural, cuyos efectos positivos son demostrados. De manera similar las bacterias se han utilizado para promover el desarrollo de las plantas. La inoculación con bacterias promotoras de crecimiento es una aplicación biotecnológica reciente y prácticamente desconocida en orquídeas, ya que en la mayoría de los casos la utilización de la capacidad de algunos microorganismos, se ha empleado solo en la producción agrícola.

El término PGPR (Microorganismos bacterianos promotores del desarrollo de las plantas) se conoce desde 1978 y se acepta para describir a las bacterias que habitan en la rizosfera y que pueden tener un efecto positivo (Hernández y Chailloux, 2001; Carrillo *et al.*, 2007).

La síntesis de la auxina AIA se ha encontrado en microorganismos de los géneros *Pseudomonas* especies *P. putida* y *P. fluorescens*, *Rizhobium*, *Bacillus*, entre otros.

El efecto de los mecanismos de las bacterias puede ser descrito como directo e indirecto. El efecto directo consiste en el aumento de la movilización de nutrientes solubles como: nitrógeno, fosforo y potasio; seguido por el mejoramiento de absorción de las plantas, producción de antibióticos y reguladores de crecimiento (Díaz, *et al.*, 2001, Castro, 2007).

Los efectos indirectos incluyen el aumento en la fijación de nitrógeno (al mejorar el número de nódulos de la raíz) y de la actividad de nitrogenasa, la cual induce la resistencia sistémica en la planta (Díaz *et al.*, 2003; Liu, 2006; Ahmad *et al.*, 2008).

Durkhead *et al.*, (1995) describió que *P. fluorescens* y *P. putida* pueden colonizar un amplio rango de cultivos y son antagonistas de varios patógenos que se encuentran asociados a las raíces como: *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, y *Sclerotium*.

Las aplicaciones que se les han dado a estos compuestos son muy diversas y su utilización actual es frecuente y en continuo aumento. La industria proporciona reguladores que en general se obtienen por síntesis química; pero se enfrentan a problemas ambientales y los costos son elevados; por lo tanto existe un interés en sustituir a los reguladores de crecimiento sintéticos (Cura *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2005; Karlidag *et al.*, 2007).

Objetivos

El objetivo general en el presente estudio fue determinar el papel que juegan las células bacterianas del género y especies: *Bacillus sp* cepa 5-R-8, *Serratia sp.* y *P. fluorescens* cepa Cavm en el desarrollo de plantas de *L. speciosa* cuando las raíces de las plantas son inoculadas, así como el tipo de sustrato donde son desarrolladas. El desarrollo es determinado mediante el análisis del número de bulbos y hojas, así como la acumulación de ácido indolacético (AIA) y clorofila a y b en las hojas.

RESUMEN

La familia *Orchidaceae* ha sido una de las más vulnerables por la destrucción y transformación de sus hábitats, por la extracción masiva de plantas de las poblaciones silvestres, dado su alto valor hortícola y comercial. El género *Laelia speciosa*, es ampliamente colectado y esta colocado dentro de la categoría de riesgo vulnerable, ya que en áreas sobreexplotadas prácticamente ya no se establecen nuevas. Se han buscado estrategias que puedan ayudar al crecimiento y desarrollo de las plantas, como tipos de sustrato que además de ser adecuados para esta especie sean de fácil obtención y económicos y la identificación de microorganismos que colonizan la superficie de la rizosfera, que al producir fitohormonas u otros compuestos que le sirven a la planta promueven su desarrollo. Éstos son conocidos como microorganismos bacterianos promotores del desarrollo de las plantas (PGPR).

El objetivo general en el presente estudio fue determinar el papel que juegan las células bacterianas del género y especies: *Bacillus* cepa 5-R-8, *Serratia* sp. y *Pseudomonas fluorescens* cepa Cavm en el desarrollo de *L. speciosa* cuando las raíces de la planta son inoculadas, así como el tipo de sustrato donde las plantas son desarrolladas. El desarrollo fue determinado mediante el análisis del número de bulbos y hojas, así como la concentración de ácido indolacético (AIA) y clorofila a y b en las hojas.

Las raíces de las plantas inoculadas con la suspensión de células bacterianas de *P. fluorescens* Cavm presentaron mayor concentración de AIA libre, en comparación con las muestras sin inóculo. No hubo niveles detectables para la raíces con células bacterianas de la especie *B. 5-R-8*.

Menor concentración de AIA conjugado y clorofila a, se obtuvo para las inoculadas con las tres suspensiones bacterianas y solo una mayor concentración de clorofila b con *P. fluorescens* Cavm y *B. 5-R-8*.

Planteamiento del problema

Las aplicaciones que se les han dado a estos compuestos son muy diversas y su utilización actual es frecuente y en continuo aumento. La industria proporciona reguladores que en general se obtienen por síntesis química; pero se enfrentan a problemas ambientales y los costos son elevados; por lo tanto existe un interés en sustituir a los reguladores de crecimiento sintéticos (Cura *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2005; Karlidag *et al.*, 2007).

2. REVISION DE LITERATURA

Laelia speciosa

Especie endémica de México, se distribuye en las montañas del eje volcánico transversal, en los estados de: Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luís Potosí, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Michoacán, Hidalgo, Guerrero y Estado de México. Es una especie fragante, con requerimientos de media sombra, en altitudes de 1400 a 2400 m. y con rango de temperaturas desde 15° a 29 ° C.

Es una orquídea epífita, con altura de 15 a 30 cm, rizoma corto, pseudobulbo subgloboso a ovoide, formado por 3 entrenudos, de 3 a 6 cm de longitud y de 1.5 a 3 cm de grosor, cubiertos con vainas escariosas. Inflorescencia emergida del brote en desarrollo de 15 a 20 cm de longitud, pedúnculo corto y delgado de 1 a 3 mm de ancho. Produce flores grandes de 10 a 16 cm de diámetro, sépalos y pétalos de color rosa a rosa púrpura, labelo blanco con márgenes de color y rayas púrpuras variables (florece de mayo a junio). El fruto es una capsula elipsoide de 4 a 6 cm longitud con 2 a 3 cm de grosor. Crece sobre distintas especies de árboles especialmente sobre *Quercus* (www.orchidspecies.com).

Se ha incluido a esta especie en la norma oficial vigente P R O Y-N O M- 0 5 9 -E C O L- 2 0 0 0, sujeta a protección especial (Santos, *et al.*, 2006).

2.1 TIPOS DE SUSTRATO

Entre los materiales orgánicos utilizados como sustrato se encuentran aquellos que se han originado de alguna forma viva como: troncos o cortezas (grises y rugosas) de árboles tropicales, corcho, musgo (*Sphagnum*), raíz de helecho (*Cyatea sp.*), caña de azúcar, cascarilla de arroz, espuma de polietileno, incluso sea empleado el centro de la mazorca de maíz; en cuanto a su empleo como medio de cultivo, la corteza de coco o la fibra extraída de ella es una de las mejores alternativas, debido a su estructura porosa, textura consistente y uniforme que permite la fácil penetración de las raíces de la planta y un desarrollo saludable de esta.

El carbón, es el segundo material más utilizado que se adiciona a las mezclas, debido a su absorción de impurezas y residuos de fertilizantes.

Los materiales orgánicos a diferencia de los inorgánicos se deterioran y descomponen, en este proceso liberan nutrimentos a la planta. Con el tiempo el tamaño de la partícula es cada vez más reducido, lo que conlleva a problemas de aireación y drenaje. El material no debe ser fresco, ya que en su proceso de envejecimiento, liberan sustancias nocivas para las raíces y adicionalmente pueden atraer a insectos.

