

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE VAINILLA EN COLOMBIA

Molecular Identification of Microorganisms Associated to the Rhizosphere of Vanilla Plants in Colombia

CLAUDIA L. ÁLVAREZ LÓPEZ¹, MSc.; NELSON W. OSORIO VEGA¹, Ph. D.; MAURICIO MARÍN MONTOYA¹, Ph. D.

¹ Laboratorios de Biología Celular y Molecular y de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Colombia. klualvarez@gmail.com, nwsorio@unal.edu.co, mamarinm@unal.edu.co

Autor de correspondencia: Prof. Mauricio Marín Montoya. Departamento de Biociencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Colombia. Calle 59 # 63-20, of. 11-113, Medellín, Colombia. A.A. 3840, Medellín. Fax: (+57-4) 430 93 32. mamarinm@unal.edu.co.

Presentado el 19 de febrero de 2013, aceptado el 18 de junio de 2013, fecha de reenvío el 28 de junio de 2013.

RESUMEN

El cultivo de vainilla es altamente promisorio en Colombia, pero se requiere mayor conocimiento de su manejo agronómico y de los microorganismos que crecen asociados a su rizosfera, de los cuales depende esta planta para su nutrición y crecimiento. En este trabajo se realizaron aislamientos de microorganismos de la rizosfera de plantas de vainilla en un cultivo piloto ubicado en el municipio de Sopetrán (Antioquia, Colombia). Los microorganismos se aislaron en medios selectivos de crecimiento para evaluar su capacidad para descomponer celulosa, proteínas, solubilizar fosfato inorgánico y orgánico (fitato) y fijar nitrógeno en forma asimbiótica. Una vez aislados y purificados, se obtuvieron un total de 109 aislamientos, de los cuales se seleccionaron 52 morfotipos para su identificación molecular por secuenciación de las regiones ITS y 16S del ADN ribosomal para hongos y bacterias, respectivamente. Se encontró una alta variedad de microorganismos en la rizosfera de plantas de vainilla, destacándose las bacterias *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas koreensis* y *Acinetobacter* sp. y el hongo *Plectosphaerella* sp., por su potencial para ser utilizados como biofertilizantes destinados a mejorar la nutrición y el crecimiento de estas plantas.

Palabras clave: ADNr, filogenia, PCR, PGPR, *Vanilla planifolia*.

ABSTRACT

The cultivation of vanilla (*Vanilla planifolia*) is highly promising in Colombia, but more research is needed on its agronomical management and beneficial microorganisms that grow associated to its rhizosphere, on which the plant depends for its nutrition and growth. This study involved the identification of microorganisms associated to the rhizosphere of vanilla plants in a crop located in Sopetrán, Colombia. The microbes were isolated in selective media for functional groups such as cellulolytic, proteolytic, inorganic and organic phosphate (phytate) solubilizers, and asymbiotic nitrogen fixing bacteria. After isolation and purification, 109 microbial isolates were obtained. DNA was extracted from 52 selected isolates for molecular identification based on ITS and 16S rDNA sequencing, for fungi and bacteria, respectively. The diversity of rhizosphere microorganisms found was significant. Bacteria such as *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas koreensis* and *Acinetobacter* sp., and the fungus *Plectosphaerella* sp., may have a high potential to be used as biofertilizers to improve vanilla plant nutrition and growth.

Keywords: PCR, PGPR, phylogeny, rDNA, *Vanilla planifolia*.

INTRODUCCIÓN

La vainilla es la segunda especia de mayor valor en el mundo, después del azafrán, y es el saborizante más utilizado en la industria alimenticia. Este es un cultivo promisorio en diferentes regiones de Colombia que presentan condiciones agroecológicas apropiadas para su crecimiento y desarrollo. Sin embargo, su extensión en el país es muy pequeña (72 ha) y los rendimientos que se obtienen son bajos, aproximadamente un 50 % menos, comparados con otros países como Madagascar, México o Islas Reunión (Damirón, 2004; Ledezma *et al.*, 2006), donde la producción promedio es de 1,2 kg de vainas verdes por planta al año. Esto se debe, entre otros aspectos, al desconocimiento que se tiene en Colombia del manejo agronómico del cultivo, de sus problemas fitosanitarios, necesidades fisiológicas y requerimientos nutricionales (Moreno y Díez, 2011).

La nutrición de la vainilla es uno de los aspectos más críticos para su producción comercial, debido a que está estrechamente ligada con un mejor desarrollo vegetativo de la planta, lo que conlleva a una mayor floración y, por ende, al aumento en la producción de vainas. Como respuesta a una mejor nutrición se han obtenido plantas de vainilla más vigorosas y con mayor floración y fructificación (Castro, 2008). La información al respecto es limitada, pero se sabe que al inicio del cultivo los aportes de materia orgánica vegetal en descomposición (Osorio *et al.*, 2011), y las podas en periodos de seis meses antes de la floración permiten lograr el vigor deseado en las plantas (Damirón, 2004). En nuestro medio se desconocen los niveles óptimos de nutrientes requeridos por la planta de vainilla, por lo que en la práctica son inferidos de especies hortícolas de otros miembros de la familia Orchidaceae (Hernández y Lubinsky, 2010).

En investigaciones recientes en Colombia, Osorio *et al.* (2011) reportaron que la combinación de 75 % de material orgánico leñoso o fibra de coco, 25 % de hojarasca y 7 g por planta del fertilizante 27-11-11, incrementaron significativamente el crecimiento y desarrollo de plantas de vainilla recién establecidas. En explotaciones comerciales de la India, se realizan aplicaciones anuales por planta de 40 a 60 g de nitrógeno (N), 20 a 30 g de fósforo (P_2O_5) y 60 a 100 g de potasio (K_2O), así como aplicaciones foliares del fertilizante 17-17-17 una vez por mes, para estimular el crecimiento y floración (Anandaraj *et al.*, 2005). Debido a que el sistema radicular de la vainilla es superficial y sólo se desarrolla directamente sobre la capa de materia orgánica del suelo (Castro, 2008), se considera que los microorganismos rizosféricos juegan un papel importante en la descomposición de los diversos sustratos orgánicos utilizados para su establecimiento. De esta manera, pueden determinar la disponibilidad y toma de nutrientes por las plantas y así promover su crecimiento (Castro, 2008).

Muchos de los microorganismos de la rizosfera de las plantas forman un biocomponente integral de los suelos que controla los ciclos biogeoquímicos de nutrientes. Estos microorganismos se pueden clasificar en grupos funcionales tales

como bacterias fijadoras de nitrógeno (FBN), microorganismos solubilizadores de fosfato (PSM), microorganismos celulolíticos (CEL) y amilolíticos, microorganismos proteolíticos (PRO) -amonificantes- y hongos micorrizales, entre otros (Sylvia *et al.*, 1999). En los cultivos de vainilla de Colombia y otros países, es necesario aumentar el conocimiento que se tiene sobre los microorganismos que habitan la rizosfera, así como de sus nichos ecológicos y de los mecanismos de interacción que existen entre los diferentes grupos. Algunos de los reportes disponibles, indican el uso de *Pseudomonas fluorescens*, *Azospirillum* y bacterias solubilizadoras de P, como biofertilizantes útiles para promover el crecimiento de vainilla (Anilkumar, 2004). Así mismo, Surendra *et al.* (2009), desarrollaron un consorcio de PGPR's (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) para la micropropagación *ex vitro* de plantas de vainilla y encontraron que diversas especies de *Azotobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* fueron las más eficientes.

