



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Presentada para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

por

Mónica María Ríos Lozano  
Ingeniero Biotecnólogo

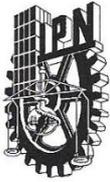
TITULO DE LA TESIS

Producción de inóculos para incrementar la producción de cultivos de *Carica papaya*

Dirigida por

Dr. Claudio Garibay Orijel  
Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

México, D.F. Agosto del 2010



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D. F. siendo las 12:00 horas del día 30 del mes de Julio del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de UPIBI-IPN para examinar la tesis titulada:  
Producción de inóculos para incrementar la producción de cultivos de *Carica papaya*

Presentada por el alumno:

<u>Ríos</u> Apellido paterno	<u>Lozano</u> Apellido materno	<u>Mónica María</u> Nombre(s)							
		Con registro:	B	0	8	1	9	4	0

aspirante de:

Maestro en Ciencias en Bioprocesos

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dr. Claudio Garibay Orijel

Director de tesis

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona

Dr. Edgar Salgado Manjarrez

Dra. María del Carmen Oliver Salvador

Dra. María del Carmen Villegas Hernández

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Edgar Salgado Manjarrez



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL  
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACION



# **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

## **SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

### **CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D.F. el día 9 del mes de Agosto del año 2010, la que suscribe Mónica María Ríos Lozano alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos con número de registro B081940, adscrito a la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Claudio Garibay Orijel y Dr. Jesús Agustín Badillo Corona y cede los derechos del trabajo intitulado Producción de inóculos para incrementar la producción de cultivos de *Carica papaya*, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [mm.rioslozano@gmail.com](mailto:mm.rioslozano@gmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Mónica María Ríos Lozano

## **Declaración de originalidad**

“Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y, finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita.”

Mónica María Ríos Lozano.

Vo. Bo.

Dr. Claudio Garibay Orijel.

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona.

## **Créditos**

El trabajo de esta tesis se realizó en el laboratorio de Biotecnología molecular del departamento de Bioprocesos de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Claudio Garibay Orijel y del Dr. Jesús Agustín Badillo Corona.

Para el desarrollo de esta tesis de Maestría se tuvo el apoyo del CONACYT a través de la beca-crédito No. 272838.

A la Profesora Verónica Gabriela Luna Fontaine, por ayudarme en la caracterización bioquímica y por encontrar en usted siempre una amiga.

## **Comité Tutorial**

Dr. Claudio Garibay Orijel (1). (DIRECTOR DE TESIS)

Dr. Jesús Agustín Badillo Corona (2). (DIRECTOR DE TESIS)

Dr. Edgar Salgado Manjarrez (1). (ASESOR)

Dra. María del Carmen Oliver Salvador (2). (ASESOR)

Dra. María del Carmen Villegas Hernández (3). (ASESOR)

(1) Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. Laboratorio de Bioingeniería.

(2) Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. Laboratorio de Biotecnología Molecular.

(3) Escuela Nacional de Ciencia Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada.

## Agradecimientos

A Dios gracias por darme la oportunidad de estar aquí y poder lograr una meta más en mi vida.

A mi papá, mamá y hermana: José Alfredo Ríos Becerril, Delfina Lozano Velázquez y Laura Guadalupe Ríos Lozano gracias por creer en mis sueños y ser siempre participes de ellos, por sus ánimos, orientación y apoyo incondicional, los amo.

A mi novio José Roberto López Ruíz por ser mi mejor amigo y compañero en estos últimos 4 años, ayudándome a recobrar la confianza en los tiempos de desesperación y duda, por tu paciencia, consejos y todo tu amor hacía mí, gracias.

A toda mi familia en especial a mis abuelitos y tía: Juan Ríos Acevedo, María Mónica Enedina Becerril García y María Angélica Ríos Becerril por aguantarme en su casa durante 6 años y por todo su apoyo brindado, gracias.

Al Dr. Claudio Garibay Orijel y al Dr. Jesús Agustín Badillo Corona, por su infinito apoyo, consejo, estímulo y principalmente gracias por confiar en mí, fue en un placer trabajar con ustedes.

A los asesores de esta tesis, el Dr. Edgar Salgado Manjarrez, la Dra. María del Carmen Oliver Salvador y la Dra. María del Carmen Hernández Villegas, gracias por todos sus consejos y críticas constructivas realizadas a esta tesis.

A Luis Andrés Lara Martínez y Jessica Valeria Guerrero Torres por todos los momentos maravillosos que pasamos juntos, por su confianza, amistad y principalmente por todo su apoyo, los quiero.

A la gente del laboratorio de Biotecnología Molecular en especial a César y Marisol.

A Rafa y Montse y a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron a cumplir esta meta, gracias.

# Contenido

Créditos .....	iii
Agradecimientos .....	v
Índice de Figuras .....	viii
Índice de Tablas .....	ix
Resumen .....	x
Abstract .....	xi
1. Introducción .....	1
1.1. <i>Carica papaya</i> .....	1
1.1.1. Usos y aplicaciones de <i>C. papaya</i> en la industria .....	2
1.1.2. Distribución de los productores de <i>C. papaya</i> .....	2
1.1.3. Panorama actual en México .....	3
1.2. Inoculantes .....	4
1.2.1. Técnicas de inoculación de cultivos .....	5
1.2.2. Inoculantes y su marco regulatorio .....	6
1.2.3. Inoculantes en el mercado .....	8
1.3. Los microorganismos del suelo .....	10
1.3.1. Actinomicetos .....	12
1.3.2. Algas .....	13
1.3.3. Protozoarios .....	14
1.3.4. Hongos .....	14
1.3.5. Bacterias .....	15
1.4. Mecanismos de identificación de bacterias presentes en el suelo .....	16
1.4.1. Caracterización bioquímica .....	18
1.4.2. Caracterización molecular 16S rDNA .....	19
2. Justificación .....	21
3. Hipótesis .....	21
4. Objetivos .....	22
4.1. Objetivo general .....	22
4.2. Objetivos específicos .....	22
5. Materiales y métodos .....	23
5.1. Estrategia experimental .....	23
5.2. Etapa 1: Identificación de las bacterias aerobias autóctonas de la rizosfera de <i>C. papaya</i> .....	24
5.2.1. Aislamiento de bacterias aerobias de la rizosfera de <i>C. papaya</i> .....	24
5.2.2. Análisis macroscópico y microscópico de las bacterias aisladas .....	24
5.2.3. Caracterización bioquímica de las bacterias aisladas .....	25
5.2.4. Caracterización molecular de las bacterias aisladas .....	26
5.2.5. Conservación de las bacterias identificadas .....	29
5.3. Etapa 2: Producción de inoculantes a nivel laboratorio .....	29
5.3.1. Producción de los inoculantes a partir de las bacterias aisladas seleccionadas .....	29
5.4. Etapa 3: Pruebas de los inoculantes a nivel laboratorio .....	30
5.4.1. Obtención del material de propagación .....	30
5.4.2. Ensayos de producción de <i>C. papaya</i> .....	31
5.4.3. Inoculación de tratamientos seleccionados .....	31

5.4.4.	Medición de variables respuesta en el cuarto de cultivo .....	33
5.5.	Análisis de datos .....	33
5.5.1.	Análisis estadístico GraphPad Prism 5.....	33
6.	Resultados y discusión .....	35
6.1.	Aislamiento de microorganismos.....	35
6.2.	Análisis macroscópico y microscópico .....	36
6.3.	Caracterización bioquímica de los microorganismos aislados .....	39
6.4.	Caracterización molecular de los microorganismos aislados.....	42
6.5.	Análisis filogenético.....	44
6.6.	Identificación de los microorganismos de la rizosfera de <i>C. papaya</i> .....	46
6.7.	Selección de las cepas aisladas con potencial para ser utilizadas como inoculantes en los cultivos de <i>C. papaya</i> .....	48
6.8.	Producción de inoculantes .....	49
6.9.	Ensayo de cultivo de <i>C. papaya</i> inoculado con diferentes tratamientos bajo condiciones de cuarto de cultivo.....	51
6.10.	Variables respuesta .....	53
6.10.1.	Porcentaje de emergencia de plántulas.....	53
6.10.2.	Tiempo de germinación .....	54
6.10.3.	Número de hojas .....	55
6.10.4.	Altura de la planta .....	56
6.11.	Efectividad de los inoculantes .....	57
7.	Conclusiones .....	60
8.	Perspectivas para trabajos futuros.....	61
9.	GLOSARIO.....	62
10.	Referencias .....	63
	ANEXOS.....	70