Entre los inorgánicos o inertes se pueden citar: la roca volcánica negra o roja (tezontle), piedra pómez, pedacera de tejas de barro cocido o macetas, arena de río, vermiculita (mica mineral; ligera y porosa que absorbe los nutrientes de los fertilizantes y los libera gradualmente), perlita (ceniza mineral volcánica; inerte, ligera), la cual permite una mejor condición de aireación en la mezcla, entre otros.

Los materiales inorgánicos no se descomponen, ni liberan nutrimentos a la planta, por ello se requiere de la aplicación de fertilizantes cada año, además de lavarlo para eliminación de carbonatos y bicarbonatos retenidos.

En cuanto el tamaño de las partículas del medio, se ha sugerido que sea de acuerdo al tamaño de la raíz. Así, se ha recomendado para plantas jóvenes, que presenten un sistema radical frágil o raíces delgadas, utilizar partículas con tamaño de $\frac{1}{4}$ (grado de plántula o grado fino); de tamaño medio se recomienda un tamaño de partícula de $\frac{1}{2}$ (grado medio). Para orquídeas grandes como *Catleya* se utiliza el tamaño de $\frac{3}{4}$ (grado grueso o grande).

2.2 Microorganismos bacterianos promotores del desarrollo de las plantas (PGPR)

Las bacterias que son capaces de colonizar la raíz son llamadas rizobacterias. Las interacciones entre bacteria-planta pueden ser distinguidas en patogénicas, simbióticas o mutualistas (Van, 1995). Estas interacciones son inducidas a la colonización, debido al rango de compuestos presentados en exudados de la raíz (Gray y Smith 2005).

Los exudados de la raíz consisten principalmente en: carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas y aminoácidos (García, 2004; Podile y Kishore, 2006; Castro, 2007). Las

cantidades y composiciones de estos metabolitos varían. Los requerimientos de nutrientes de la bacteria en cierta forma explica, cual tipo de bacteria tiene capacidad de colonizar cierto tipo de plantas de manera específica; influenciada por factores genéticos, tipo de sustrato, bacterias nativas y factores abióticos como: la humedad, pH y la temperatura. Las bacterias que colonizan pueden alterar la composición y cantidad de los exudados (Nano, 2003).

Se conoce un gran número de bacterias de vida libre o asociativa que fijan nitrógeno atmosférico, pero solo algunos destacan por su potencial como biofertilizantes o promotoras de crecimiento. Entre los géneros más conocidos dentro del grupo de los microorganismos aerobios están *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexia* y *Azospirillum*; dentro de las aerobias facultativas se presenta: *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*; y los géneros de bacterias anaerobias: *Metanobacterium*, *Clostridium*, *Desulfovibrio* y *Serratia* (Raaijmakers *et al.*, 2002; Orhan *et al.*, 2006).

Algunos géneros de estas PGPR intervienen en el control de patógenos, dando protección mediante diferentes vías: producción de antibióticos, inducción de resistencia, activación de los mecanismos de defensa (inhibición, competición) y producción de sideroforos; compuestos con alta afinidad por el Fe III (García *et al.*, 2004; Siddiqui, 2005).

2.2.1 REGULADORES DEL CRECIMIENTO DE PLANTAS

Los reguladores de crecimiento de las plantas (PGRs) son sustancias orgánicas que influyen en procesos fisiológicos en muy bajas concentraciones, frecuentemente son efectivas a concentraciones internas por debajo de 1 μM , cuando usualmente otros metabolitos necesarios para el crecimiento y desarrollo como: aminoácidos, ácidos orgánicos, y azúcares, se presentan a concentraciones de 1 a 50 mM (García, 2000). Los PGRs activados inducen la bioquímica y cambios fisiológicos en el organismo (Chakraborty, 2006).

Estudios moleculares relacionados con la síntesis de AIA y su regulación, tienden a proveer algunos indicios, sobre las posibles consecuencias de las interacciones entre plantas y producción de AIA de origen bacteriano.

2.3 AUXINAS

Fritz Went (1926) demostró que la aplicación de esta sustancia a plantas decapitadas puede inducir inclinación en ausencia de estímulos de luz, resultado debido a un alargamiento. Siendo este investigador el que propuso el nombre auxina proveniente del griego auxe, que significa crecer (Woodward y Bonnie 2005).

El regulador de crecimiento AIA fue identificado en 1930. Subsecuentemente se desarrolla su aplicación a los tejidos de plantas, implicando a esta hormona en procesos fisiológicos. En el año de 1980 es reconocido que regulan la transcripción de muchos genes (Quint y Gray, 2006).

Se les encuentra como moléculas libres o en formas conjugadas inactivas, cuando están conjugadas, se encuentran metabólicamente unidas a otros compuestos de bajo peso molecular. Este proceso puede ser reversible (Barker y Tagu, 2000).

Las auxinas son hormonas esenciales en procesos del crecimiento de la planta y desarrollo (Cheng y Zhao, 2007), incluyendo la diferenciación de tejidos vasculares, la formación de raíces laterales y adventicias, control de dominancia apical y respuestas trópicas, como es el crecimiento de hojas y tallo hacia la luz.

Influyendo en el desarrollo, causando cambios a nivel celular, afectando la turgencia de la célula y elongación, además de la división y diferenciación de esta (Kelley y Riechers, 2007). Promueven el crecimiento de la célula, actuando sobre la membrana plasmática y relajando la matriz de celulosa que forma la pared. El factor que provoca tal relajamiento, es una diferencia de pH (causado por la extrusión de H⁺) y activación de una enzima que causa extensibilidad de la pared (Richard, 1996)

La propiedad más importante es su transporte basipétalo (hacia la base) en el tallo y la raíz, además inhiben la abscisión de órganos como las hojas y los frutos. Otra propiedad es que en el tejido en el que se encuentran, se convierte en el punto de atracción de nutrientes (Jankiewicz, 2003).

2.4 BIOFERTILIZANTES

El término Biofertilizante usualmente es referido para preparaciones de microorganismos vivos, este es un sustituto parcial o completo para la fertilización química. Son conocidos por promover el crecimiento de la planta suministrando nutrientes, el mantenimiento y productividad del suelo (Vessey, 2003; Orhan *et al.*, 2006; Fuentes y Caballero, 2005).

Un concepto semejante es el de Mabood, *et al.*, el cual lo definen como una sustancia que contiene microorganismos vivos, que colonizan la rizosfera o el interior de la planta. Cuando es aplicado a semillas, superficies de plantas o suelos promueven el crecimiento, incrementando el suministro o disponibilidad de nutrientes primarios para la planta hospedera (Fazli *et al.*, 2008).

En cuanto a los conceptos para un inoculante bacteriano, se hace referencia a una formulación conteniendo una o más cepas bacterianas benéficas, cuyo uso es fácil y económico.

La Universidad Autónoma de México en colaboración con la Secretaría de Desarrollo Rural en el 2002 (Puebla), produjo biofertilizantes basados en *Azospirillum*, para 15,000 ha de maíz, trigo, cebada y sorgo (Fuentes y Caballero, 2005; Castro, 2007). En el mismo año la compañía Nitragin Argentina S.A., en convenio con el INTA desarrollo un inoculante líquido con *A. brasilense* (Díaz, 2003) y en el 2007 cerca de 500,000 hectáreas de trigo y maíz fueron inoculadas en Argentina y México.

Cabe mencionar que en la actualidad el uso de microorganismos representa sólo el 1.4% (380 millones de dólares) del mercado global para el control de plagas y enfermedades. Los productos generados a partir de *B. thuringiensis* para el control de plagas, son los más abundantes en el mercado (Jiménez *et al.*, 2001).

2.5 EL GÉNERO *Pseudomonas*

Este género constituye uno de los principales grupos de rizobacterias con actividad promotora del crecimiento vegetal. Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y se

divide en dos grandes grupos que se determinan por la producción de pigmentos fluorescentes y no fluorescentes, estas pueden resultar beneficiosas o patógenas a plantas o animales. Se destacan dentro de este género las especies *P. fluorescens* y *P. cepacia*.