El objetivo de este estudio fue aislar e identificar microorganismos rizosféricos con potencial para hacer más disponibles los nutrientes en el cultivo de vainilla y así contribuir a un posterior desarrollo de biofertilizantes. Para esto se evaluaron diferentes grupos funcionales y se realizó su identificación molecular a través de la secuenciación de regiones ITS (hongos) y 16S (bacterias) del ADN ribosomal (ADNr).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de microorganismos

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

Para el aislamiento de los microorganismos el material colectado se mezcló homogéneamente sobre papel *craft* y se tomaron al azar 10 g (base seca). Con esta muestra se prepararon diluciones seriales hasta 10^{-8} en agua desionizada destilada estéril, en $CaCl_2$ 0,01 M y en agua peptonada al 1 %. Posteriormente, se transfirieron 50 μ L a cajas de Petri que contenían medios selectivos para aislar microorganismos celulolíticos (CEL) (Wood, 1980), proteolíticos-amonificantes (PROT) (Wood, 1980), fijadores de N_2 (FBN) (Döbereiner y Day, 1976) y solubilizadores de fosfato inorgánico (PSM) (Osorio y Habte, 2001) y orgánico (FIT) (Tabatabai, 1982) (Tabla 1). Todos los medios fueron incubados a 28 °C por 72 h en condiciones de luz natural.

Las colonias microbiales que desarrollaron halos en los medios PSM, CEL, PROT y FIT se seleccionaron para ser purificados en cajas de Petri. En el caso de las bacterias se utilizó agar nu-

Tabla 1. Composición de los medios selectivos (g L⁻¹) utilizados para aislar microorganismos de cinco grupos funcionales asociados a la rizosfera de plantas de vainilla en el municipio de Sopetrán (Antioquia, Colombia).

FBN		PSM		CEL		PRO		FIT	
Dobereiner y Day (1976)		Osorio y Habte (2001)		Wood (1980)		Matsumoto <i>et al.</i> (2005)		Tabatabai (1982)	
KH ₂ PO ₄	0,4	NaCl	1,0	Carboximetil celulosa	5	Caseína	10	CaCl ₂	2
K ₂ HPO ₄	0,1	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2	NH ₄ NO ₃	1	Extracto de levadura	0,1	NH ₄ NO ₃	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4	Solución salina 0,85%	50*	KH ₂ PO ₄	1,5	KCl	0,5
NaCl	0,1	NH ₄ NO ₃	1,0	Agar-Agar	15	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5
CaCl ₂	0,02	Glucosa	10			Solución salina 0,85%	50*	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,01
FeCl ₃	0,01	Agar-Agar	8			Agar-Agar	15	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
MoO ₄ ·Na ₂ ·2H ₂ O	0,002	Roca fosfórica	3,5					Glucosa	20
Ácido málico	5							Fitato de Na	4
Azul de bromotimol	5*							Agarosa	10
Agar-Agar	15								

*mL

tritivo (AN) y para los hongos extracto de malta (EM) y papa dextrosa agar (PDA) suplementado con 50 mg mL⁻¹ de penicilina y de sulfato de estreptomycin. Luego, los cultivos se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior. En los diferentes medios, los halos indican que la actividad deseada en un microorganismo se está expresando. Por ejemplo, degradación de celulosa y de proteína (caseína) en los medios CEL y PROT, producción de acidez en el medio PSM y de fosfatasa en el medio FIT. Para el caso de las bacterias con potencial como fijadoras de N₂, el desarrollo de colonias en el medio libre de N (NH₄⁺, NO₃⁻ y aminoácidos) fue en sí mismo el indicador de la ocurrencia de dicha actividad.

Identificación molecular de los microorganismos

Extracción de ácidos nucleicos

Las bacterias obtenidas se sembraron en tubos de ensayo que contenían 5 mL de medio líquido Luria-Bertani (LB) por 24 h en agitación constante, para luego realizar el proceso de extracción de ADN mediante el método del SDS (Sambrook y Russell, 2001). Los hongos se sembraron en EM líquido y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente (20-24 °C) por 15 días para obtener abundante micelio. Al cabo de este tiempo, se procedió a obtener el micelio mediante filtración con bomba de vacío y se maceró con nitrógeno líquido, para luego extraer su ADN mediante el método del CTAB 3X (Sambrook y Russell, 2001), o alternativamente utilizando el kit comercial *DNeasy plant mini* (Qiagen, Alemania). La integridad del ADN extraído fue determinada por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, suplementado con 3 µL de bromuro de etidio (10 mg mL⁻¹) en buffer TBE 1X y visualizado en un transiluminador UV con el *software Biodoc analyze* (Biometra, Alemania). Las concentraciones de ADN obtenidas se calcularon por absorbancia a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm, utilizando un Nanodrop 2000C (Thermo, EE. UU.).

Amplificación y secuenciación de regiones ribosomales

La identificación taxonómica de los aislamientos de hongos se realizó con base en la amplificación de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 del ADNr, para esto se utilizaron los cebadores ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White *et al.*, 1990). Para el caso de las bacterias se amplificó la subunidad pequeña (16S) del ADNr con los cebadores pA (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y pc5B (5' TAC CTT GTT ACG ACT T 3') (Kuske *et al.*, 1997). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 µL conteniendo 0,5 µM de los cebadores, 1 U de Taq ADN polimerasa recombinante (Fermentas, Lituania), 0,2 mM de dNTPs, 1X de buffer de enzima, 1,8 mM de MgCl₂, 1 µL de ADN (50 ng µL⁻¹) y agua destilada estéril. En todas las reacciones se incluyó un control negativo. La amplificación se realizó en un termociclador T3 (Biometra) con un programa que consistió de una desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C (para ITS) y 60 °C (para 16S) por 30 s, 72 °C por 1 min; y una extensión final a 72 °C por 7 min. Luego de la amplificación, se tomaron 5 µL de los productos de reacción para separarlos por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %.

Una vez definida la especificidad por el tamaño de los productos amplificados (600 pb), estos se purificaron utilizando los kits *QIAquick PCR Purification* y *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen), para su secuenciación directa mediante el sistema *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (PE Applied Biosystems, EE. UU.) y su corrido en un secuenciador ABI Prism 3730xl de la compañía Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas con cada cebador, fueron editadas mediante el programa BioEdit 6.0.6 (Hall, 1999), construyéndose secuencias consenso y confirmando su identidad por comparación con las bases de datos moleculares, mediante BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

Paralelamente, se obtuvieron del GenBank secuencias de las regiones estudiadas de hongos y bacterias relacionadas taxonómicamente con los microorganismos putativamente identificados mediante el BLASTN. Para su alineación con las generadas en esta investigación, se utilizó el programa Clustal W y se realizó un análisis filogenético por el método de Neighbor-Joining, con 1000 iteraciones para determinar los valores de bootstrap. Las distancias genéticas se calcularon por el método de Kimura 2-parámetros, con el programa Mega 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

RESULTADOS

El proceso de aislamiento de los microorganismos en los medios de cultivo selectivos para diferentes grupos funcionales permitió visualizar una alta diversidad microbial asociada a la rizosfera de plantas de vainilla. Los morfotipos coloniales consistieron en 25 aislamientos de potenciales FBN, 6 de FIT, 20 de PSM, 30 de PROT y 28 de CEL, para un total de 109 cepas (9 hongos y 100 bacterias).

Identificación molecular de los microorganismos

De los 109 aislamientos originalmente obtenidos, se seleccionó para la identificación molecular al menos una cepa de cada morfotipo presente en cada medio de cultivo. De esta manera se evaluaron 44 cepas bacterianas y ocho micóticas (Tabla 2). La amplificación de los productos de PCR de las regiones ITS del ADNr de los hongos generó un fragmento de aproximadamente 600 pb con los cebadores ITS1 e ITS4. Mientras que para la región 16S del ADNr de bacterias, los amplicones obtenidos con los cebadores pA y pc5B tuvieron un tamaño aproximado de 1300-1400 pb.