## Índice de Figuras

Figura 5-1. Diagrama de Flujo de la estrategia experimental .....	23
Figura 5-2. Diseño Completamente al Azar (DCA) de los tratamientos a probar en los cultivos de <i>C. papaya</i> a nivel laboratorio.....	32
Figura 6-1. Aislado MMRL11 de la rizosfera de <i>C. papaya</i> .....	35
Figura 6-2. Microscopía de cepas MMRL4 y MMRL5 con el objetivo 100X.....	38
Figura 6-3. Árbol filogenético utilizando secuencias completas.....	45
Figura 6-4. Árbol filogenético utilizando secuencias incompletas.....	46
Figura 6-5. Curva de crecimiento de las de cepas de <i>Bacillus</i> .....	50
Figura 6-6. Porcentaje de emergencia de plántulas de los tratamientos probados en los cultivos de <i>C. papaya</i> .....	54
Figura 6-7. Efecto de los tratamientos sobre el tiempo de germinación en los cultivos de <i>C. papaya</i> .....	55
Figura 6-8. Efecto de los tratamientos en el número de hojas de las plántulas de <i>C. papaya</i> a los 65 días de sembradas. ....	56
Figura 6-9. Efecto de los tratamientos en la altura de la planta de <i>C. papaya</i> a los 65 días de sembrada.....	57
Figura 6-10. Plántula de <i>C. papaya</i> inoculada con el tratamiento 2. Plántula de papaya germinada a los 30 días.....	58
Figura 6-11. Comparación de la altura de la planta.....	59

## Índice de Tablas

Tabla 1-1. Composición nutricional de la pulpa de papaya. ....	1
Tabla 1-2. Principales países productores de papaya.....	2
Tabla 1-3. Principales países exportadores de papaya.....	3
Tabla 1-4. Microorganismos aislados del suelo utilizados en algunos de los productos microbianos comerciales .....	9
Tabla 1-5. Bacterias utilizadas en inoculantes comerciales para <i>C. papaya</i> .....	10
Tabla 1-6. Concentración de microorganismos en un gramo de suelo .....	11
Tabla 1-7. Pruebas bioquímicas utilizadas frecuentemente para la identificación de bacterias según Bergey .....	19
Tabla 5-1. Iniciadores diseñados para la amplificación de la región 1-900 del gen 16S rDNA de bacterias por PCR.....	28
Tabla 5-2. Diluciones realizadas a los diferentes tiempos durante la cinética para la determinación del tiempo en que se alcanza una población $1 \times 10^9$ UFC/mL.....	30
Tabla 5-3. Tratamientos a probar en los cultivos de <i>C. papaya</i> a nivel laboratorio.....	32
Tabla 6-1. Análisis macroscópico de las bacterias aisladas de la rizosfera de <i>C.</i> <i>papaya</i> en medio AN y MAES.....	36
Tabla 6-2. Análisis microscópico de los microorganismos aislados de la rizosfera de <i>C.</i> <i>papaya</i> .....	38
Tabla 6-3. Pruebas bioquímicas para la identificación de los microorganismos aislados de la rizosfera de <i>C. papaya</i> .....	41
Tabla 6-4. Identificación molecular de las bacterias aisladas de la rizosfera de <i>C.</i> <i>papaya</i> por la similitud de la región 16S rDNA.....	43
Tabla 6-5. Reportes de géneros de bacterias aisladas de suelo, identificadas en este trabajo. ....	44
Tabla 6-6. Resultados comparativos de caracterización bioquímica y molecular .....	47
Tabla 6-7. Composición de los diferentes inoculantes probados en <i>C. papaya</i> a nivel laboratorio.....	49
Tabla 6-8. Tiempo en que se alcanza la población de $1 \times 10^9$ UFC/ mL de los microorganismos aislados .....	51
Tabla 6-9. Inoculación de los 17 tratamientos en las plántulas de <i>C. papaya</i> durante el período del 25-Feb-10 al 30-Abr-2010 .....	52

## Resumen

La búsqueda de microorganismos que favorezcan el crecimiento y desarrollo de las plantas es de interés para el sector agrícola. Debido a que en el suelo se encuentran microorganismos benéficos, es necesario identificar y caracterizar microorganismos útiles para la producción de inoculantes.

Debido a que actualmente *Carica papaya* es uno de los frutos tropicales con mayor demanda nacional e internacional, en este trabajo se investigó la capacidad de ciertos microorganismos para funcionar como inoculantes de esta planta. Se aislaron 13 bacterias de la rizosfera de *C. papaya* y se identificaron mediante pruebas bioquímicas y moleculares.

Los microorganismos identificados fueron: *Bacillus sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus psychrodurans*, *Sporosarcina sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter johsonii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acidovorax sp.*, *Bacillus luciferensis*, *Staphylococcus gallinarum*, *Arthrobacter sp.*, *Nocardioides sp.* y *Bacillus pumilus*.

Se probaron 17 tratamientos sobre cultivos de *C. papaya* a nivel laboratorio bajo condiciones de 25.5°C, 45% HR, fotoperiodo de 16 horas luz para evaluar su función como inoculantes: 13 que correspondían a las bacterias aisladas, un consorcio microbiano (CMP), similar a un producto orgánico comercial (PHC BioPak), un tratamiento positivo agroquímico (Nitrofoska), un tratamiento positivo orgánico (PHCBioPak) y un tratamiento negativo. Los tratamientos que presentaron efectos positivos significativos sobre el crecimiento y desarrollo de las plántulas fueron el tratamiento 2 (*Bacillus cereus*) y el tratamiento 14 (CMP).

Este es el primer trabajo en la literatura abierta que identifica los microorganismos presentes en la rizosfera de *C. papaya*, lo cual brindará la base para futuros estudios en relación con el desarrollo de inoculantes.

## Abstract

The agricultural sector is interested on the research or microorganisms that promote plant growth and development. Since the soil has beneficial microorganisms, it is necessary to identify and characterize microorganisms useful for the production of inoculants or biofertilizers.

Since papaya is a tropical fruit with a high national and international demand and Mexico is one of the main producers and exporters of the world, the focus of this research was the development of inoculants suitable for *C. papaya*. Thirteen species of bacteria were isolated, characterized and identified from the rhizosphere of *C. papaya*.

The identified microorganisms were: *Bacillus sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus psychrodurans*, *Sporosarcina sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter johsonii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acidovorax sp.*, *Bacillus luciferensis*, *Staphylococcus gallinarum*, *Arthrobacter sp.*, *Nocardioides sp.* y *Bacillus pumilus*.

Seventeen treatments were tested on *C. papaya* cultures under laboratory conditions of 25.5°C mean temperature, 45% relative humidity and a 16 h light/8 h dark photoperiod. To assess its role as inoculants: thirteen treatments were composed of bacteria isolated from the rhizosphere of *C. papaya*, one microbial consortium (CMP) similar to a commercial organic product (PHC BioPak), one positive agrochemical treatment (nitrofoska), one more positive treatment category (PHCBioPak) and finally a negative one. Treatments with the highest results regarding plant growth and development were treatment 2 (*Bacillus cereus*) and treatment 14 (CMP).