P. fluorescens es una bacteria gram negativa, no forma endoesporas, y tiende a recibir particular atención como potencial biológico debido a su capacidad de colonizar raíces y biocontrol de patógenos (Kurek y Jaroszuk, 2003; Carrillo *et al.*, 2000). Dichas bacterias se concentran en el rizoplasma y varían su proporción de acuerdo con los cultivos; Vlassack (1992) al inocular *P. fluorescens* en rizoplasma de plátano y arroz observó un 10.8% de población y 4.35% respectivamente, en comparación con las plantas sin inocular (Díaz, *et al.*, 2001).

La adhesión de esta bacteria a la superficie de la raíz puede ser considerada como mutualista (Van, 1995), ya que en la raíz de guisantes puede inducir la acumulación de lignina (Dilantha *et al.*, 2005).

Además de su capacidad de colonización produce un amplio rango de metabolitos antifúngicos como: ácido salicílico, omicín A, sulfonamida, pyoluteorin (PLT), pyrrolnitrin (PRN), phenazine-1-carboxylic acid (PCA), 2,4- diacetylphoroglucinol (PHL), este último induce la resistencia de enfermedades sistémicas en plantas, (resultado de aumentar la actividad de quitinasa y peróxidasa), y ácido pseudomonico conocido como mupirocin, exhibiendo un alto nivel de actividad antibacterial contra: *Staphylococci*, *Streptococci*, *Haemophilus*, *Influenza* y *Neisseria* (Kurek y Jaroszuk, 2003; Kiely, 2006; Dilantha *et al.*, 2005).

Dentro de las investigaciones en mecanismos de control biológico, llevado a cabo en: tabaco, pepino, tomate, rábano y caña de azúcar, tienden a revelar que diferentes cepas de *Pseudomonas* inhiben el crecimiento del micelio del hongo *Rhizoctonia solani* en raíz (Nandakumar *et al.*, 2001).

La aplicación de la suspensión bacterial o su formulación en talco a semillas, raíz, hojas y suelo, reduce la incidencia de enfermedades, promueve el crecimiento de la planta e incrementa la producción en condiciones de invernadero.

2.6 EL GÉNERO *Bacillus*

Bacillus es un género gram positivo, cuyá célula es en forma de bastón, produce endoesporas y pueden ser patógenos o beneficiar a su hospedero. Algunos miembros de este género son: *B. anthracis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus* y *B. subtilis*, siendo capaces de producir metabolitos antimicrobiales (Danielsson, 2008). Además incrementan fosforo (Rodríguez y Fraga, 1999) y la fijación de nitrógeno, para el crecimiento de la planta, por ello varios estudios revelan que *Bacillus* coloniza varias especies (Yu *et al.*, 2002; Cavaglieri *et al.*, 2005).

Investigaciones en la colonización de arroz, hacen referencia acerca de que hay dos sitios donde se encuentra este género, dentro de la raíz en la zona de elongación y diferenciación (punta de la raíz) y la unión entre la primera y la raíz lateral.

Existen reportes de que los exudados de la rizosfera de soya, estimulan la germinación de esporas y crecimiento de células de *Bacillus* para competir con fitopatógenos de la raíz (Medrano, 2000).

B. mojavense es una de las especies aisladas de hojas y ramas de la planta de café (Liu, 2006). Este género no solo a sido aislado de la raíz, sino también de suelos agrícolas y ecosistemas marinos como el caso de *B. pumilus* que es una bacteria común. Coloniza en raíz, tallo y hojas de tomate (seis semanas después de la inoculación), además es endofítica en algodón, maíz, frutales; y epifita en raíces de otras plantas (Thomas, 2004).

B. subtilis BEB 13-bs modifica la calidad, ya que mejora el aspecto del tomate. Es demostrado que la inoculación de esta PGPR mejora el sistema radical. Incrementa significativamente el ancho y longitud de las raíces, en plantas del tratamiento BS13 y BS18, 26% y 13-15% respectivamente comparada con el control (Mena y Olalde, 2007). Algunos géneros suelen ser usados co-inoculación con otros géneros para un mejor resultado.

B. sp. (PGPRE) es usado separadamente o con *B. japonicum* para incrementar el crecimiento de *B. Polymaxa* (H5), debido a la solubilización de fosfato; e incrementó de los niveles de fósforo usando la co-inoculación con *Rhizobium*.

Hay pocas referencias en el caso de plantas de uso ornamental. El género *B. radícicola* originalmente aislado de alfalfa, incrementa la germinación de especies epifitas de *Epidendron* y *Laelia-Catleya* (Tsavkelova *et al.*, 2007).

2.7 *Serratia*

Es una bacteria gram negativa, clasificada en la familia de *Enterobacteriaceae*. Puede ser distinguida de los demás géneros por la producción de tres especiales enzimas DNAasa, lipasa y gelatinasa, además de su crecimiento sobre un medio ordinario en condiciones anaeróbicas y aeróbicas, y en algunos casos la producción de células de pigmentación roja.

El género *Serratia* comprende diez especies: *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. proteomaculans*, *S. grimesii*, *S. polymathica*, *S. rubidaea*, *S. odorífera*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, y *S. entomophila* (Sekhsokh *et al.*, 2007).

S. marcescens es generalmente observado como patógeno potencial de humanos o insectos, habiendo también reportes en su aislamiento de agua, suelo o plantas (Tan, 2001); algunas de estas bacterias endofíticas se han reportado para raíces de cultivos de algodón y en tallo de maíz.

Hay referencias de su control biológico contra otros géneros bacterianos, como es el caso de *Serratia* J2 que actúa contra la bacteria patógena *Ralstonia solanacearum* (Hua, 2004), teniendo como resultado la supresión del marchitamiento de la planta de tomate, además de incrementar la producción.

Además *S. marcescens* en plantas de pepino y tomate, induce resistencia sistémica contra el virus de mosaico (Siddiqui, 2005).

S. plymuthica cepa R1GC4 en plantas de pepino es susceptible para reaccionar mas rápidamente y eficazmente contra *Pythium ultimum*, através de la formación de barreras físicas y químicas, en sitios de entrada de hongos (Niranjan *et al.*, 2005).

3.0 MATERIALES Y METODOS

Descripción de la zona donde fueron colectados los ejemplares de orquídea para el desarrollo del presente estudio.

El material biológico utilizado en el presente trabajo proviene del municipio de Ajacuba. Tiene una superficie total de 19,270 hectáreas. La localización geográfica del municipio se encuentra al suroeste del estado de Hidalgo, colindando con el Estado de México. Entre las coordenadas latitud norte 20° 05' y 99° 07' de longitud oeste.



Fig. 1. Ubicación geográfica del municipio de Ajacuba (5).

Posee un clima templado con lluvias en verano. La comunidad vegetal típica se ve dominada por *Prosopis* y sustrato arbustivo.

El clima del municipio es variable frío y seco en invierno, seco y caluroso en verano con una temperatura media anual de 17 grados centígrados y una precipitación pluvial media anual de 900 milímetros.

3.1 Material biológico

Las plantas de orquídea fueron colectadas de los árboles a una altura de 1.5 m, tratando de que fueran plantas sanas de tamaño uniforme y se transportaron en bolsas de papel de estraza al lugar donde se estableció el cultivo.

El establecimiento de las plantas fue en un cuarto con entrada de luz 60%. El riego fue con un atomizador con agua libre de cloro cada semana.

3.1.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas *P. fluorescens* cepa Cavm, *Bacillus sp.* cepa 5-R-8 y *Serratia sp.* fueron obtenidas en el Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad-Genética del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo.