Identificación molecular de bacterias

El análisis por BLASTN para las secuencias de bacterias indicó que 17 de las cepas pertenecen al género *Pseudomonas*, siete a *Bacillus*, cuatro a *Serratia*, cuatro a *Enterobacter*, tres a *Acinetobacter*, dos a *Chromobacterium* y dos al género *Klebsiella*. Además, se halló un representante de los géneros *Citrobacter*, *Acidovorax*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus* y *Curtobacterium* (Tabla 2). Estos resultados de BLASTN corresponden a un alineamiento local que conduce a identificaciones putativas. Por lo tanto, para tener mayor confiabilidad en la identificación se realizó un análisis filogenético con secuencias de referencia depositadas en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Así fue posible en la mayoría de casos la inferencia taxonómica a nivel genérico, aunque para algunas cepas fue posible plantear su hipótesis de identidad a nivel de especie. El análisis filogenético de las bacterias Gram positivas se realizó con base en 742 pb de la región 16S del ADNr e incluyó además de las secuencias obtenidas en este estudio, 23 secuencias representativas de diferentes especies, principalmente de los géneros identificados mediante BLASTN. El dendrograma resultante presentó tres clados principales (I, II y III); el primero de ellos ocupado por representantes del género *Bacillus*; el segundo clado presentó cepas de referencia de actinomicetes del género *Streptomyces* y el tercero correspondió a corynebacterias de los géneros *Curtobacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus*. De las nueve bacterias Gram positivas obtenidas en el estudio, siete se asociaron filogenéticamente con especies del género *Bacillus*, siendo dos de ellas (87MA197 y 79SEP31) identificadas como posibles miembros de la especie *B. megaterium* y las otras cinco (77SEP29, 43MA191, 95MA198, 71MA226, 174MA251), asociadas al complejo de especies *B. cereus*. Las

Tabla 2. Identificación de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla a partir de análisis por BLASTN de secuencias 16S (bacterias) e ITS (hongos) del ADNr, obtenidas en este estudio.

Aislamiento	Medio	Identidad en GenBank	Número de acceso	Tamaño del Fragmento (pb)/cobertura (%)	% Identidad	Valor e
Bacterias						
77SEP29	PROT	<i>Bacillus cereus</i>	AB592493.1	607/100	99	0,0
79SEP31	PSM	<i>Bacillus megaterium</i>	JN999852.1	572/100	99	0,0
43MA191	PROT	<i>Bacillus cereus</i>	JN999893.1	824/100	99	0,0
87MA197	CEL	<i>Bacillus megaterium</i>	JN999852.1	762/100	100	0,0
95MA198	PROT	<i>Bacillus cereus</i>	JN999893.1	622/100	100	0,0
71MA226	PROT	<i>Bacillus cereus</i>	JN999893.1	710/100	100	0,0
55MA248	CEL	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	JQ435727.1	783/100	100	0,0
59BMA249	CEL	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	AY167859.1	660/100	100	0,0
174MA251	PROT	<i>Bacillus cereus</i>	JN999893.1	713/100	99	0,0
20SEP14	FBN	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ877785.1	573/100	100	0,0
21SEP15	FBN	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ877785.1	598/100	100	0,0
22SEP16	FIT	<i>Enterobacter</i> sp.	JN634853.1	592/100	100	0,0

Continuación de la Tabla 2.

Aislamiento	Medio	Identidad en GenBank	Número de acceso	Tamaño del Fragmento (pb)/cobertura (%)	% Identidad	Valor e
Bacterias						
23SEP17	FIT	<i>Enterobacter</i> sp.	AB695204.1	575/100	100	0,0
25SEP18	PSM	<i>Pseudomonas</i> sp.	JQ320089.1	598/100	100	0,0
26SEP19	PSM	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	EF620458.1	598/100	99	0,0
27SEP20	PSM	<i>Pseudomonas</i> sp.	JQ320089.1	598/100	99	0,0
31SEP22	PROT	<i>Pseudomonas</i> sp.	JQ359108.1	598/100	100	0,0
39SEP23	PSM	<i>Pseudomonas</i> sp.	JQ320089.1	598/100	100	0,0
48SEP24	PROT	<i>Pseudomonas</i> sp.	JQ320089.1	598/100	100	0,0
58SEP25	CEL	<i>Pseudomonas</i> sp.	JQ359108.1	528/100	100	0,0
69SEP26	PSM	<i>Pseudomonas</i> sp.	JQ359108.1	500/100	100	0,0
70SEP27	PROT	<i>Serratia nematodiphila</i>	JN934387.1	596/100	100	0,0
76SEP28	PROT	<i>Acinetobacter</i> sp.	HM626417.1	598/100	100	0,0
78SEP30	PSM	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	JN848784.1	500/100	100	0,0
89SEP34	CEL	<i>Chromobacterium violaceum</i>	HM449690.1	496/100	99	0,0
90SEP35	PSM	<i>Acinetobacter</i> sp.	JQ359016.1	597/100	100	0,0
99SEP36	PROT	<i>Acinetobacter</i> sp.	JQ359016.1	597/100	100	0,0
100SEP37	FBN	<i>Pseudomonas putida</i>	AB681332.1	598/100	100	0,0
104SEP38	FBN	<i>Chromobacterium violaceum</i>	HM449690.1	496/100	99	0,0
110SEP39	FBN	<i>Enterobacter aerogenes</i>	JF700493.1	597/100	100	0,0
37MA189	PROT	<i>Flavobacterium</i> sp.	HQ231918.1	596/100	100	0,0
40MA190	PSM	<i>Pseudomonas</i> sp.	JQ320089.1	598/100	100	0,0
72MA192	PROT	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	JN848784.1	597/100	100	0,0
75MA194	PROT	<i>Serratia nematodiphila</i>	JN934387.1	597/100	100	0,0
81MA195	CEL	<i>Serratia nematodiphila</i>	JN934387.1	597/100	100	0,0
96MA199	PROT	<i>Acidovorax</i> sp.	FJ599672.1	593/100	100	0,0
97MA200	PROT	<i>Enterobacter</i> sp.	JN634853.1	597/100	99	0,0
175MA201	PROT	<i>Serratia nematodiphila</i>	JN934387.1	595/100	100	0,0
33MA221	FBN	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ877785.1	598/100	100	0,0
36MA222	FIT	<i>Pseudomonas</i> sp.	JQ320089.1	581/100	100	0,0
46MA223	FBN	<i>Pseudomonas</i> sp.	JQ359108.1	598/100	100	0,0
64MA224	FBN	<i>Pseudomonas</i> sp.	JQ359108.1	598/100	100	0,0
68MA225	PROT	<i>Pseudomonas</i> sp.	JQ359108.1	598/100	100	0,0
80MA227	CEL	<i>Citrobacter</i> sp.	JF833761.1	597/100	99	0,0
Hongos						
51SEP40	FIT	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	AB469880.1	550/100	99	0,0
52SEP41	FIT	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	AB469880.1	551/100	99	0,0
35MA158	FIT	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	AB469880.1	545/100	99	0,0
49MA159	CEL	<i>Penicillium griseofulvum</i>	EU664471.1	496/100	100	0,0
50MA160	CEL	<i>Bionectria ochroleuca</i>	EU273558.1	570/100	99	0,0
108MA163	CEL	<i>Aspergillus fumigatus</i>	HQ285569.1	599/100	99	0,0
200MA165	CEL	<i>Phoma</i> sp.	JQ388280.1	537/100	100	0,0
201MA166	PSM	<i>Fusarium</i> sp.	DQ657851.1	551/100	100	0,0