This is the first report in the open literature that identifies the microorganisms from the rhizosphere of *C. papaya*, which will pave the way for further studies on the development of inoculants.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Carica papaya

La papaya (*Carica papaya*) es una fruta originaria de México y Costa Rica. Actualmente se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Mandujano, 2007). La humedad (75% HR) y el calor son condiciones esenciales para su buen desarrollo y fructificación. La precipitación media es de 1, 500 mm anuales y la temperatura media es de 25°C, se desarrolla en diferentes clases de suelo siempre que sean fértiles, profundos y permeables con un pH de 5.5 a 7, como los suelos café-rocoso, calcáreo, rojizo-no profundo, arenoso-arcilloso. Su longevidad va de 3 a 15 años, pudiendo producir frutos por más de 15 años sin embargo sólo da rendimiento durante los 3 primeros años, esta planta fructifica todo el año (CONABIO, 2007). Siendo una fruta con gran aceptación popular ya sea por el consumo de mesa, o bien, por su actividad industrial (extracción de papaína); sin embargo la papaya se comercializa principalmente en estado fresco, porque es un excelente complemento alimenticio (Tabla 1-1).

**Tabla 1-1. Composición nutricional de la pulpa de papaya.**

<b>Componentes</b>	<b>Contenido</b>	<b>Cantidad</b>
Calorías	23-25 kca	100 g
Carbohidratos	2.05-2.25 g	100 g
Ceniza	31-66 g	100 g
Fibra cruda	2-1.5.2 g	100 g
Grasa Total	0.75-1.45 g	100 g
Humedad	85.9-92.6 g	100 g
Proteína	0.34-0.81 g	100 g
Ac. Ascórbico	59.17-118.30 mg	100 mg
Calcio	7.96-25.18 mg	100 mg
Fosforo	4.24-17.6 mg	100 mg
Hierro	1.39-4.33 mg	100 mg
Lisina	15-16 mg	100 g
Metionina	1 mg	100 g
Niacina	1135-2775 mg	100 mg
Riboflavina	14.11-34.11 mg	100 mg
Tiamina	0.21-0.36 mg	100 g
Triptófano	4-5 mg	100 g
Vitamina A	140 IU	100 IU

Fuente: USDA 2000

### 1.1.1. Usos y aplicaciones de *C. papaya* en la industria

La papaya juega un papel muy importante en los diferentes sectores industriales, debido a que de este fruto se extrae la papaína, enzima proteolítica (Becker, 1958) usada en la industria alimenticia como ablandador de carnes y también en la clarificación de cervezas y otras bebidas. En la industria cosmética, se aprovecha su poder desmanchador y cicatrizante. En la industria farmacéutica se utiliza para tratar males hepáticos y dolores lumbares (Mandujano, 2007).

La papaína es uno de los componentes utilizados por laboratorios oftalmológicos para fabricar tabletas para la limpieza de lentes de contacto, y debido a su capacidad de favorecer el proceso digestivo, forma parte de suplementos dietarios (Mandujano, 2007).

### 1.1.2. Distribución de los productores de *C. papaya*

La papaya es una de las frutas tropicales que se producen a nivel mundial, concentrándose el 68% de la producción total de este fruto en cuatro países principalmente: Brasil, México, Nigeria e Indonesia con 1.8, 0.9, 0.7 y 0.6 millones de toneladas respectivamente, lo que representa el 30% para Brasil, el 15% para México el 13% para Nigeria y el 10% para Indonesia del total mundial (FAOSTAT, 2007).

Los principales países productores a nivel mundial del 2000 hasta 2007 se presentan en la Tabla 1-2.

**Tabla 1-2. Principales países productores de papaya (miles de toneladas).**

Países	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
<b>Brasil</b>	1,439.7101	1,489.320	1,597.700	1,714.590	1,612.350	1,573.820	1,897.639	1,811.54
<b>México</b>	672.380	873.460	876.150	955.690	955.690	709.500	798.600	919.43
<b>Nigeria</b>	748.000	748.000	755.000	755.000	755.000	754.500	759.000	750.00
<b>Indonesia</b>	429.210	500.570	605.190	626.7500	732.610	548.660	643.451	621.52
<b>India</b>	700.000	700.000	700.000	700.000	700000	700.00	700.00	700.00
<b>Etiopía</b>	197.300	223.000	226.000	230.540	230.000	260.00	260.00	260.00
<b>República Democrática del Congo</b>	213.00	206.220	210.310	211.000	211.000	215.980	217.900	219.84
<b>Perú</b>	171.390	158.810	173.010	191.040	194.710	171.055	175.428	207.10
<b>China</b>	154.220	159.210	162.570	164.560	154.620	118.475	151.283	117.91
<b>Filipinas</b>	75.900	77.420	127.680	130.760	131.870	146.628	157.120	164.23

Fuente: <http://faostat.fao.org>

Respecto a los principales países exportadores a nivel mundial, en el 2007 México ocupaba, el primer lugar con 101 mil toneladas, lo que representaba el 39% del total mundial. El valor de estas exportaciones eran de 75.75 millones de dólares (FAOSTAT, 2007), a la fecha nuestro país es el principal exportador de papaya (Gobierno Federal, 2010). En la Tabla 1-3 se presentan del 2000 hasta el 2007, los principales países exportadores de papaya a nivel mundial.

**Tabla 1-3. Principales países exportadores de papaya (miles de toneladas).**

<b>Países</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>
<b>México</b>	59.82	74.06	68.56	74.81	96.53	83.159	94.891	101.306
<b>Malasia</b>	44.13	53.96	60.89	71.47	58.15	38.757	32.475	32.367
<b>Brasil</b>	21.51	22.8	28.54	39.49	35.93	42.008	50.545	36.938
<b>Belice</b>	5.58	6.42	22.32	16.89	28.75	28.635	34.475	33.342
<b>Estados Unidos</b>	6.19	8.32	7.11	7.05	9.79	10.704	35.860	96.040
<b>Países Bajos</b>	3.02	3.65	3.36	10.55	9.55	94.020	93.920	86.250
<b>Ecuador</b>	3.81	3.67	1.98	4.48	7.2	53.730	55.490	54.860
<b>China</b>	2.55	3.64	5.12	7.56	6.07	67.930	40.970	10.067
<b>India</b>	11.93	1.98	3.45	3.55	3.48	64.340	10.344	10.880
<b>Filipinas</b>	2.52	4.16	4.31	1.47	3.32	32.290	50.710	48.800

Fuente: <http://faostat.fao.org>

### 1.1.3. Panorama actual en México

Las Tablas 1-2 y 1-3 muestran que la producción de papaya en México es una alternativa económica atractiva para el sector agrícola, por la rentabilidad que proporciona a los agricultores dedicados a su cultivo (FAOSTAT, 2007). Actualmente México ocupa el primer lugar en producción de papaya (Gobierno federal, 2010). Sin embargo los productores de papaya en nuestro país están enfrentando diversos factores que limitan la producción de este fruto, debido a las altas temperaturas, los suelos arcillosos, los problemas de plagas y enfermedades. Así mismo no se tiene la información suficiente de las necesidades nutritivas en las diferentes etapas de desarrollo (juventud, madurez y envejecimiento) de la planta (FAOSTAT, 2007).

El comercio internacional de papaya en México, enfrenta el incumplimiento de normas de calidad para su exportación. La NORMA DEL CODEX PARA LA PAPAYA (CODEX STAN 183-1993, REV.1-2001,EMD, 1-2005) de la FAO dicta los estándares de calidad para la exportación de este fruto, mencionando que los frutos afectados por putrefacción o deterioro y que por lo tanto su consumo represente una amenaza a la

salud de las personas deben ser excluidos; deben estar libres de imperfecciones pronunciadas, de daños causados por bajas temperaturas, de humedad anormal externa, excluyendo la condensación ocurrida al retirarla del almacenamiento en el frío, leves defectos en la cáscara (por ejemplo rasguños, raspaduras, marcas de sol y quemaduras del látex), así como el cumplimiento de los límites máximos permisibles para residuos de plaguicidas o productos químicos para este producto (NORMA DEL CODEX PARA PAPAYA, 2005).