3.1.2 Medio de cultivo

El medio B King fue preparado y contiene por cada 1000 (mL): caseína 22.5 (g), glicerol 15 (mL), K_2HPO_4 12.5 (g) y 3 (mL) de sulfato de magnesio 1M.

3.2 Métodos

Para el establecimiento de los lotes se emplearon 52 pseudobulbos basales de *L. speciosa* agrupados de la siguiente manera: 7 plantas o repeticiones (1 planta fue la unidad experimental) por cada suspensión bacteriana y sin inocular, en sustrato de *Prosopis laevigata* (Palacios, 2006) y 5 repeticiones para encino, previamente esterilizado en autoclave a 121° por 15 min. A los 197 días de cultivo se determinaron: la longitud en mm con un vernier del bulbo y hoja.

3.2.1 Preparación del medio de cultivo

Para la preparación del medio B King, se peso en una balanza: caseína 22.5 (g), K_2HPO_4 12.5 (g), agregando 15 (mL) de glicerol y 1000 (mL) de agua destilada. Se utilizaron matraces de un litro en cada uno se vertió 500 mL del medio. Para después colocarlos en autoclave a 121° por 15 min. En condiciones asépticas se agrego 3 (mL) de sulfato de magnesio 1M, a cada 500 (mL) de medio líquido B King.

3.2.2 Cultivo bacteriano

En condiciones estériles, con una asa de siembra se inoculo cada suspensión bacteriana (*P. fluorescens* cepa Cavm., *Bacillus* sp. cepa 5-R-8 y *Serratia* sp.) en 10 mL de medio liquido B de King, en matraces de 125 mL y se coloca en un agitador (Shaker Bath) a 150 rpm por 3 h; posteriormente cada inoculo fue vertido en 500 mL de medio liquido B King, para después agitarlo a 88 oscilaciones por minuto durante 48 h.

Después se determino la turbidez en un espectrofotómetro (Modelo 6/ 20 Coleman Junior II) 0.75 para *P. fluorescens* cepa Cavm., 0.47 *Bacillus*, y 0.71 para *Serratia* sp. Posteriormente para la inoculación de la suspensión bacteriana, la raíz de la orquídea se mantuvo en suspensión durante 2 minutos.

El crecimiento en mm de la longitud y ancho de la hoja, así mismo para la longitud y ancho del bulbo, fue determinado con la ayuda de un vernier.

3.2.2 Determinación de Clorofila

Se tomo un disco de la hoja y se maceró con 2.5 mL de acetona al 80%, se centrifugó a 1580 x g por 5 minutos. El sobrenadante se retiró y guardó para emplearlo posteriormente. A la pastilla se le agregó 2.5 mL de acetona, se centrifugo por 5 minutos a 1580 x g, la pastilla se desecho y los sobrenadantes se juntaron para luego aforar a 5 mL con acetona, finalmente se leyó a 646 y 663 nm.

3.2.3 Determinación de AIA

El contenido de AIA fue determinado de acuerdo al método referido por Ergun (2002). Se lavo en agua corriente dos gramos de raíz peso fresco, combinado con: 36 mL de metanol, 15 mL de cloroformo, 9 mL de NH₄OH 2 N, se ajusto a un pH de 2.5 con 7N HCL. Se extrajo a tres tiempos con 15 mL de etilacetato en un embudo de separación, separando la fase superior (AIA libre). Posteriormente se ajusto a un pH de 11 con 7 N NAOH, incubando la solución a 70 °C durante una hora para hidrólisis. El pH se ajustó a 2.5, extrayendo a tres tiempos con etilacetato (15 mL). Finalmente se inyecto 100µl de cada una de las 32 muestras en HPLC.

La significancia estadística de los datos se determino usando el análisis de varianza (ANOVA), la media es establecida por diferencia mínima de significancia (DMS) de $p < 0.05$.

4.0 RESULTADOS

Las plantas utilizadas fueron aquellas que presentaron las características adecuadas para cumplir con todos los objetivos.

4.1 Desarrollo de *L. speciosa* en los sustratos

Las plantas establecidas en sustrato de *P laevigata* fueron las que finalmente se desarrollaron adecuadamente, ya que desde un principio algunas de las muestras que fueron colocadas en *Quercus* presentaron coloración amarilla en pseudobulbos y hojas y en algunos casos pérdida de esta, la raíz ya no se desarrolló, y no hubo presencia de raíces nuevas, por lo que no se pudieron emplear para los análisis posteriores. En consecuencia fueron estudiadas aquellas que se establecieron en el sustrato de *P laevigata*.

4.2 Efecto de la inoculación de las plantas con suspensiones bacterianas

Se observó que en una de las muestras inoculadas con suspensiones de *P. fluorescens* Cavm, presentó las hojas de coloración amarilla. De igual manera para las muestras inoculadas con *Serratia* sp. y *Bacillus* 5-R-8 dos plantas presentaron hojas de coloración amarilla y las raíces se desarrollaron en menor cantidad en comparación con las demás que presentaron condiciones sanas.

De las muestras tratadas con cada una de las suspensiones celulares bacterianas, las inoculadas con *P. fluorescens* Cavm, fueron las que presentaron el mejor desarrollo después de diez meses de cultivo. Teniendo el mayor número de pseudobulbos y hojas de renuevo totales (Tabla 1). Se tiene certeza que las mayores diferencias se presentaron con las plantas que no fueron inoculadas ($P < 0.05$, Fig.3)

	Número de pseudobulbos	Número de hojas
Sin inocular	6	11
<i>P. fluorescens</i> Cavm	9	17
<i>Bacillus</i> 5-R-8	6	12
<i>Serratia</i> sp.	7	11

Tabla 1. Determinación del número de pseudobulbos y hojas de renuevo totales contabilizados, en plantas inoculadas y cultivadas en sustrato de *P laevigata*.

4.3 Acumulación de AIA libre en las plantas

La concentración de AIA libre en las plantas inoculadas con las suspensiones celulares de *Pseudomonas* se detectaron ciertas diferencias, especialmente en relación con el lote que fue inoculado con las suspensiones bacterianas de *B. 5-R-8*, en las que no se detectó la presencia de AIA libre (Figura 3); en cuanto en los lotes inoculados de *P. fluorescens* Cavm donde se detectó la presencia de AIA libre son estadísticamente significativas.

Aunque las diferencias no son estadísticamente significativas en el caso del AIA conjugado acumulado en las raíces, llama la atención que el lote de plantas sin inocular, así como las que fueron inoculadas con las suspensiones celulares de *P. fluorescens* Cavm, tuvieron las mayores cantidades en relación con *Bacillus 5-R-8* y *Serratia* sp. (Figura4).

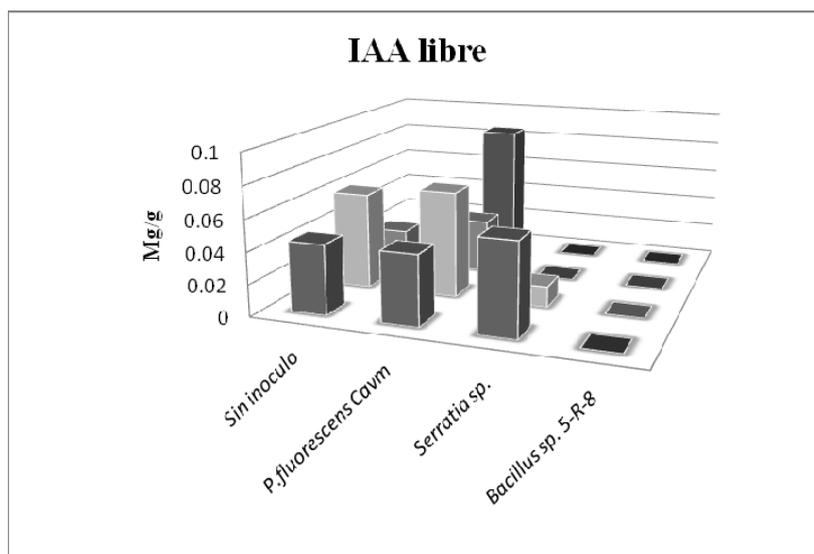


Fig. 2 Niveles de AIA libre acumulados en las raíces frescas de las plantas.