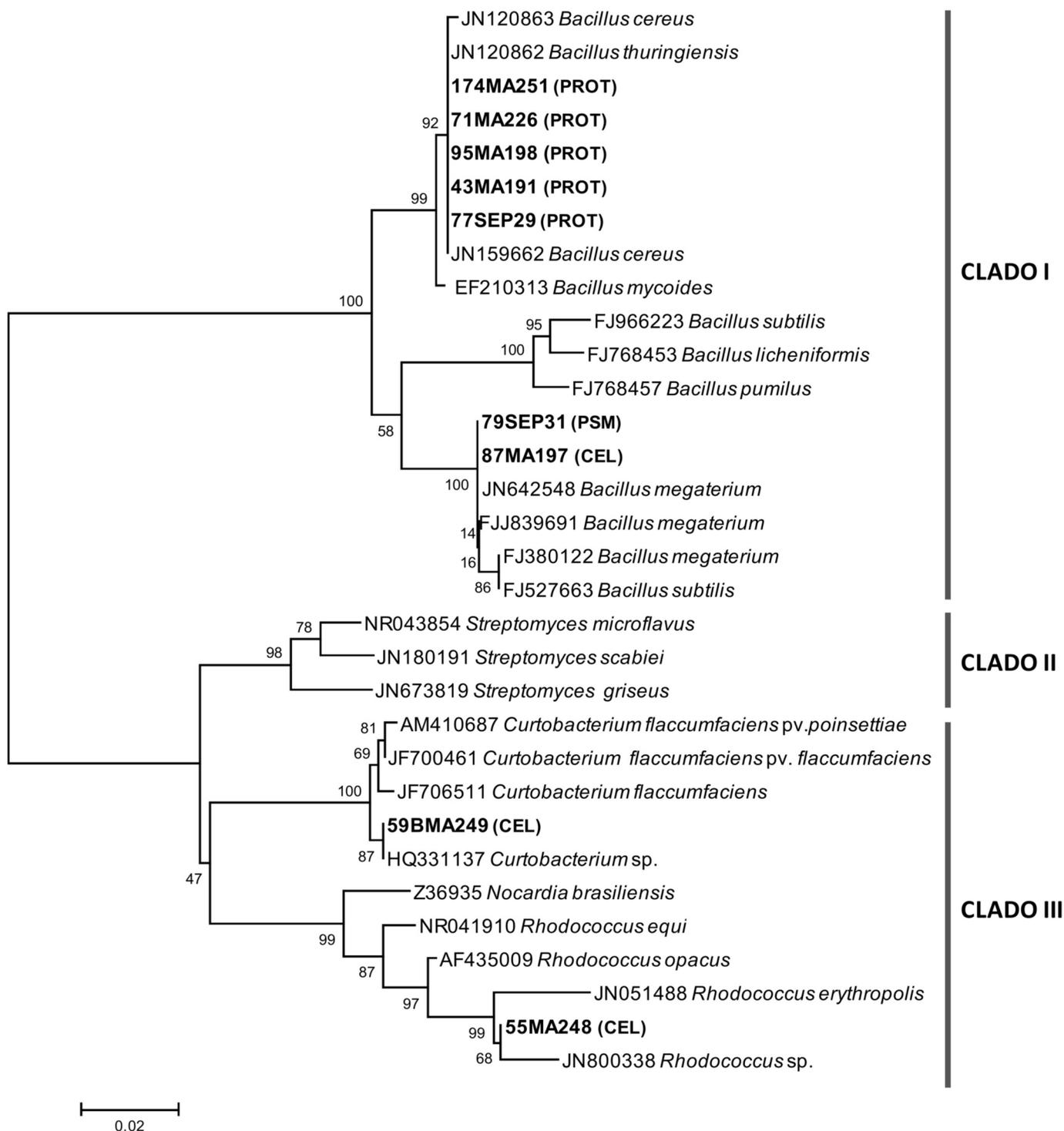


Figura 1. Árbol filogenético basado en secuencias de la región 16S del ADNr de bacterias Gram positivas provenientes de la rizosfera de plantas de vainilla en el municipio de Sopetrán (Antioquia, Colombia). Los números en las ramas indican los valores de bootstrap. Las bacterias obtenidas en este estudio se presentan en negrita, indicándose el medio a partir del cual se obtuvieron.

dos bacterias restantes, se asociaron filogenéticamente con miembros de los géneros *Curtobacterium* (59BMA249) y *Rhodococcus* (55MA248) en el clado III, aunque la resolución del análisis no permitió su identificación a nivel de especie (Fig. 1).

La matriz de identidad genética obtenida (no mostrada) arrojó valores de 1 (uno) para las cepas identificadas como *B. cereus* con representantes de este complejo de especies. Dicho valor fue de 0,997 para las cepas 87MA197 y 79SEP31

con respecto a *B. megaterium*, lo cual genera un alto soporte para su identificación a nivel de especies. Las primeras bacterias fueron aisladas en su totalidad en el medio que evalúa la capacidad proteolítica, mientras que los dos aislamientos de *B. megaterium* se obtuvieron de pruebas de celulolíticos y solubilizadores de roca fosfórica (PSM).

Por su parte, el análisis filogenético de las bacterias Gram negativas se realizó con base en 634 pb de la región 16S del ADNr y comprendió las 35 cepas obtenidas en el estudio y 51 secuencias de referencia. El dendrograma resultante presentó cinco clados principales (I a V) soportados por altos valores de *bootstrap* (>97 %) y diferentes subclados (A, B, C) (Fig. 2). El clado I representa el género *Pseudomonas* y se subdividió en tres subclados. El IA asoció a 16 de los aislamientos de este trabajo con la especie *P. koreensis*; el subclado IB presentó cepas de referencia de *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* y *P. putida*, siendo la cepa 100SEP37 asociada con esta última especie. El subclado IC agrupó a las cepas de referencia de *P. syringae*.

El segundo clado (II) asoció miembros de los géneros *Chromobacterium* (subclado IIA), *Acidovorax* (subclado IIB), y *Cupriavidus*, *Collimonas* y *Burkholderia* (subclado IIIC). En este segundo clado fue posible la identificación de las cepas 89SEP34 y 104SEP38 como miembros del género *Chromobacterium* y del aislamiento 96MA199 como *Acidovorax* spp. El clado III correspondió a representantes del género *Acinetobacter* e incluyó tres de los aislamientos (99SEP36, 90SEP35 y 76SEP28). El clado IV presentó dos subclados (A y B). El grupo IVA permitió identificar a los aislamientos 72MA192 y 78SEP30 como miembros del género *Klebsiella*, mientras que en el clado IVB se asociaron las cepas 175MA201, 81MA195, 75MA194 y 70SEP27 con *Serratia* sp.; 97MA200, 23SEP17 y 22SEP16 con el género *Enterobacter* y la cepa 80MA227 con *Citrobacter*. Finalmente, en el clado V se ubicaron representantes del género *Flavobacterium* y la cepa 37MA189 obtenida en este estudio.

Los valores de la matriz de identidad genética (no mostrada), soportan la hipótesis taxonómica de que 16 de los aislamientos son afines filogenéticamente a la especie *P. koreensis*, al compartir un valor de 0,99 con las cepas de referencia. El análisis filogenético y de identidad también permite postular con alto nivel de certeza la naturaleza de las cepas 72MA192 y 75MA194 aisladas en el estudio, porque comparten niveles de identidad de 1 y 0,994 para la región 16S del ADNr con secuencias de referencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*, respectivamente.

Por otra parte, los valores de identidad genética obtenidos para las cepas identificadas como *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Chromobacterium*, así como también de la cepa 100SEP37 asociada con *P. putida* en el análisis filogenético, indican que estas bacterias solo son identificables en este estudio a nivel genérico. De estas bacterias, llaman la atención las dos cepas de *Acinetobacter* proteolíticas asociadas a la rizosfera de vainilla y un tercer aislamiento de esta especie solubilizador de roca fosfórica.