Por tanto para el cumplimiento de estos requisitos, los productores de papaya se han visto en la necesidad de utilizar fertilizantes y otras sustancias químicas de distintos tipos para obtener un mayor volumen de producción, en un menor tiempo, impidiendo el cumplimiento de las especificaciones de calidad requeridas tanto a nivel nacional como a nivel internacional.

El presente trabajo ofrece una estrategia agronómica, la cual es el uso de productos orgánicos, como son los **inoculantes**, debido a que cumplen los mismos requisitos que un producto químico proporcionando los nutrientes necesarios para el crecimiento y/o desarrollo de la planta, teniendo las ventajas adicionales de no contaminar el ambiente (INTA, 2002).

## **1.2. Inoculantes**

Un inoculante es un insumo de nutrición vegetal elaborado a base de microorganismos, que al aplicarse al suelo o a las semillas, favorece el aprovechamiento de los nutrimentos en asociación con la planta o su rizosfera (NOM-077-FITO-2000).

Huerta (1999) define como inoculante a aquel material biológico o producto biológico que facilita la introducción de microorganismos con diversa actividad fisiológica favoreciendo el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este inoculante puede presentar diferentes aspectos físicos, ya sean líquidos o sólidos en los que se utilizan acarreadores como la turba, el carbón activado, aceites, alginatos y otros soportes orgánicos e inorgánicos. De este modo, el inoculante puede ser manejado con el fin de establecer los microorganismos en las hojas, tallos, raíces para establecerlos en los diversos sistemas de producción agrícola, forestal, hortícola y frutícola.

En este trabajo se entenderá como inoculante a aquel concentrado de bacterias o mezclas de estas, que aplicado convenientemente a la semilla, mejorará el desarrollo de los cultivos.

El empleo de inoculantes es una alternativa o estrategia que la Biotecnología agrícola brinda tanto para los productores como para los consumidores de productos agropecuarios, ofreciendo grandes beneficios productivos y económicos (Jiménez *et al.*, 2001). La FAO (2000), en su declaración sobre la biotecnología menciona que el uso de inoculantes incluye la selección y multiplicación de microorganismos benéficos para las plantas, tanto de aquellos que protegen a la planta contra el ataque de patógenos, plagas y malezas como de aquellos que le proporcionan nutrientes.

### **1.2.1. Técnicas de inoculación de cultivos**

Deaker (2004) menciona que existen dos técnicas de inoculación, las cuales son la inoculación de semilla e inoculación de suelo.

#### **1.2.1.1. Inoculación de semilla**

La inoculación de la semilla se puede llevar a cabo por 3 métodos los cuales son método seco, método húmedo y peleteado:

- **Método seco:** Consiste en aplicar el inoculante base turba sin adherentes mezclándolo con la semilla. Este método no es aconsejable ya que el inoculante no se adhiere a la semilla o queda en muy baja proporción.
- **Método húmedo:** Método por el cual se mezcla el inoculante base turba con adherentes a la semilla.
- **Peleteado:** Es un tratamiento que se le hace a la semilla recubriéndola con una capa que protege a las bacterias generalmente del género *Rhizobium*, asegurando así el número de bacterias adecuado por semilla. Además se le incorpora la dosis exacta de fungicidas, insecticidas, etc. Esta capa que consiste en: 1) Inoculante, el cual contiene cepas seleccionadas de *Rhizobium*, para asegurar una eficiente nodulación; 2) Soporte orgánico, minerales, azúcares para asegurar la sobrevivencia de las bacterias; 3) Fungicida para el control de hongos del suelo tales como el causante de *damping off*, podredumbre de la raíz y 4) Carbonato de

calcio. Todos estos elementos son esenciales para mantener un alto número de bacterias y proteger la semilla.

#### **1.2.1.2. Inoculación de suelo**

La inoculación del suelo se puede llevar a cabo por 2 métodos, los cuales son inoculación líquida e inoculación granular:

- **Inoculación líquida:** Consiste en mezclar la turba con el inoculante líquido, aplicándose directamente en el surco de siembra. Los inoculantes líquidos también pueden ser aplicados directamente a la semilla con un adherente o en el agua cuando se cuenta con un sistema de riego.
- **Inoculación granular:** Formulados en base a turba aglomerada en pequeños gránulos. Permite aplicar dicho inoculante dispersado dentro del surco de siembra, junto con las semillas.

#### **1.2.2. Inoculantes y su marco regulatorio**

Según la IFOAM (2005) los inoculantes deben cumplir con los 4 principios de producción orgánica:

- **Principio de salud:** La agricultura orgánica debe sostener y promover la salud de suelo, planta, animal, persona y planeta como una sola e indivisible.
- **Principio de ecología:** La agricultura orgánica debe estar basada en sistemas y ciclos ecológicos vivos, trabajar con ellos, emularlos y ayudar a sostenerlos.
- **Principio de equidad:** La agricultura orgánica debe estar basada en relaciones que aseguren equidad con respecto al ambiente común y a las oportunidades de vida.
- **Principio de precaución:** La agricultura orgánica debe ser gestionada de una manera responsable y con precaución para proteger la salud y el bienestar de las generaciones.

El uso de insumos orgánicos a nivel mundial está considerado en las siguientes normas, reglamentos y estándares internacionales entre otras:

- International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM): Normas para la producción y procesado orgánico.
- La Comisión del Codex Alimentarius y el programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias directrices para la producción, elaboración, etiquetado y comercialización de alimentos producidos orgánicamente.
- National Organic Program (NOP) de los Estados Unidos, bajo la dirección del Agricultural Marketin Service (AMS), una dependencia del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA).
- Reglamento (CEE) N° 2092/91 del Consejo de la Unión Europea, sobre la producción agraria ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios.
- Estándares Agrícolas de Japón (JAS) para productos agrícolas orgánicos. (del Ministerio de Agricultura, Silvicultura e Industrias Pesqueras).

En México la Secretaria de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y alimentación, en el 2006 expidió la Ley de Productos Orgánicos. El capítulo segundo de esta ley menciona el uso de métodos, sustancias y/o materiales en la producción orgánica (Ley de Productos Orgánicos, 2006).

Así mismo, en nuestro país existe un marco regulatorio que aplica a los insumos orgánicos y a las empresas que lo producen y comercializan:

- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT): REGLAMENTO en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos.
- Secretaria de Salud: ACUERDO por el que se da a conocer el formato para la realización de trámites que aplica la Secretaria de Salud, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios en materia de registros, autorizaciones de importación y exportación y certificados de exportación de plaguicidas, nutrientes vegetales y sustancias toxicas y materiales tóxicos o peligrosos.

- Secretaria de Salud: NORMA Oficial Mexicana NM-045-SSA-1993, Plaguicidas. Productos para uso agrícola, forestal, pecuario de jardinería, urbano e industrial. Etiquetado.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural 06-24-96: NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-033-FITO-1195, por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarias para el aviso de inicio de funcionamiento que deberán cumplir las personas físicas o morales interesadas en comercializar plaguicidas agrícolas.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural: NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-034-FITO-1995, por la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarias para el aviso de inicio de funcionamiento que deberán cumplir las personas físicas o morales interesadas en la fabricación, formulación, formulación por maquila, formulación y/o maquila e importación de plaguicidas agrícolas.

A pesar de que ya se han establecido normas que regulen el uso y producción de inoculantes en nuestro país, todavía hace falta apoyos y/o programas para la producción de estos insumos, vinculación de los agricultores con productores orgánicos, publicar la lista de insumos orgánicos existentes, así como los requisitos y procedimientos para su evaluación (Gómez *et al.*, 2005).

### **1.2.3. Inoculantes en el mercado**

Los inoculantes en la agricultura se han diseñado para proveer una fuente confiable de organismos benéficos para las plantas con propósitos específicos referentes al mejoramiento de la nutrición vegetal (biofertilización), la eliminación o disminución de organismos patógenos y plagas (agentes de control biológico) y la disminución o eliminación de xenobioticos (biorremediación), esto es para eludir el uso de agroquímicos, con el fin de evitar la contaminación del medio ambiente y la sostenibilidad del mismo (Huerta, 2007).