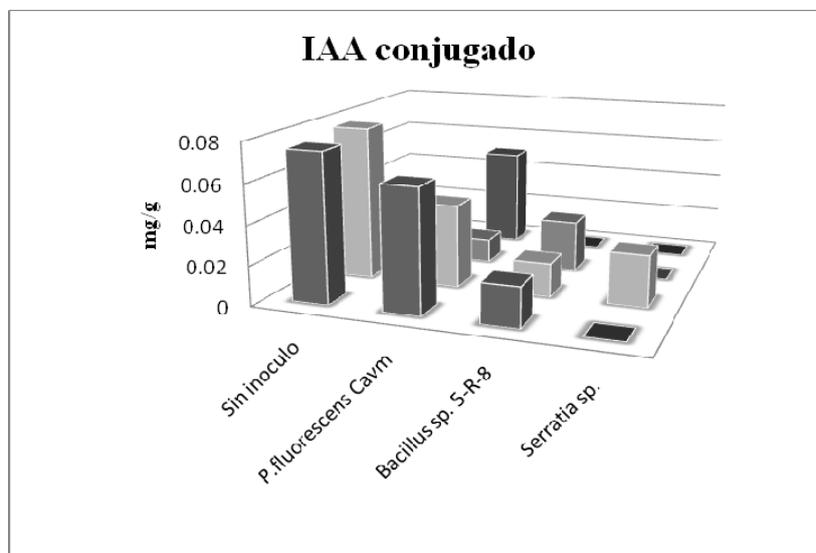


Fig. 3 Niveles de AIA conjugado acumulados en las raíces frescas de las plantas.

4.4 Acumulación de clorofila a en hoja.

La concentración de clorofila a en las muestras inoculadas con las suspensiones celulares de *P. fluorescens* Cavm y *Bacillus* 5-R-8 mostraron cierto parecido con la del lote de plantas que no habían sido inoculadas y, el que fue inoculado con las suspensión de *Serratia* sp. presentó la menor cantidad.

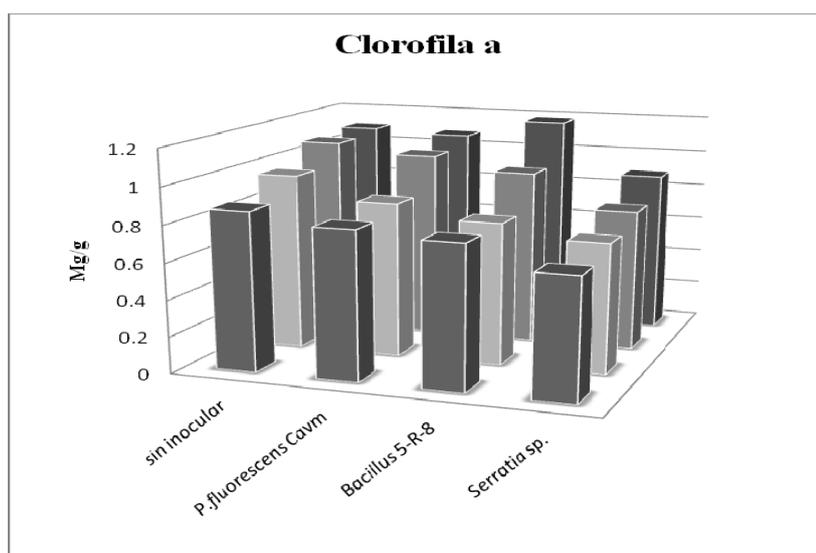


Fig.4 Perfil de concentración de clorofila a en los lotes de planta indicados. La determinación de clorofila se llevó a cabo a los 373 días de desarrollo de las plantas. (mg/ mL).

4.4.1 Acumulación de clorofila b en hoja

En el caso de la clorofila b, en todos los lotes se presentó prácticamente el mismo resultado, según puede apreciarse en la figura 6.

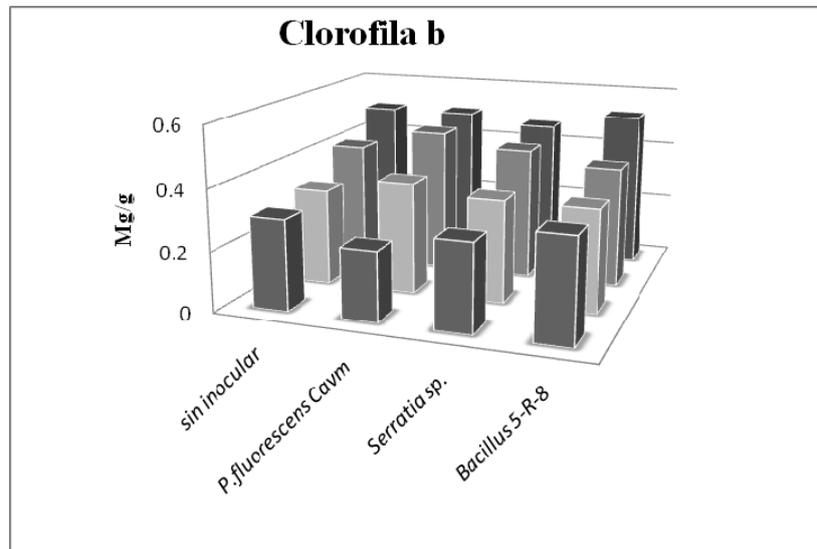


Fig. 5 Perfil de concentración de clorofila b en los lotes de plantas indicados. La determinación de clorofila se llevo a cabo a los 373 días de desarrollo de las plantas (mg/mL)

4.5 Desarrollo de las plantas

4.5.1 Longitud de las hojas

En la figura 6 se observa que las plantas con el inoculo de *P. fluorescens* Cavm, presentaron las hojas de mayor longitud, siendo significativo este desarrollo.

En el caso de *Bacillus* 5-R-8 y *Serratia* sp. las hojas mostraron un crecimiento menor al que se obtuvo con las muestras sin inocular.

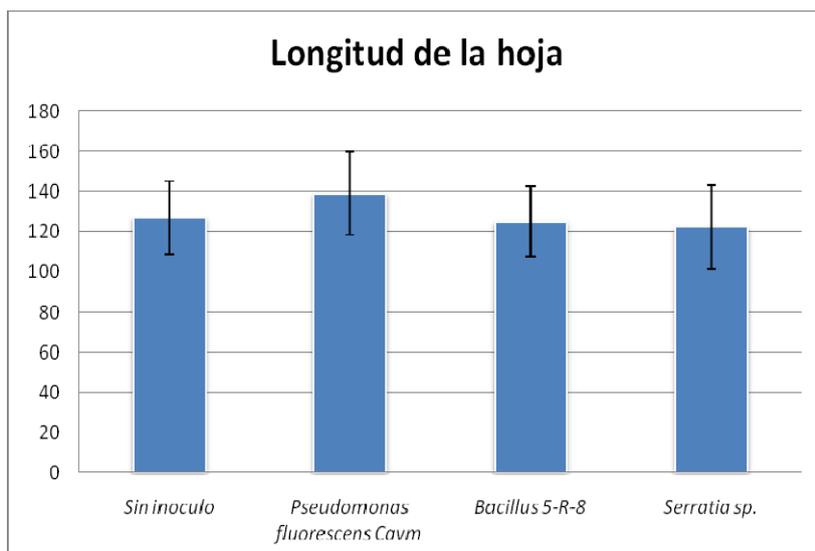


Fig.6 Patrón de desarrollo de las hojas (longitud). Las determinaciones fueron realizadas a los 197 días de desarrollo de las plantas.