Identificación molecular de hongos

El análisis BLASTN de secuencias ITS indicó que tres de los hongos pertenecen al género *Plectosphaerella*, mientras que se presentó un representante de los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Bionectria* y *Phoma* (Tabla 2). El análisis filogenético de los hongos obtenidos en la investigación generó un dendrograma con ocho clados (I a VIII) soportados por valores de *bootstrap* superiores a 94 % (Fig. 3). El primero de ellos representa el género anamórfico *Fusarium*, y presentó una asociación del aislamiento 201MA166 con la especie fitopatógena *F. solani*. El clado II correspondió a secuencias de referencia de *Trichoderma* sp.; mientras que el clado III agrupó a la cepa 50MA160 con un representante del género *Bionectria* (Hypocreales). El clado IV albergó representantes del ascomycete phyllachoral *Plectosphaerella* con las cepas 35MA158, 51SEP40 y 52SEP41. Los clados V y VI se presentaron asociados e incluyeron a los géneros anamórficos de hyphomycetes moniliales *Penicillium* y *Aspergillus*, siendo las especies más afines filogenéticamente a los aislamientos 49MA159 y 108MA163, *Penicillium griseofulvum* y *Aspergillus fumigatus*, respectivamente. El clado VII agrupó al aislamiento 200MA165 con miembros del género anamórfico formador de picnidios (cuerpos fructíferos asexuales) *Phoma*. Finalmente, el clado VIII correspondió a *Botryosphaeria* y a algunos de sus estados imperfectos *Lasiodiplodia*. La matriz de identidad (no mostrada) soportó la asociación genérica de los hongos identificados como *Plectosphaerella* sp. (0,9), *Bionectria* sp. (0,92) y *Phoma* sp. (1). En contraste, el aislamiento 201MA166 asociado en el dendrograma con *F. solani* y el 49MA159 asociado con *P. griseofulvum* presentaron bajos niveles de identidad con las secuencias de referencia de dichas especies. Por lo anterior, resulta preferible definir su identidad solo a nivel genérico. Finalmente, el hongo 108MA163 presentó un alto valor (0,99) de identidad con la cepa de referencia de *A. fumigatus*.

DISCUSIÓN

En este estudio se aislaron e identificaron microorganismos rizosféricos con potencial para hacer más disponibles los nutrientes en el cultivo de vainilla y así contribuir a un posterior desarrollo de biofertilizantes. De las nueve bacterias Gram positivas obtenidas, siete fueron identificadas como pertenecientes al género *Bacillus*, siendo dos de ellas posibles miembros de la especie *B. megaterium* y las cinco restantes asociadas al complejo de especies *B. cereus*. Este complejo, está conformado por las especies *B. cereus* sensu stricto, *B. thuringiensis* y *B. anthracis*, no siendo posible con la resolución que ofrecen las secuencias del ADNr 16S, diferenciar dichas especies. *B. anthracis* es una bacteria ampliamente reconocida por causar el ántrax y puede ser identificada con base en la amplificación de los genes *lef*, *cya* y *pag* del plásmido pXO1. *B. thuringiensis* se diferencia de las demás especies, porque tiene la capacidad de producir inclusiones cristalinas de proteína (endotoxinas) durante la esporulación. Jensen *et al.* (2003) indican que para la identificación molecular de estas especies es necesaria la

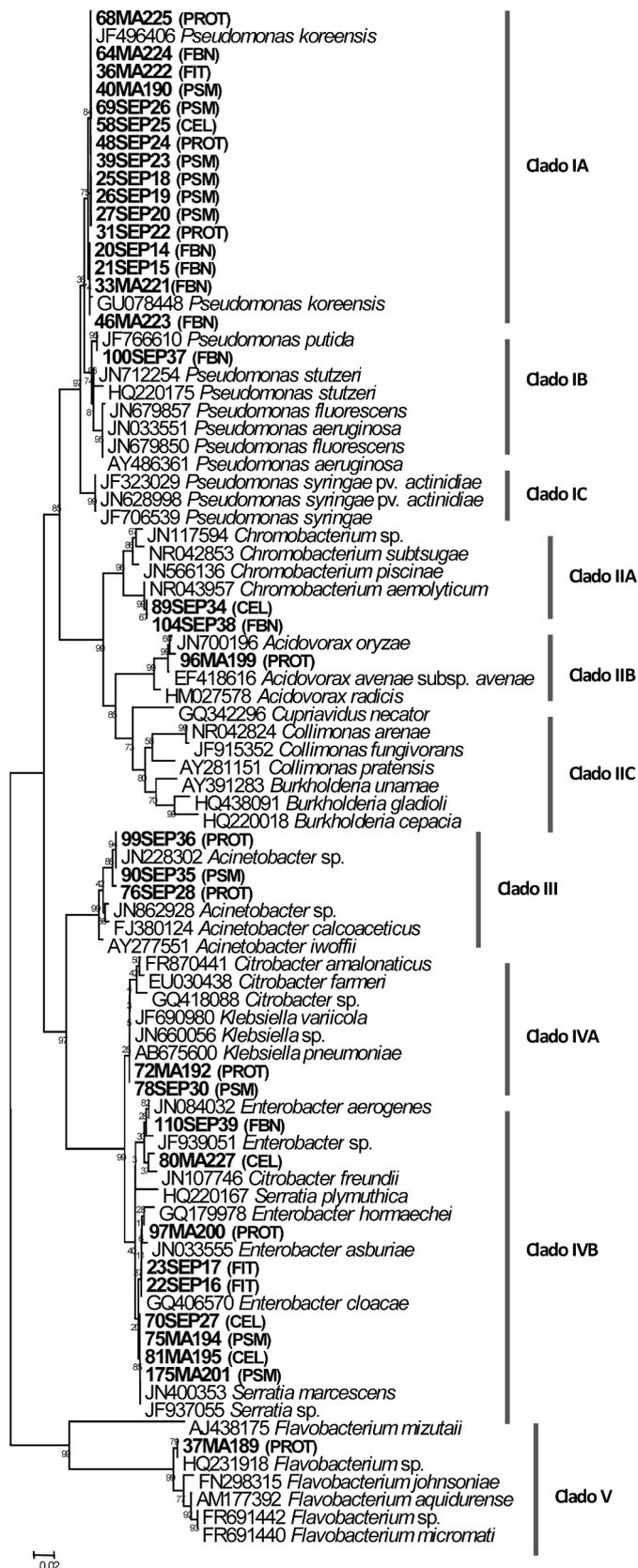


Figura 2. Árbol filogenético basado en secuencias de la región 16S del ADNr de bacterias Gram negativas provenientes de la rizosfera de plantas de vainilla en el municipio de Sopetrán (Antioquia, Colombia). Los números bajo las ramas indican los valores de bootstrap. Las bacterias obtenidas en este estudio se presentan en negrita, indicándose el medio a partir del cual se obtuvieron.