Para ello, es esencial que las formulaciones contengan cepas adecuadas y además, aseguren la supervivencia de un número elevado de las mismas, que sean de fácil manejo en condiciones de campo y que su producción y precio sean costeables. De este modo, los problemas básicos a los que se enfrenta la biotecnología es a la

selección de cepas y a la introducción y liberación en el ambiente de poblaciones viables y en número elevado de los microorganismos de interés lo que está relacionado con la naturaleza del sustrato usado (Huerta, 2007).

La producción comercial y formulación de cualquier inoculante agrícola de buena calidad requiere de variables físicas, químicas y biológicas que aseguren que el producto contenga poblaciones elevadas de los microorganismos de interés y apoye su supervivencia por períodos prolongados de almacenamiento, por lo que es indispensable conocer las características y limitaciones de la materia prima y del proceso de producción, así como efectuar un estricto control de calidad durante el proceso de producción y en el producto terminado (Huerta, 2007).

A nivel mundial ya se utilizan diversos productos orgánicos comerciales (inoculantes), por ejemplo en Argentina hay aproximadamente 80 productos registrados con formulaciones biológicas (INTA, 2010).

En la Tabla 1-4 se muestran algunos microorganismos que han sido eficientemente aislados de suelo y utilizados para la formulación de inoculantes.

**Tabla 1-4. Microorganismos aislados del suelo utilizados en algunos de los productos microbianos comerciales (Dobbelaere et al., 2003)**

<b>Grupo</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Hábitat</b>
<b>Bacteria</b>	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Endófito
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Rizósfera, endófito
	<i>Azospirillum amazonense</i>	Rizósfera, endófito
	<i>Azospirillum lipoferum</i>	Rizósfera, endófito
	<i>Azotobacter armeniacus</i>	Rizósfera
	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Rizósfera
	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Rizósfera
	<i>Bacillus subtilis</i>	Rizósfera
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Rizósfera
	<i>Bacillus megaterium</i>	Rizósfera
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Rizósfera
	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Rizósfera, endófito
	<i>Pseudomonas putida</i>	Rizósfera
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Rizósfera
	<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	Rizósfera
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Endófito
<i>Rhizobium meliloti</i>	Endófito	
<i>Rhizobium phaseoli</i>	Endófito	
<b>Actinomicetos</b>	<i>Streptomyces albus</i>	Rizósfera
<b>Hongos</b>	<i>Glomus intraradices</i>	Endosimbionte, rizosfera
	<i>Penicillium bilai</i>	Rizosfera

Los efectos positivos (benéficos) que se han observado que producen estos inoculantes microbianos en los diferentes cultivos probados son: fijación de N<sub>2</sub> (ej. *Azospirillum sp.*), la solubilización de fósforo (P) (ej. *Pseudomonas sp.*), la capacidad de producir ácidos orgánicos (ácidos oxálico, fumárico y cítrico) y fosfatasa facilitando la solubilidad del P y otros nutrientes. Además, la promoción del crecimiento de las plantas puede asociarse a la producción de fitohormonas y a la protección contra hongos patógenos (Huerta, 1999).

En lo que corresponde a los cultivos de *Carica papaya*, ya existen productos comerciales que se aplican en estos cultivos obteniendo efectos benéficos en las plantas como lo son estimulación de crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno, prevención y control de enfermedades, etc. En la tabla 1-5 se muestran las diferentes bacterias contenidas en inoculantes comerciales de la marca Plant Heath Care (<http://www.phcmexico.com.mx>).

**Tabla 1-5. Bacterias utilizadas en inoculantes comerciales para *C. papaya***

Microorganismo	Función
<i>Azospirillum sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fijador de Nitrógeno</li> </ul>
<i>Bacillus subtilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Disminuye riesgo de enfermedades fúngicas</li> </ul>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Disminuye el riesgo de enfermedades bacterianas</li> </ul>
<i>Bacillus megaterium</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Favorece absorción de nutrientes</li> </ul>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Estimuladores del crecimiento vegetal (estimulan la germinación de semillas, acelerando el crecimiento de las plantas especialmente en sus primeros estadios)</li> <li>▪ Inducen la iniciación radicular e incrementan la formación de raíces y pelos radiculares</li> </ul>
<i>Rhizobium sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Fijadores de nitrógeno</li> </ul>

### 1.3. Los microorganismos del suelo

En el suelo se encuentra una gran diversidad de microorganismos responsables de la dinámica de transformación y desarrollo (Eldor, 2007). La microbiota del suelo está compuesta por actinomicetos, algas, protozoarios, hongos y bacterias. En un suelo agrícola están presentes alrededor de 10<sup>10</sup> organismos por gramo de suelo y constituyen una biomasa de aproximadamente 1500 kg por hectárea. Un gramo de suelo fértil puede contener 1 mg de micelio fúngico, 10<sup>8</sup> células bacterianas, 10<sup>6</sup> esporas de actinomicetos y 10<sup>4</sup> células protozoarias (Tabla 1-6). Entre las funciones

más importantes que cumplen asociadamente en los procesos de transformación están (Carrillo, 2005; Kennedy, 1999):

- Suministro directo de nutrientes (Fijación de nitrógeno).
- Transformación de compuestos orgánicos que la planta no puede tomar a formas inorgánicas que si pueden ser asimiladas (Mineralización). Ejemplo: Proteína hasta aminoácidos y a nitratos.
- Solubilización de compuestos inorgánicos para facilitar la absorción por las plantas.
- Cambios químicos en compuestos inorgánicos debido a procesos de oxidación y reducción.
- Aumento del desarrollo radicular en la planta que mejora la asimilación de nutrientes, la capacidad de campo y el desarrollo.
- Reacciones antagónicas, parasitismo y control de fitopatógenos.
- Mejoramiento de las propiedades físicas del suelo.

La diversidad de microorganismos que se encuentran en una fracción de suelo cumple funciones determinantes en la transformación de los componentes orgánicos e inorgánicos que se le incorporan. Esto permite comprender su importancia en la nutrición de las plantas al efectuar proceso de transformación hasta elementos que puedan ser asimilados por sus raíces (Carrillo, 2005).

**Tabla 1-6. Concentración de microorganismos en un gramo de suelo (Carrillo, 2005; Kennedy, 1999)**

<b>Microorganismo</b>	<b>Unidad de células en el suelo</b>
Bacteria	$1 \times 10^4$ - $1 \times 10^9$ células/g
Hongos	1 micelio/ mg
Actinomicetos	$1 \times 10^6$ células/ g
Algas	$1 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$ células / g
Protozoarios	$1 \times 10^3$ - $1 \times 10^4$ células/ g

La mayor actividad de los microorganismos se realiza desde la superficie del suelo hasta unos 20 cm de profundidad. Las colonias de microorganismos permanecen adheridas a las partículas de arcilla y humus (fracción coloidal) y a las raíces de las plantas las cuales suministran sustancias orgánicas que les sirven de alimento y estimulan su crecimiento. Estas exudaciones dependen del buen estado nutricional de la planta y así favorecen el crecimiento de los microorganismos que son importantes para ella. Su actividad y su desarrollo están asociados a la disponibilidad de los

substratos a transformar. La colonización de algunos grupos microbianos sobre las fracciones orgánicas e inorgánicas depende de la función que se esté cumpliendo en la transformación (degradación de carbohidratos o de proteínas, amonificación, nitrificación, oxidación, reducción, mineralización, solubilización). Por lo tanto, mientras algunos microorganismos actúan sobre un sustrato, otros se desarrollan en los productos de la transformación. Cuando terminan su función sobre la degradación del sustrato, los grupos microbianos que estaban actuando principalmente disminuyen al máximo, se reproducen o entran en latencia y se incrementa la población de otros que cumplirán funciones de transformación en los productos del metabolismo del grupo microbiano anterior. Cada proceso químico desencadenado por un microorganismo es una etapa en la descomposición de un material orgánico o inorgánico. Una mayor cantidad de microorganismos en el suelo permite una mejor actividad metabólica y enzimática para obtener plantas bien nutridas con buena capacidad para producir frutos (Rai, 2006).