4.5.2 Diámetro de las hojas

En el caso de esta variable, nuevamente las plantas inoculadas con la suspensión bacteriana de *P. fluorescens Cavm* obtuvieron un mayor diámetro pero no presentaron diferencias significativas.

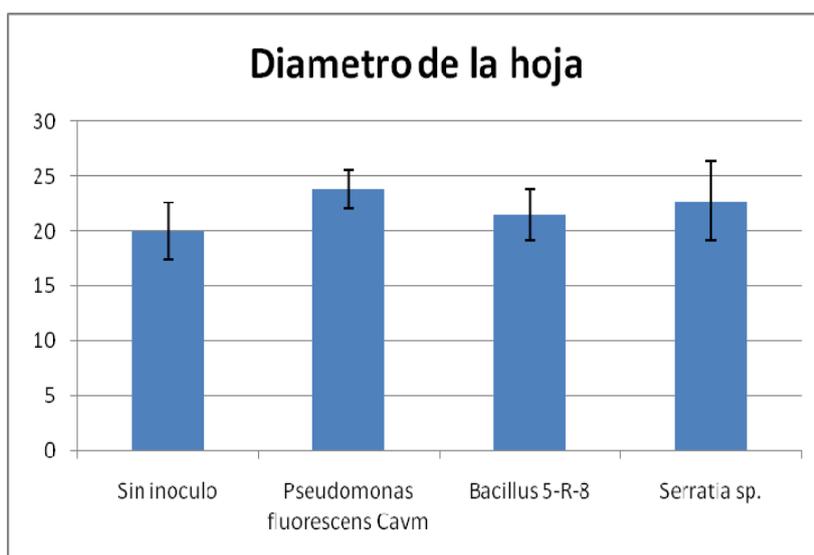


Fig. 7 Patrón de desarrollo de las hojas de las plantas, despues de 197 días como se indica. crecimiento en mm en el diametro de la hoja.

4.5.3 Longitud de los pseudobulbos

Las muestras que habían sido inoculadas con las suspensiones bacterianas de *P. fluorescens* Cavm y de *Bacillus* 5-R-8 mostraron los pseudobulbos de mayor longitud, pero no se obtuvo diferencias significativas, como se muestra en la figura 9. Los pseudobulbos de las plantas que no fueron inoculadas mostraron el menor desarrollo.

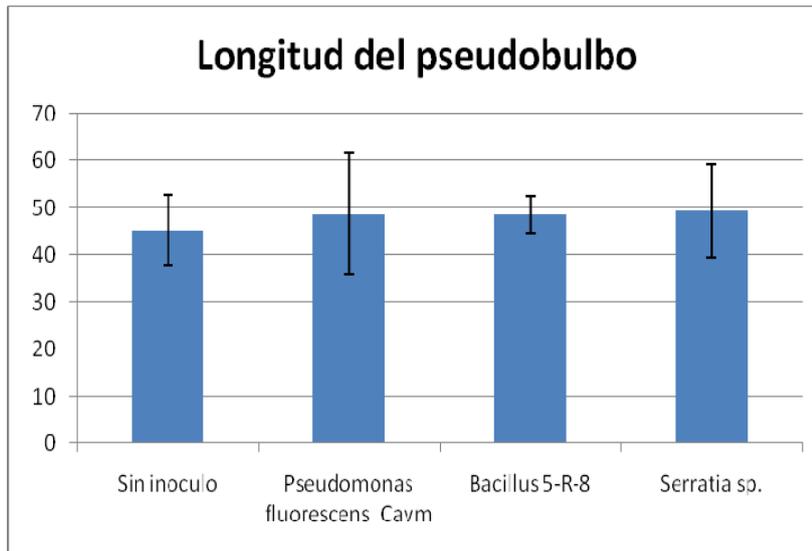


Figura 8. Desarrollo del pseudobulbo (longitud) en mm de plantas desarrolladas como se indica. Las determinaciones fueron llevadas a cabo a los 197 días de desarrollo de las plantas.

4.5.4 Diámetro de los pseudobulbos

En general las plantas que habían sido inoculadas mostraron la tendencia a tener pseudobulbos de mayor tamaño de manera significativa en relación a las plantas que no habían sido inoculadas figura 9.

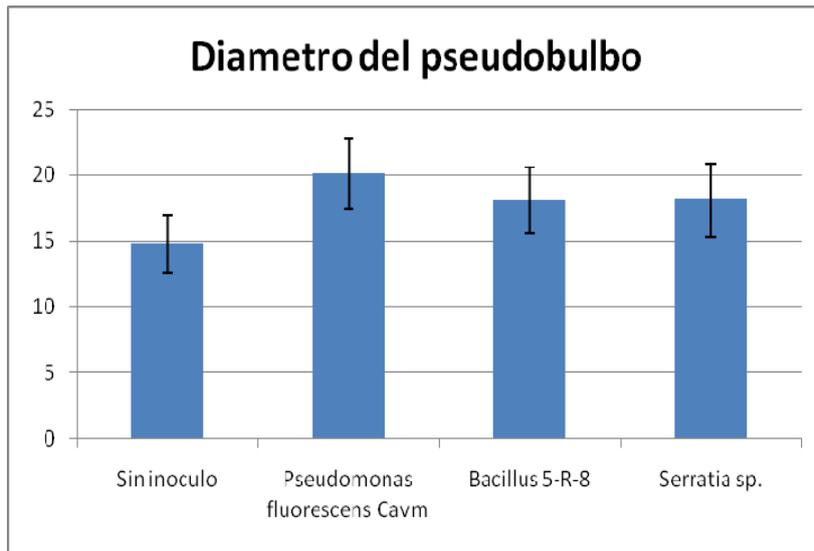


Figura 9. Desarrollo del pseudobulbo (diametro) en mm de plantas desarrolladas como se indica. Las determinaciones fueron llevadas a cabo a los 197 días de desarrollo de las plantas.

DISCUSION

Las interacciones entre plantas y producción de AIA de origen bacteriano, puede variar de patogénesis a fitoestimulación dependiendo de la especie microbiana, ya que este regulador de crecimiento es utilizado para interactuar con las plantas, como parte de una estrategia de colonización (Spaepen *et al.*, 2007). De las tres suspensiones empleadas para la inoculación solo *P. fluorescens* Cavm, presento un efecto significativo, un aspecto importante que debe considerarse es el hecho de que tiene la capacidad de sintetizar sideroforos, que son moléculas capaces de secuestrar óxidos férricos para convertirlos en formas disponibles para las plantas, y al estar estas células colonizando las raíces, le facilitan la asimilación de metales como el hierro y cobre, entro otros más. Por esta razón en las muestras inoculadas se observa un mayor desarrollo.

Entonces, estos microorganismos, además de promover el crecimiento de las plantas, vía producción de sideroforos extracelulares; también pueden sintetizar AIA para estimular el crecimiento radical lo que a su vez repercute en que las plantas con mayor volumen radical tienen mayor capacidad de absorción de nutrientes, propiedad que se le atribuye a estos reguladores cuando se encuentran en tejidos, ya que se convierte en el punto de atracción de nutrientes (Jankiewicz, 2003).

La diferencia significativa de AIA libre mostrada en las plantas inoculadas con las suspensiones de *P. fluorescens* Cavm, se correlaciona positivamente con la longitud y diámetro de los pseudobulbos y de las hojas; ya que se ha demostrado que en promoción de crecimiento, este regulador muestra una alta actividad a concentraciones muy bajas del orden de los nanomoles (Woodward, 2005).

Tanto para AIA libre y AIA conjugado, pareciera que la presencia de los microorganismos de *Bacillus* 5-R-8 y *Serratia* sp., inhibieran la capacidad de síntesis de este regulador de crecimiento vegetal; y se requirió de la utilización de AIA conjugado por lo tanto no hubo niveles detectables.