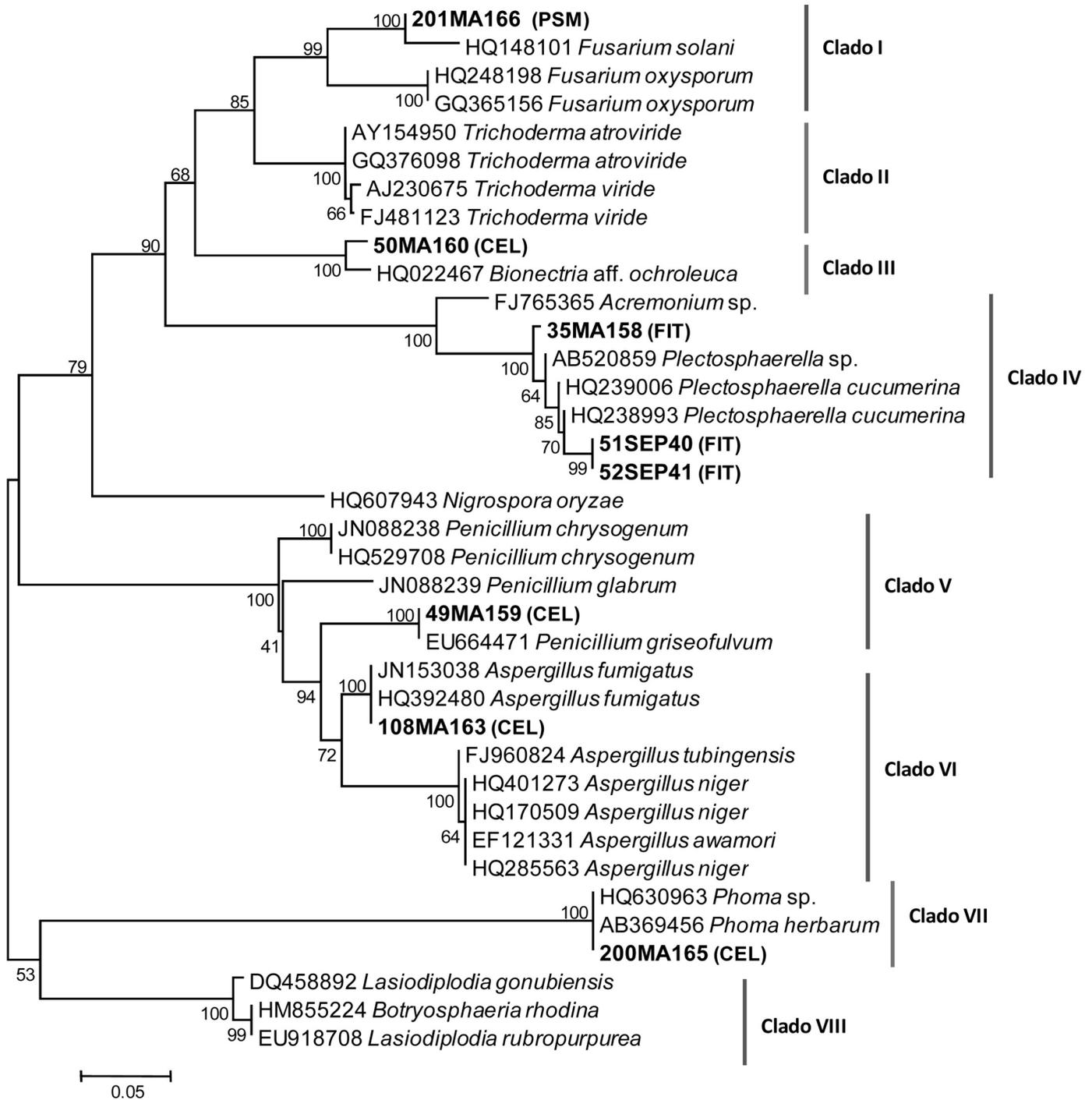


Figura 3. Árbol filogenético basado en secuencias de la región ITS del ADNr de hongos provenientes de la rizosfera de plantas de vainilla en el municipio de Sopetrán (Antioquia, Colombia). Los números en las ramas indican los valores de bootstrap. Los hongos obtenidos en este estudio se presentan en negrita, indicándose el medio a partir del cual se obtuvieron.

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

Por su parte *B. megaterium* es una bacteria ampliamente investigada que se caracteriza por su capacidad promotora de crecimiento vegetal a partir de la producción de compuestos volátiles, la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y el incremento en el número y longitud de pelos radiculares y raíces secundarias (Zou *et al.*, 2010). Esta bacteria ha sido

reportada también promoviendo el crecimiento en plántulas de *Phaseolus vulgaris*, gracias al aumento en la producción de citoquininas en las plantas inoculadas (Ortíz-Castro *et al.*, 2008) y como solubilizadora de fosfatos y biocontroladora de patógenos en *Capsicum annuum* (Akgül y Mirik, 2008). En forma similar, López *et al.* (2010), estudiando la comunidad bacteriana endofítica presente en raíces y semillas de tres variedades de frijol a partir de análisis de secuencias 16S del ADNr, encontraron que *B. megaterium* se encontraba frecuentemente en las raíces de dos de las variedades evaluadas, y adicionalmente que dichos aislamientos tenían capacidad de solubilizar fitato. Por lo anterior, el aislamiento obtenido de *B. megaterium* en este estudio presenta un potencial como PGPR en plantas de vainilla y debería ser considerado en el futuro para ser evaluado como biofertilizante bajo condiciones de campo.

El análisis filogenético de las bacterias Gram negativas generó cinco clados principales (I a V), siendo mayoritario el clado I, que representó al género *Pseudomonas*. Las bacterias de este género están ampliamente distribuidas en los suelos agrícolas y tienen diversas funciones relacionadas con la descomposición de materia orgánica y la promoción del crecimiento de las plantas, aunque algunas pueden tener también efectos patogénicos (Saharan y Nehra, 2011). En este trabajo, 16 de los aislamientos fueron identificados como *P. koreensis*, una especie aislada por primera vez de suelos agrícolas de Corea (Kwon *et al.*, 2003) y taxonómicamente afín al grupo de las *Pseudomonas* fluorescentes. *P. koreensis* ha sido reportada como una alternativa promisoría para el biocontrol de Oomycetes que producen zoosporas y que son reconocidos patógenos de diversos cultivos (Hultberg *et al.*, 2010). Kitamura *et al.* (2010), encontraron que varios representantes del género *Pseudomonas*, incluyendo a *P. koreensis*, son capaces de sintetizar una amida del ácido succínico, compuesto que es un promotor del crecimiento de las plantas. Adicionalmente, se ha reportado que miembros del género *Pseudomonas* aislados de nódulos de raíces de leguminosas, presentan afinidad filogenética con *P. putida*, *P. koreensis* y *P. fluorescens*, entre otros (Issar *et al.*, 2012).

De gran interés resultará evaluar en el futuro el papel principal de esta bacteria en la rizosfera de las plantas de vainilla, ya que fue principalmente detectada creciendo en medio selectivo para bacterias con potencial de fijación de N₂ y solubilizadores de P. La capacidad para fijar nitrógeno por parte de bacterias del género *Pseudomonas* ha sido ampliamente debatida. Sin embargo, recientemente se ha confirmado inequívocamente dicha actividad mediante pruebas bioquímicas en especies como *P. stutzeri* y *P. azotifigens* (Desnoves *et al.*, 2003, Hatayama *et al.*, 2005). En adición, Yu *et al.* (2011), secuenciaron el genoma completo de una cepa de *P. stutzeri* utilizando el sistema Roche/454 GS FLX, y encontraron la presencia no solo del gen *nifH*, sino también de al menos 42 genes que codifican para las proteínas del aparato de desnitrificación, asociado al metabolismo de bac-

terias asimbióticas fijadoras de nitrógeno. Por esto, en trabajos futuros se podrá confirmar la actividad de fijación biológica de N₂ en *P. koreensis* a partir de pruebas de reducción de acetileno a etileno o mediante la detección directa por PCR del gen *nifH*.

Por otra parte, el análisis filogenético también permitió asociar con alto nivel de certeza la identidad de dos cepas con secuencias de referencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*. Estas bacterias son reconocidas por su condición de saprófitas facultativas, frecuentemente encontradas en aguas, suelos y otros sustratos que tienen contacto con estiércol de animales, pues algunas de sus especies son habitantes comunes del tracto digestivo y urinario de diversos mamíferos. Así, *K. pneumoniae*, que es clínicamente el más reconocido representante del género *Klebsiella*, es un patógeno importante en infecciones nosocomiales que se caracteriza por tener una gran cápsula externa de polisacáridos. Sin embargo, en forma natural está presente en los suelos y puede ser aislada de la superficie de las raíces de algunas plantas. Esta bacteria ha sido muy estudiada como una bacteria diazotrofa de vida libre, pues al menos 30 % de las cepas pueden fijar N₂ en condiciones anaeróbicas (Reinhardt *et al.*, 2008). Ya que las cepas de *K. pneumoniae sensu stricto* asociadas con plantas vivas o en descomposición son en general diferentes de las que están asociadas con infecciones en humanos (las primeras utilizan 5-ketogluconato como única fuente de carbono y carecen de cápsulas) (Brisse *et al.*, 2006), resultará de interés evaluar dichas características en las cepas aquí identificadas, de manera que sea posible definir su viabilidad como potenciales biofertilizantes en cultivos de vainilla.