A continuación se describen las actividades más importantes que realizan los grupos de microorganismos del suelo.

### **1.3.1. Actinomicetos**

Los actinomicetos constituyen un grupo importante de organismos procarióticos habitantes del suelo y presentes en la composta. Entre los principales géneros se encuentra *Streptomyces* cuyas especies suelen excretar antibióticos y el “olor a tierra mojada” se debe a compuestos volátiles fabricados por los mismos. Cuando se les cultiva en medio sólido, no solo forman un fino micelio ramificado, sino que también producen una hifa aérea que se diferencia en cadenas de conidiosporos. Cada conidiosporo puede, a su vez, generar una colonia micelial. Otro género de interés es *Nocardia* cuyas colonias carecen de micelio aéreo o es escaso, con unos pocos conidiosporos en los extremos de las cortas ramas hifales o sin ellos, y finalmente las hifas se fragmentan totalmente en elementos bacilares (Carrillo, 2005).

Los actinomicetos se encuentran en el suelo, las aguas estancadas, el lodo y los materiales orgánicos en degradación. Se nutren de materiales orgánicos (heterótrofos). Degradan desde azúcares simples, proteínas y ácidos orgánicos hasta substratos muy complejos compuestos por hemicelulosas, ligninas, quitinas y parafinas. Por esto son

importantes en el proceso de transformación hasta la obtención del humus en el suelo. Además son considerados como los mejores agregadores del suelo, pues son muy eficientes produciendo sustancias húmicas (Kennedy, 1999). En suelos bien aireados con alto contenido de materia orgánica alcanzan poblaciones muy altas. Se desarrollan bien en suelos con pH desde 5 hasta 7 (Carrillo, 2005).

### **1.3.2. Algas**

Son organismos fotosintéticos eucarióticos y procarióticos. Las algas del suelo viven en la proximidad inmediata a la superficie o sobre la misma. Predominan, arriba las diatomeas y abajo las clorofíceas y xantofíceas ubicuas. La humedad óptima es del 40 al 60% de la capacidad de retención del agua por el suelo. Las algas libres o liquenizadas constituyen el estado inicial de la vegetación de rocas y suelos minerales infértiles (Varma, 2005).

Las cianobacterias son organismos procariontes, unicelulares o filamentosos (por reunión de células individuales adheridas por sus extremos) que contienen, además de la clorofilas, un pigmento azulado llamado ficocianina. Están presentes en suelos, y aguas dulces o saladas. A veces colonizan ambientes extremadamente inhóspitos. Algunos convierten el nitrógeno atmosférico en compuestos que los vegetales aprovechan. Actúan en la solubilización de minerales del suelo, acelerando el proceso de intemperización. Generan materia orgánica a partir de compuestos inorgánicos y aumentan el contenido de humus en el suelo (López, 2001).

Las cianobacterias, antiguamente llamadas algas verde azules son principalmente activas en suelos húmedos o inundados y en suelos superficiales alcalinos. Como no dependen de la materia orgánica como fuente de energía, son las primeras colonizadoras de las regiones áridas arenosas y facilitan el ingreso posterior de las plantas (López, 2001).

Los géneros de algas del suelo más importantes para la nutrición de las plantas son *Anabaena*, *Nostoc* y *Spirulina* (Carrillo, 2005).

### 1.3.3. Protozoarios

Los protozoos constituyen un grupo muy heterogéneo de microorganismos eucarióticos, unicelulares y móviles (con algunas excepciones). El ciclo de vida comprende dos fases: una de actividad, durante la cual se desplazan, nutren y reproducen; otra de reposo o enquistamientos. Se alimentan de bacterias, levaduras, algas y otros protozoos. Se agrupan en: rizópodos que se desplazan por pseudópodos (amebas y testáceos o foraminíferos), flagelados con uno o más flagelos, ciliados dotados por cilias y dos núcleos, y esporozoos parásitos. La población de flagelados y amebas es del orden de  $10^3$  -  $10^4$  células/gramo. Participan en el equilibrio biológico del suelo pues consumen grandes cantidades de bacterias, una ameba ingiere unas 40,000 bacterias entre cada división celular (Carrillo, 2005).

### 1.3.4. Hongos

Los mohos y levaduras forman parte de los hongos. Las levaduras son unicelulares en condiciones normales mientras que los mohos crecen como un sistema ramificado de filamentos micelio (Carrillo, 2005).

Los hongos conforman una importante fracción de la biomasa total microbiana del suelo. Estos microorganismos son degradadores aerobios de material vegetal en descomposición en suelos ácidos. Producen enzimas y metabolitos que contribuyen al ablandamiento y a la transformación de sustancias orgánicas. También estas enzimas forman parte de la actividad de otros microorganismos. Los hongos metabolizan compuestos carbonados de muy difícil degradación como las celulosas, las hemicelulosas y las ligninas. También degradan azúcares simples, alcoholes, aminoácidos y ácidos nucleicos. Pueden ser parásitos o saprofitos. Son muy importantes en suelos con desechos de cosecha. Su crecimiento ramificado rápido y la intensa actividad degradadora les permiten mantener un equilibrio en los ecosistemas del suelo, se ha reportado que toda actividad metabólica esta compartida con los actinomicetos, poseedores también de una importante maquinaria enzimática (Buscot, 2005).

Los géneros de hongos más importantes asociados a las raíces de las plantas son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Trichoderma*. El *Aspergillus* y el *Penicillium*

movilizan el fósforo y el nitrógeno del suelo. *Trichoderma* sostiene la humedad en las raíces en condiciones de sequía (Rai, 2006).

Algunas levaduras son importantes fermentadoras de carbohidratos produciendo alcoholes que son utilizados por otros microorganismos como fuentes de energía. Entre los géneros más importantes están el *Saccharomyces* y el *Rhodotorula* (Rai, 2006).

### **1.3.5. Bacterias**

Son los microorganismos más abundantes y pequeños (0.1 a 1  $\mu\text{m}$ ). Pueden ser aerobias, anaerobias o facultativas. Pueden tolerar pH ácido, pH básico o pH neutro. Las bacterias mesófilas se desarrollan a temperaturas medias (15-40°C), las psicrófilas a temperaturas menores a 15°C y las termófilas a temperaturas mayores a 40°C. La mayoría de las bacterias del suelo que son importantes para las plantas son heterótrofas, aerobias y mesófilas. Algunas bacterias producen endosporas y quistes latentes que les proporcionan resistencia a las variaciones de temperatura, los niveles extremos de pH y a la desecación del suelo. De esta forma pueden crecer de nuevo cuando encuentran condiciones favorables. Otras se protegen de la depredación y de la desecación emitiendo una cápsula de sustancias mucoides. Otras se desplazan en la solución del suelo mediante un flagelo para encontrar más fácilmente el sustrato alimenticio (Rai, 2006).

Su capacidad de multiplicación les permite crear poblaciones muy grandes en un tiempo muy corto, colonizando rápidamente los sustratos a degradar. La clase y abundancia de bacterias presentes en una fracción de suelo dependen de los sustratos que lo compongan y de sus condiciones (suelo ácido, con materia orgánica alta, etc.). Los grupos bacterianos que actúan primero sobre los sustratos disponibles son dominantes hasta que termina su acción y luego dan oportunidad a que otros grupos crezcan en el residuo del metabolismo de los primeros. Por lo tanto hay grupos bacterianos que permanecen y otros que entran en latencia hasta que encuentran condiciones favorables para su crecimiento. Las bacterias tienen especial importancia en la relación suelo-planta y son responsables del incremento o disminución en el suministro de nutrientes (Kennedy, 1999).