Para la concentración de clorofila b para la suspensión de *Bacillus* 5-R-8 se correlaciona con el crecimiento de la planta, por ejemplo, si se toma en cuenta las variables de ancho y longitud de los pseudobulbos; por lo tanto se obtuvo una diferencia, debido a que este género produce esporas flexibles contra daños químicos y mecánicos, teniendo una

mayor ventaja como biocontrol de cepas, (Medrano, 2000). Hay otros factores que influyen en las célula microbiana ya que puede limitarse a ciertos exudados de la raíz. La colonización y proliferación es dependiente de la habilidad de los microorganismos a utilizar específicamente estos compuestos exudados (tal es el caso de fuente de carbón). Algunos compuestos presentes varían entre las especies de plantas.

En cuanto *Serratia* sp. se tienen antecedentes de que estas son patógenas de animales y plantas, y solo algunas especies de este genero son reportadas como PGPR debido a que se obtiene una respuesta positiva para la formación de barreras físicas y químicas, en sitios de entrada de hongos manteniendo saludable al organismo, en este caso esta suspensión no se logro obtener una respuesta positiva después de la inoculación.

El empleo de sustratos de origen orgánico como la corteza de arboles para el desarrollo de *L. speciosa*, se debe a que posee una textura que permite la fácil penetración de las raíces de la planta y un desarrollo saludable de esta, característica que hace una buena opción para su propagación.

Otra característica importante de los sustratos orgánicos es que sus compuestos se deterioran y descomponen, en este proceso liberan nutrimentos a la planta. Algunos otros metabolitos funcionan como mecanismos de defensa contra ataques por patógenos microbiales, herbívoros y plagas de invertebrados. Las concentraciones mas altas de metabolitos en los arboles ocurren en la corteza y raíces (dependiente de la especie y la estación).

Un ejemplo de ello son los flavonoides cuya función es proveer resistencia del ataque de hongos e insectos, quercetin es una de las más comunes aislado de la corteza de las coníferas. Las ligninas incluye enzimas fúngicas e inhibición del crecimiento y ocurre en géneros como *Q. rubra* y *Ulmus thomasii* (John, 2009).

Este rango de actividad biológica puede ser contraproducente para la promoción de crecimiento por medio de inoculación bacteriana, por ello en algunos estudios de *Lycopersicon* se hace referencia al empleo de la corteza con un mínimo de tres meses de ser cortada.

El estado de las plantas en el sustrato de *Quercus* sp. se debe a que éste se encontraba fresco. Posiblemente al liberar estas sustancias afectaron el desarrollo de la raíz de la planta, inhibiendo las células bacterianas, además de que el tamaño de los fragmentos de sustrato no fue el adecuado, ya que se emplearon de grado grueso, cuando se debió de emplear el de grado medio.

En cuanto al mejor establecimiento de las plantas fue en sustrato de *P. laevigata*, antecedente etnobiológico referido por Eulalia Uribe y Tomasa Olvera en el 2007.

6.0 CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede llegar a la siguiente conclusión:

El mejor establecimiento de *L. speciosa* fue en el sustrato de *P. laevigata*, corteza sobre la cual vive en su hábitat natural.

La utilización de microorganismos bacterianos en orquídeas que favorezcan la nutrición, para promover el desarrollo de las plantas, ofrece nuevas alternativas. Esta aplicación biotecnológica pudiera ser aconsejable para los productores de ornamentales, con la que pueden generar orquídeas de aspecto saludable en relativamente menos tiempo con lo que se reducirían costos de producción y manteniendo la calidad del producto. El método es práctico y muy sencillo: las plantas son establecidas en sustrato de *P. laevigata* de tamaño adecuado y después de inocular las raíces con la suspensión bacteriana de *P. fluorescens* Cavm se cultivan en las condiciones que el productor utiliza.

Anexos

Tabla 2 Análisis de varianza para AIA Libre

AIA Libre	Promedio	F	Probabilidad	Valor critico para F
Sin inocular	0.0305			
<i>Pseudomona fluorescens</i>	0.0585	6.3455	0.0453	5.9873

Tabla 3 Análisis de varianza para longitud de las hojas

	Promedio	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<i>Pseudomona fluorescens</i>	137.295714			
Sin inocular	122.737143	3.73633081	0.02464049	3.008786572
<i>Bacillus 5-R-8</i>	121.267143			
<i>Serratia</i>	114.062857			

Tabla 4 Análisis de varianza para ancho de los bulbos

	Promedio	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<i>Pseudomona fluorescens</i>	20.10	5.05	0.0074	3.008
Sin inocular	14.78			
<i>Bacillus 5-R-8</i>	18.04			
<i>Serratia</i>	18.10			

REFERENCIAS

Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M, S. 2005 Indol acetic acid production by the indigenous Isolates of *Azotobacter* and *fluorescent Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. Turk Journal of Biology, 29:29-34

Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M., S. 2008 Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research, 163:173-181

Arditti, J. 1967 Factors affecting the germination of orchid seeds. Botanical Review, 33:1-97

Bertolini, V. 2007 Biofertilización y hormonas vegetales en la sobrevivencia y crecimiento de plántulas de *Phalenopsis* (Orchidaceae) producidas in vitro. Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal, 10:1-14

Carrillo, C. G., Muñoz, J. J., Ruiz, L. D y Muller, G. R. 2000 Aumento del rendimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum mill*) cuando la raíz se desarrolla colonizada por microorganismos. Biotecnología Aplicada, 17:171-176

Castillo, G., Altuna, B., Michelena, G., Sánchez, J., Acosta, M. 2005 Cuantificación del contenido de ácido indolacético (IAA) en un caldo de fermentación microbiana. Anales de Biología, 27:137-142

Castro, S. S., Herschkovitz, Y., Okon, Y., Jurkevitch, E. 2007 Effects of inoculation with plant growth- promoting rhizobacteria on resident rizhosphere microorganism. Microbiology Letters, 276:1-11

Cavaglieri, L., Orlando, J., Rodríguez, M. I., Chulze, S., Etcheverry. M. 2005 Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. Research in Microbiology, 156:748–754

Chakraborty, U., Chakraborty, B., Basnet, M. 2006 Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. *Journal Basic of Microbiology*, 46(3):186–195

Cheng, Y. y Zhao, Y. 2007 A role for auxin in flower development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1(49):99–104

Curà, A. J., Ribaudó, M., Gaetano, M. A., Ghiglione, O. H., 2005 Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en el cultivo de arroz durante las primeras etapas del desarrollo. Cátedra de bioquímica, Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires. p. 1-8

Danielsson, J. 2008 *Bacillus* based biocontrol on *Brassica*, Ver. Tesis Doctoral, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences. Universidad de Agricultural Sciences. P. 1-39

Dilantha F, W. G., Nakkeeran S. y Yilan Z. 2005 Biosynthesis of antibiotics by pgpr and its relation in biocontrol of plant diseases, In PGPR: Biocontrol and Biofertilization Ed. Z. A. Siddiqui: 67–109

Diaz, V, P., Ferreta, C, R., Almaraz, S, J. J. y Alcantar, G. G. 2001 Inoculation of plant growth-promoting bacteria in lettuce. *Terra*, 19(4):327-335

Díaz, Z, M., Balaña, M, R., Fernández, C, M. V., Peticari, A. 2003 Producción de cultivos de trigo inoculados con bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Disponible en: www.Fertilizando.com Fecha de acceso: Enero 2009.