Con respecto a la otra enterobacteria detectada, *E. cloacae*, se debe indicar que puede llegar a ser un importante patógeno nosocomial, aunque también se ha encontrado frecuentemente en frutas y vegetales. Junto con las especies *E. asburiae* y *E. aerogenes* forman el complejo *E. cloacae* y con el fin de confirmar inequívocamente el resultado aquí presentado, sería de gran interés secuenciar genes funcionales como *RpoB*, *gyrA* y *mdh*, entre otros. Las infecciones causadas por este patógeno causan la más alta tasa de mortalidad humana comparado con otras infecciones de *Enterobacter* (Grimont y Grimont, 2006a). Aunque este microorganismo tiene cepas patógenas de humanos, algunos aislamientos han sido usados como agentes de control biológico de Oomycetes que causan la pudrición de las semillas de pepino tales como *Pythium ultimum*, y como controlador de algunos insectos plaga (Dijk y Nelson, 2000). Esto representa un posible uso en el manejo de Oomycetes del suelo que afectan la vainilla (ej. *Phytophthora meadii*).

Dada la utilización de estiércol de caprinos en el sustrato de crecimiento de plantas de vainilla, no resultan sorprendidos dichos aislamientos; por el contrario, estos hallazgos llaman la atención sobre la necesidad de realizar un proceso de compostaje completo con los residuos de origen animal utilizados, de manera que prevalezcan unas condiciones de bioseguridad para los productores y consumidores de vainilla.

Otra bacteria Gram negativa que resultó representativa de los microorganismos proteolíticos obtenidos en el estudio fue *Serratia* sp. Algunas bacterias del género *Serratia* se caracterizan por formar el pigmento producido como metabolito secundario prodigiosina, cuya función aún no es bien conocida. Esta pigmentación sólo se presenta en un bajo porcentaje de cultivos aislados y es dependiente de la especie y de las condiciones de incubación. Algunas especies de *Serratia* se encuentran frecuentemente en aguas, suelos, plantas, material vegetal en descomposición y ocasionalmente en el intestino de diversos animales invertebrados (Grimont y Grimont, 2006b). *S. marcescens* ha sido ampliamente reportada como una bacteria eficiente en la solubilización de fosfato inorgánico, con potencial para su uso en la extracción de P insoluble en minas naturales de este elemento (Farhat *et al.*, 2009).

Con respecto a los miembros del género *Acinetobacter* identificados en el estudio, es importante indicar que dichas bacterias se caracterizan por ser saprófitas habitantes de suelos, cuerpos de agua, aguas residuales, alimentos y por no ser fermentativas. Diferentes estudios han indicado que esta bacteria es también una importante PGPR y, por tanto, podría ser formulada como biofertilizante de amplio espectro por su capacidad probada para solubilizar fosfatos, fijar N₂ y producir ácido indolacético (AIA) (Indiragandhi *et al.*, 2008; Gulati *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha encontrado que bacterias del género *Acinetobacter*, además de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Rhizobium* y *Mycobacterium* tienen capacidad de producir AIA (Tsavkelova *et al.*, 2007). El AIA de origen microbiano es altamente relevante en la promoción de la germinación de orquídeas, cuando las cepas bacterianas están en estrecha relación con las semillas (Tsavkelova *et al.*, 2007). Esta situación plantea una interesante línea de investigación con las cepas de estos géneros obtenidos en el presente estudio, dados los problemas de latencia que experimentan las semillas de vainilla en nuestro medio.

En relación con las demás bacterias identificadas en el estudio, es de notar la alta diversidad de géneros encontrados, incluyendo *Rhodococcus*, *Curtobacterium*, *Flavobacterium*, *Acidovorax* y *Chromobacterium*. Su presencia sugiere la existencia en la rizosfera de vainilla de una compleja red de procesos metabólicos que desempeñan diversas funciones en la descomposición de los sustratos utilizados para el establecimiento y la nutrición de esta planta. Así por ejemplo, se destaca el efecto de *Rhodococcus* en la producción de sideróforos, que conducen a la formación de complejos solubles de Fe que pueden ser tomados por diversas especies vegetales. De igual manera, se ha confirmado que esta bacteria es solubilizadora de fosfatos mediante el mecanismo de producción de ácidos orgánicos (Saharan y Nehra, 2011).

Con respecto a la identificación de hongos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla, se encontraron representantes de los géneros *Plectosphaerella*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Bionectria* y *Phoma*, siendo muy llamativo el hecho que algunos de estos (ej. *Fusarium* y *Phoma*) pudieran ser po-

sibles fitopatógenos de las raíces de plantas de vainilla. Esto conduce a plantear la necesidad de extremar los cuidados con respecto al origen y tratamiento de los sustratos utilizados para el establecimiento de los cultivos. Un mal uso de estas fuentes puede llevar a la dispersión generalizada de patógenos limitantes del cultivo en el país, lo cual afectaría aún más los planes de su expansión. En este sentido, recientemente Santa *et al.* (2012) realizaron un estudio tendiente a evaluar los hongos asociados a la pudrición basal de las plantas de vainilla, el principal problema fitosanitario de este cultivo en el mundo (Pinaría *et al.*, 2010), y encontraron que la especie *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* corresponde al agente causal de dicha enfermedad. Pero adicionalmente, identificaron otros hongos de los géneros *Fusarium*, *Phoma* y *Lasiodiplodia* en plantas con síntomas de necrosis de tallos, lo que coincide plenamente con los resultados de este trabajo. El estudio también identificó a tres de los aislamientos micóticos como miembros del género *Plectosphaerella* y activos en la solubilización de fitato, lo cual los señala como posibles componentes del proceso de solubilización de las fuentes orgánicas de P presentes en macromoléculas de los sustratos utilizados en este cultivo. El fitato es un derivado del mioinositol presente como fuente de almacenamiento de P en diversos tejidos de plantas y especialmente en semillas (Raboy, 2003). En nuestro conocimiento, este es el primer estudio donde se indica indirectamente la capacidad de este hongo para producir fitasas, lo cual representa un importante hallazgo no sólo por su posible utilización como biofertilizante, sino también por su potencial como fuente de enzimas para la industria de alimentación animal, tal como ocurre con hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* y *Rhizopus* (Vats y Banerjee, 2004). Adicionalmente a los hongos mencionados, en este trabajo también fue posible la identificación de *A. fumigatus*, *P. griseofulvum* y *Bionectria* sp. Los dos primeros hongos son conocidos saprófitos habitantes de diversos sustratos, donde cumplen importantes funciones como degradadores de materia orgánica y fundamentalmente de los componentes de la pared celular de las plantas, gracias a sus múltiples enzimas hidrolíticas que incluyen celulasas, pectinasas y lacasas (de Vries y Visser, 2001). *Bionectria* por su parte, es un género de Ascomycetes del orden Hypocreales que incluyen saprófitos degradadores de madera, hojarasca y algunas especies micoparasíticas (Schroers, 2001).

Este estudio representa un primer avance en el reconocimiento de la microflora asociada a la rizosfera de un cultivo de vainilla en Colombia. En él se encontró un alto nivel de diversidad con respecto a los géneros y especies de hongos y bacterias identificados, que brinda una importante fuente de información sobre la utilización potencial de microorganismos como biofertilizantes, controladores biológicos o simplemente aceleradores de la descomposición de sustratos orgánicos. Adicionalmente, se identificaron bacterias con posibles problemas de bioseguridad por su condición dual de patógenas humanas y saprófitas, y posibles hongos fitopatógenos asocia-

dos a la rizosfera de plantas de vainilla. Ambas situaciones ameritan realizar esfuerzos para certificar la inocuidad de los sustratos de cultivo y su manejo adecuado en los procesos de compostaje, propios de este tipo de explotaciones agrícolas.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se financió con recursos del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia (proyecto 082-2008V6151-3701) y de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, CORANTIOQUIA y BIOANDES Ltda. Se agradece el apoyo administrativo y técnico brindado por María Claudia Díez y Juan Esteban Calle.