Los suelos agrícolas que están sometidos a la mecanización continua, al monocultivo, al riego, a la aplicación de agroquímicos y fertilizantes de síntesis, a la compactación y a las quemadas, tienen una microbiota muy baja que afecta su fertilidad. Las bacterias benéficas del suelo son indispensables para recuperar la estructura perdida por las prácticas agrícolas, para hacer disponibles los nutrientes que hay en el suelo y para incorporarle la materia orgánica que necesita para mejorar la fertilidad (Bashan, 1998).

Entre los géneros bacterianos más importantes agrícolamente por la transformación de los compuestos orgánicos e inorgánicos y que favorecen la nutrición de las plantas están: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Clostridium*, *Thiobacillus*, *Lactobacillus*, y *Rhizobium* (Rai, 2006).

#### **1.4. Mecanismos de identificación de bacterias presentes en el suelo**

La identificación de una bacteria es su asignación a un taxón según una clasificación dada. Consiste en la determinación de las características fenotípicas y/o genotípicas y la comparación de estas características con los diferentes taxones de la clasificación considerada. Las características a determinar y su número depende principalmente del tipo de bacteria y del fin que se persigue en la identificación (Bergey, 1994).

El manual de Bergey (1994) propone un esquema de trabajo para la identificación de una cepa bacteriana:

- 1) **Obtención de cultivo puro**
- 2) **Análisis macroscópico** (morfología colonial) y **microscópico** de células por frotis teñido por coloración Gram. Determinándose así la forma, agrupación y el Gram del microorganismo en estudio.
- 3) Determinación de las **características nutricionales** (en general se desprenden de los métodos empleados en el aislamiento y cultivo anteriores).
- 4) **Caracterización bioquímica** mediante pruebas bioquímicas primarias (catalasa, oxidasa, metabolismo oxidativo-fermentativo, fermentación de glucosa y movilidad) que permiten determinar el género o en algún caso familia a la que pertenece un cultivo. Las pruebas bioquímicas secundarias y terciarias permite llegar hasta la

especie, estas dependerán del genero o familia determinado (ej. Producción de indol, citrato, etc.).

5) **Caracterización molecular** existen diferentes métodos (Bergey, 1994) como:

**Tamaño del genoma:** La mayoría de los genomas bacterianos tienen un tamaño menor a 5 Mb, este es un carácter taxonómico negativo que no relaciona a aquellos con tamaños muy diferentes, pero que tampoco relaciona a aquellos con tamaños similares.

**Contenido G+C de ácidos nucleicos:** El contenido G+C de las bacterias oscila entre el 25 y el 75%. Es también un carácter taxonómico negativo, es decir, cuando el porcentaje entre dos cepas difiere bastante, podemos asegurar que no pertenecen a la misma especie. Sin embargo, dos cepas con el mismo contenido G+C no tienen por qué estar relacionadas necesariamente.

**Hibridación de ácidos nucleicos:** Es un procedimiento que permite comprobar si cadenas simples de ADN de dos microorganismos diferentes pueden formar entre sí cadenas dobles estables. Por lo tanto se mide la cantidad de ADN que tienen en común las dos hebras complementarias. Para que dos cepas estén relacionadas deben asociar más del 70% de su ADN.

**Secuenciación de ácidos nucleicos:** Permite la comparación total de los genomas bacterianos. Solo es útil para clasificación y puede ser útil para identificación dependiendo de los marcadores moleculares utilizados y de las secuencias disponibles en bancos de datos, varía para cada especie.

**Oligonucleótidos del 16S rDNA:** El 16S rDNA es un polirribonucleótido de unos 1500 nt, presente en los ribosomas de todas las bacterias y que tiene una antigüedad de millones de años. Su estructura y función han permanecido constantes, aunque muestran pequeñas variaciones que se van acumulando a lo largo del tiempo. Una vez determinada la secuencia de nucleótidos, y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias 16S rDNA de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva.

**Secuencias de oligonucleótidos firma:** Son secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte) de los miembros de un determinado grupo taxonómico, y nunca (o raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos filogenéticamente.

**Análisis de Secuencias Multilocus o Tipificación por secuencias Multilocus:** Se basa en diferenciar las enzimas de una especie bacteriana mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (isoenzimas).

#### **1.4.1. Caracterización bioquímica**

La identificación de un aislamiento bacteriano puede realizarse utilizando diferentes combinaciones de características y diferentes criterios en la evaluación de similitudes (Bergey, 1994).

Los ensayos bioquímicos tradicionalmente utilizados, llamadas pruebas bioquímicas convencionales, generalmente determinan la actividad de una vía metabólica (conjunto de reacciones químicas) a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer transforma o no, estas pruebas demuestran de forma clara una determinada característica bioquímica como presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o determinada vía metabólica, crecimiento a una determinada temperatura, crecimiento en presencia de inhibidores, etc. No significan de ninguna manera un estudio profundo del metabolismo bacteriano (MacFaddin, 2004).

En esquema, la realización de una prueba bioquímica implica:

- 1) Cultivar el microorganismo en un medio que contiene un determinado sustrato o inhibidor y luego de la incubación visualizar el crecimiento y la degradación de un sustrato, ya sea por viraje de un indicador o al agregar de un reactivo revelador de la presencia del sustrato, o de algún producto de su degradación.
- 2) Cultivar el microorganismo en un medio de propagación que contenga el sustrato de una enzima inducible y luego de la incubación demostrar la actividad enzimática.

En todos los casos se debe tener un cultivo fresco (18-24 h de incubación) en un medio en que el microorganismo se desarrolla en forma óptima, a pH, fuerza iónica, presión y temperatura adecuados. Siempre que se prepara un nuevo lote de medio de cultivo para una prueba, deben llevarse a cabo los correspondientes controles de calidad, sembrando en dicho medio una cepa positiva y otra negativa para esa prueba.

Si bien existen una gran variedad de pruebas bioquímicas empleadas con fines de identificación, se enumerarán a continuación sólo las que se utilizan frecuentemente, agrupadas según el tipo de ensayo y se denominan según su nombre corriente (Tabla 1-7).

**Tabla 1-7. Pruebas bioquímicas utilizadas frecuentemente para la identificación de bacterias según Bergey (1994)**

<b>Tipo de ensayo</b>	<b>Prueba bioquímica</b>
Fermentación de azúcares	Hidrólisis de almidón
	Caldo rojo fenol
	TSI
	Voges Proskauer
Utilización de sales inorgánicas	Utilización de citrato
	Utilización de malonato
	Utilización de urea
Hidrólisis de proteínas y aminoácidos	Hidrólisis de gelatina
	SIM
	MIO
Metabolismo oxidativo- fermentativo	Reducción de nitratos a nitritos
	Prueba Hugh y Leifson
	Cianuro de Potasio
	Oxidasa
	Catalasa

#### **1.4.2. Caracterización molecular 16S rDNA**

La caracterización molecular de la región 16S rDNA se ha utilizando ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana (Rodicio *et al.*, 2004).

El método molecular de identificación bacteriana mediante la secuenciación del 16s rDNA incluye tres etapas (Rodicio *et al.*, 2004):

- 1) Amplificación del gen a partir de la muestra apropiada:** La amplificación del 16S rDNA se consigue en un termociclador, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como sustrato se utiliza normalmente ADN purificado a partir de un cultivo puro. Para la amplificación del 16S rDNA, las regiones conservadas

facilitan el diseño de oligonucleótidos iniciadores. Cuando se pretende amplificar el 16S rDNA prácticamente completo, se utilizan iniciadores diseñados en base a secuencias conservadas próximas a los extremos 5' y 3' del gen.