Ergun, N., Yildiz, A. 2002 Auxin (Indole-3-acetic acid), gibberellic acid (GA₃), abscisic acid (ABA) and cytokinin (Zeatin) production by some species of mosses and lichens. *Turk Journal of Botany*, 26:13-18

Fuentes, R. L. E. y Caballero, M. J. 2005 Bacterial biofertilizers. In PGPR: Biocontrol and Biofertilization, Ed. A. Siddiqui, Springer, Netherlands:143–172

García, S. I. E., 2000 Directal beneficial effects of cytokinin producing rhizobacteria of plant grown, Ver. Tesis Doctoral. Departamento de ciencia del suelo, Universidad de Saskatchewan. P 1- 243

García, L, J. A., Jezabel, D. 2004 Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. *Environmental and Experimental Botany*, 52:239–251

Gray, E. J. y Smith, D. L. 2005 Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling process. *Journal Basic Microbiology*, 37:395-412

Harrison, R.C. 1977 Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae). *Botanical Gazette.*, 1 (138):41-45.

Hernández, D, M.I., y Chailloux L, M. 2001 La nutrición mineral y la biofertilización en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*). *Ciencia y Tecnología*, 5 (13):11-27

Hua, J, Ying Q, H., Hui G, Y., Lian G, H., Ying G, L, Xin Z, L y Hua, P. 2004 Biocontrol of tomato wilt by plant growth promoting rhizobacteria. *Biological Control*, 29:66–72

Jankiewicz, L. S. 2003. Reguladores de crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas, propiedades y acción. Editorial Mundi Prensa, México, S.A C.V, P. 487

Jiménez, D. R., Virgen, C.G., Tabares, F. S., Olalde, P.V. 2001 Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agrobiotecnología. *Avance y Perspectiva*, 20:395-400

Karlidag, H., Esitke, A., Turan, M., Sahin, F. 2007 Effects of root inoculation of plant growth promoting rizobacterias(PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves de apple, 114:16-20

Kelley, K. B., Riechers, D. E. 2007 Recent developments in auxin biology and new opportunities for auxinic herbicide research. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89:1–11

Kiely, P. D., Haynes, J. M., Higgins, C. H., Franks A., Mark, G. L., Morrissey, J. P. y Gara, F. O. 2006 Exploiting new systems-based strategies to elucidate plant-bacterial interactions in the rhizosphere. *Microbial Ecology*, 51:257–266

Kurek, E. y Jaroszuk, S, J. 2003 Rye (*Secale cereale*) growth promotion by *Pseudomonas fluorescens* strains and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. *Biological Control*, 26:48–56

Liu, X., Zhao, H., Chen, S. 2006 Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* c4. *Current Microbiology*, 52:186-190

Mabood, F., Jin, J. W. y Smith, D, L. 2008 Signals in the underground: microbial signaling and plant productivity. molecular mechanisms of plant and microbe coexistence. *Soil Biology*, 15:291-318

Medrano G, M. A., Luna, O, H. A., Peña, C, J.J. 2000 Sobrevivencia de células vegetativas de *Bacillus thuringiensis* en la espermosfera- rizosfera de frijol. *Terra*, 18(4):333-337

Mena, V, H.G., Olalde, P, V. 2007 Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs 51. *Scientia Horticulturae*, 113:103-106

Munguía F, P. V., Gómez S, S., Olalde P, V. 2005 Aislamiento de hongos micorrizicos de raíz de orquídeas originarias del soconusco, Chiapas, p. 1-4

Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan.R, Raguchander.T, Samiyappan.R, 2001 Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology & Biochemistry*, 33:603-612

Niranjan Raj, S. Shetty, H. S. y Reddy, M. S. 2005 Plant growth promoting rhizobacteria: potential green alternative for plant productivity. In PGPR: Biocontrol and Biofertilization, Ed. A. Siddiqui: 197–216

Disponible en: <http://www.orchidspecies.com/orphotdir/laelispeciosaensitu.jpg>. Fecha de acceso: Abril 2009.

Orhan, E., Esitken, A., Ercisli, S., Turan, M, Sahin, F. 2006 Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry. *Scientia Horticulturae*, 111:38–43

John R. Disponible en: <http://www.Especial de metabolitos secundarios en arboles>. Fecha de acceso: Diciembre 2009

Palacios R A. 2006 Los Mezquites Mexicanos: biodiversidad y distribución geográfica *Bol. Soc. Argent. Bot.* 41: 99 - 121

Podile, A. R. and Kishore, G. K. 2006 Plant growth promoting rhizobacteria. In: *Plant Associated Bacteria* Ed: Gnanamanickam, S.S. Netherlands: Springer: 195–230

Quint, M. y Gray, C, M. W. 2006 Auxin signaling. *opinion in plant biology*, 9:448–453

Raaijmakers, M. J., Vlami, M. y Souza, J. T. 2002 Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81:537–547

Richard, N. 1996 *Plant growth substances principles and applications*. Editorial Chapman & Hall, New York, P. 332

Rodriguez H. y Fraga R. 1999 Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17:319–339

Román, G, R. F. 2003 Concentración de reguladores del desarrollo vegetal inducida por hongos endomicorrizicos en dos cultivares de chile. Ver. Tesis Doctoral, Área De

Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Colima, P.103

Santos, H. L., Aguirre, L. E., Campos, E. J. y Martínez, G. M. 2006 Conservación in situ de la flora mexicana la orquídea *Laelia albida*, en una reserva de la biosfera. Ciencia y Desarrollo: 1-10

Sekhsokh, Y., Arsalane, L., Ouenass, M, E., Doublali, T., Bajjou, T y Lahlou, A. I. 2007 *Serratia rubidaea* bacteremia. medecine et maladies infectieuses. 37:287-289

Shaharoon, B., Naveed, M., Arshad, M., y Zahir A. Z. 2008 Fertilizer-dependent efficiency of Pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum L.*). Applied Microbiol Biotechnology, 79:147–155

Siddiqui, Z, A. 2005 Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization, Ed. Z. A. Siddiqui: 111-142

Singh, B. K., Millard, P, Whiteley, A. S. y Murrell, C. J. 2004 Unravelling rhizosphere–microbial interactions: opportunities and limitations. TRENDS in Microbiology, 12(8):1-11

2003. Sistema productos ornamentales del Distrito Federal Plan Rector. Disponible en: <http://www.funprover.org>. Fecha de acceso: Agosto 2009

Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R. 2007 Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. Microbial Review, 31:425-448

Tan, Z., Hurek, T., Gyaneshwar, P., Ladha, J. K. y Reinhold, H. B. 2001 Novel endophytes of rice form a taxonomically distinct subgroup of *Serratia marcescens*. Systematic. Applied. Microbiology, 24:245-251

Taylor, J. L., Zaharia, I. L. 2006 Biotransformation of adenine and cytokinins by the rhizobacterium *Serratia proteamaculans*. Phytochemistry, 67:1887-1894

Thomas. P. 2004 Isolation of *Bacillus pumilus* from in vitro grapes as a long-term alcohol-surviving and rhizogenesis inducing covert endophyte. *Journal of Applied Microbiology*, 97:114–123

Tsavkelova, A. E., Cherdyntseva, A. T., Klimova, Y .S. 2007 Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Netrusov Archive of Microbiology*, 188:655-667

Tsavkelova, E. A., Cherdyntseva, T. A. y Netrusov, A. I. 2004 Bacterias associated with the roots of epiphytic orchids. *Microbiology*, 73(6):710-715

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

Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Cherdyntseva, T.A., Netrusov, A.I. 2006 Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review applied. *Biochemistry and Microbiology*, 42 (2):117-126

Van Loon, L. C. 2007 Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119:243-254

Van O, L. S. y Van E, J. D. 1995 Root exudate induced promoter activity in *Pseudomonas fluorescens* mutants in the wheat rhizosphere. *Applied and Enviromental Microbiology*, 61(3):890–898.

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

Woodward, W. A. y Bonnie, B. 2005 Auxin: regulation, action and interaction. *Annals of Botany*, 95:707-735