BIBLIOGRAFÍA

- Akgül DS, Mirik M. Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. *J Plant Pathol.* 2008;90(1):29-34.
- Anandaraj M, Rema J, Sasikumar B, Suseela-Bhai R. *Vanilla* (Extension pamphlet). Kerala, India: Indian Institute of Spices Research; 2005. p. 11.
- Anilkumar AS. *Vanilla* cultivation: A profitable agri-based enterprise. *Kerala call.* 2004;1:26-30.
- Brisse S, Grimont F, Grimont PA. The genus *Klebsiella*. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria.* 3rd ed. New York: Springer; 2006. p. 159-196.
- Castro BG. Evaluación del cultivo y producción de vainilla en la zona de Papantla, Veracruz, México. [Tesis de Doctorado]: Veracruz: Instituto de Ecología; 2008. p. 93.
- Damirón VR. La vainilla y su cultivo. Veracruz: Dirección General de Agricultura y Fitosanitaria del estado de Veracruz; 2004. p. 50.
- De Vries RP, Visser J. Polysaccharides degradation of plant cell wall enzymes involved in *Aspergillus*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65(4):497-522.
- Desnoues N, Lin M, Guo X, Ma L, Carreño R, Elmerich C. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology.* 2003; 149(8):2251-2262.
- Dijk KV, Nelson EB. Fatty acid competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and Damping-Off. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(12):5340-5347.
- Döbereiner J, Day JM. Associative simbiose in subtropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. En: Newton WE, Nyman, CJ, editors. *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation.* Pullman: Washington State University Press; 1976. p. 518-538.
- Farhat MB, Farhat A, Bejar W, Kammoun R, Bouchaala K, Fourati A, *et al.* Characterization of the mineral phosphate solubilizing activity of *Serratia marcescens* CTM 50650 isolated from the phosphate mine of Gafsa. *Arch Microbiol.* 2009;191(11):815-824.
- Grimont F, Grimont PA. The genus *Serratia*. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria.* 3rd ed. New York: Springer; 2006a. p. 219-244.
- Grimont F, Grimont PA. The genus *Enterobacter*. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria.* 3rd ed. New York: Springer; 2006b. p. 197-214.
- Gulati A, Vyas P, Rahi P, Kasana R. Plant growth-promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. *Curr Microbiol.* 2009;58(4):371-377.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41(1):95-98.
- Hatayama K, Kawai S, Shoun H, Ueda Y, Nakamura A. *Pseudomonas azotifigens* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium isolated from a compost pile. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55(4):1539-1544.
- Hernández HJ, Lubinsky P. Cultivation Systems. En: Odoux E, Grisoni M, Editors. *Vanilla.* Boca Raton: CRC Press; 2010. p. 75-95.
- Hultberg M, Alsberg T, Khalil S, Alsanius B. Suppression of disease in tomato infected by *Pythium ultimum* with a biosurfactant produced by *Pseudomonas koreensis*. *Biocontrol.* 2010;55(3):435-444.
- Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, Sa TM. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Curr Microbiol.* 2008;56(4):327-333.
- Issar S, Sharma S, Kumar CD, Kumar GH, Gaur RK. Molecular characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from root nodules of various leguminous plants of Shekhawati Region, Rajasthan, India. *Am J Plant Sci.* 2012;3(1):60-63.
- Jensen Gb, Hansen Bm, Eilenberg J, Mahillon J. The hidden lifestyles of *B. cereus* and relatives. *Environ Microbiol.* 2003;5(8):631-640.
- Kitamura T, Soejima H, Sugiyama T. U.S. Patent No. 2010/0248314A1. Process for production of succinic acid amide compound. Sumimoto Chemical Company. Tokio: Patent Application Publication; 2010. p. 5.
- Kuske CR, Bams SM, Busch JD. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid Southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(9):3614-3621.
- Kwon SW, Kim JS, Park I, Yoon SH, Park DH, Lim C, *et al.* *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53(1):21-27.
- Ledezma E, Ramirez G, Pino-Benitez N. Forest orchids of the Choco region. *Lyonia.* 2006;10(1):17-31.
- López A, Rogel Ma, Ormeño E, Martínez J, Martínez E.

- Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Syst Appl Microbiol.* 2010;3(6):322-327.
- Moreno F, Díez MC, (Editores). Cultivo de vainilla. Contribuciones para el desarrollo de su cadena productiva en Colombia. Medellín: Universidad Nacional de Colombia; 2011. p. 109.
- Ortíz R, Valencia E, López J. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. *Plant Signal Behav.* 2008;3(4):263-265.
- Osorio A, Gómez N, Arango D, Moreno F, Díez M, Osorio W. Establecimiento y manejo del cultivo de vainilla. En: Moreno F, Díez MC, editores. Cultivo de vainilla. Contribuciones para el desarrollo de su cadena productiva en Colombia. Medellín: Universidad Nacional de Colombia; 2011. p. 45-58.
- Osorio W, Habte M. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and P solubilizing fungus on growth and plant P uptake of *Leucaena leucocephala* in an Oxisol. *Arid Land Res Mgmt.* 2001;15(3):263-274.
- Pinaria AG, Liew EC, Burgess LW. *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. *Australas Plant Pathol.* 2010;39(2):176-183.
- Raboy V. Myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry.* 2003;64(6):1033-1043.
- Reinhardt EL, Ramos PL, Manfio GP, Barbosa HR, Pavan C, Moreira-Filho CA. Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at São Paulo state. *Braz J Microbiol.* 2008;39(3):414-422.
- Saharan BS, Nehra V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A critical review. *Life Sci Med Res.* 2011(1);21:1-30.
- Santa C, Marín M, Díez MC. Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia. *Rev Mex Micol.* 2012;35(1):23-34.
- Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p. 2231.
- Schroers HJ. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, Hypocreales, Bionectriaceae) and its *Clonostachys anamorphs*. *Stud. Mycol.* 2001;46:1-214.
- Smith S, Read D. *Mycorrhizal symbiosis.* 2 ed. Londres: Academic Press; 1997. p. 605.
- Surendra GK, Mathew SK, Nazeem PA. Development of plant growth promoting microorganisms consortia technology for *ex vitro* establishment of micropropagated vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). [Citado junio de 2011]; Disponible en: URL: <http://www.kauhort.in/Agri%20Microbiology.htm>.
- Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA. *Principles and applications of soil microbiology.* New Jersey: Prentice Hall; 1999. p. 550.
- Tabatabai MA. Soil enzymes, En: Page AL, Miller RH, Kineey DR, editors. *Methods of soil analysis, part two, chemical and microbiological properties.* Madison: ASA-SSSA; 1982. p. 903-947.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28(10):2439-2442.
- Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Klimova SY, Shestakov AI, Botina SG, Netrusov AI. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Arch Microbiol.* 2007;188(6):655-664.
- Vats P, Banerjee UC. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme Microb. Technol.* 2004;35(1):3-14.
- Yu H, Yuan M, Lu W, Yang J, Dai S, Li Q, *et al.* Complete Genome Sequence of the Nitrogen-Fixing and Rhizosphere-Associated Bacterium *Pseudomonas stutzeri* Strain DSM4166. *J. Bacteriol.* 2011;193(3):3422-3423.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A guide to methods and applications.* New York: Academic Press; 1990. p. 315-322.
- Wood PJ. Specificity in the interactions of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr Res.* 1980;85(2):271-287.
- Zou C, Li Z, Yu D. *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. *J Microbiol.* 2010;48(4):460-466.