- 2) Determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón:** En esta etapa se llevan a cabo las reacciones de secuenciación. Sin embargo, la secuencia obtenida podrá contener errores y/o presentar posiciones ambiguas. Por ello, la obtención de la secuencia definitiva requiere la evaluación de los electroferogramas y la alineación de la cadena directa con la reversa, para resolver las posibles discrepancias. Así, aunque la secuenciación de una cadena del amplicón puede conducir a una correcta identificación, la calidad de la secuencia será óptima cuando la comparación de ambas cadenas se utiliza para la corrección de errores.
- 3) Análisis de la secuencia:** La última etapa será la comparación de la secuencia 16S rDNA con las depositadas en bases de datos. Actualmente existen distintas bases de datos, algunas públicas, cuyo acceso es libre a través de internet, como GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), RDP (Ribosomal Database Project), RIDOM (Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms), y otras privadas, como MicroSeq (Applied Biosystems) y SmartGene IDNS (Integrated Database Network System). Cabe mencionar que la elección de la base de datos es importante, siendo recomendable la utilización de más de una de ellas, para comprobar si conducen al mismo resultado. Finalmente, se podrá construir un árbol filogenético, que refleja, de forma esquemática, el grado de parentesco genético entre las bacterias comparadas.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La papaya, fruto obtenido de la planta *Carica papaya*, es uno de los frutos tropicales con mayor demanda nacional e internacional, siendo México uno de los principales productores y exportadores de papaya a nivel mundial.

Actualmente para satisfacer la demanda del cultivo, se utilizan agroquímicos que causan serios problemas al ambiente y a la salud humana, haciendo su uso controversial, por lo que surge la necesidad de utilizar productos orgánicos como los inoculantes, obtenidos a partir de los microorganismos de la rizosfera de *Carica papaya*, que no sólo disminuyen los riesgos y las consecuencias de utilizar agroquímicos, sino que además, mejoran el desarrollo de la plántula, aumentando los volúmenes de producción.

## 3. HIPOTESIS

Los inoculantes formulados a partir de microorganismos aerobios autóctonos de la rizosfera de *Carica papaya*, estimulan la germinación y mejoran el desarrollo y crecimiento de los cultivos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

- ❖ Producir inoculantes, mediante fermentación sumergida para mejorar la producción en cultivos de *Carica papaya*.

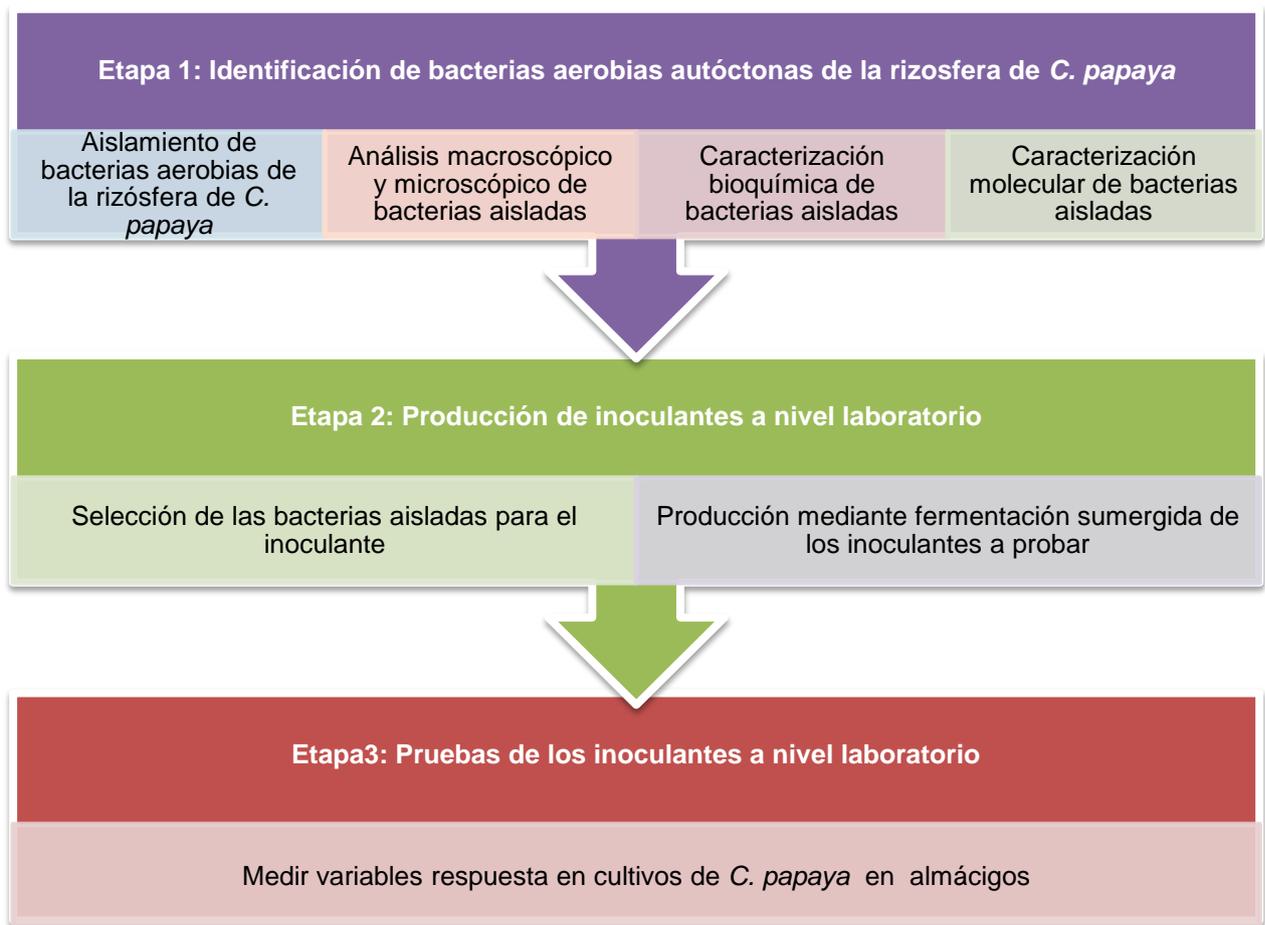
### 4.2. Objetivos específicos

- ❖ Identificar bioquímicamente las bacterias aerobias autóctonas de la rizosfera de *C. papaya* que se logren aislar y cultivar *in vitro*.
- ❖ Identificar molecularmente las bacterias aerobias autóctonas de la rizosfera de *C. papaya* que se logren aislar y cultivar *in vitro*.
- ❖ Formular y producir un inoculante por fermentación sumergida, que permita mejorar la producción de *C. papaya* a nivel laboratorio.
- ❖ Determinar la efectividad del inoculante en las plántulas de *Carica papaya* en la etapa de germinación y crecimiento durante 65 días, a nivel laboratorio.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Estrategia experimental

La estrategia experimental desarrollada en el presente trabajo siguió tres etapas constituidas por siete actividades, la cual se ilustra en la Figura 5-1.



**Figura 5-1. Diagrama de Flujo de la estrategia experimental. El desarrollo experimental se dividió en 3 etapas las cuales consistieron en la identificación de las bacterias aerobias autóctonas de la rizosfera de *C. papaya*, producción de inoculantes a nivel laboratorio y pruebas de los inoculantes a nivel laboratorio**

## Procedimientos y métodos

### 5.2. Etapa 1: Identificación de las bacterias aerobias autóctonas de la rizosfera de *C. papaya*.

#### 5.2.1. Aislamiento de bacterias aerobias de la rizosfera de *C. papaya*

Las muestras se obtuvieron de suelo de la rizosfera de *C. papaya* de la localidad de José María Morelos, situado en el Municipio de Santa María Huazolotitlán, en el estado de Oaxaca. El aislamiento de microorganismos se realizó mediante la técnica de aislamiento cuantitativo por varilla de vidrio. Posteriormente se obtuvo el cultivo puro, por estría cruzada, en agar nutritivo (AN) y agar extracto de suelo (MAES) (ANEXO I) (Sánchez, 2004).

#### 5.2.2. Análisis macroscópico y microscópico de las bacterias aisladas

En el análisis macroscópico se determinó la morfología colonial (Bergey, 1994) de cada una de las cepas obtenidas, en medios de cultivo AN y MAES en placas Petri a temperatura de 37°C, en un tiempo de incubación de 24 horas y 48 horas:

**Tamaño:** Diámetro en mm, los límites de tamaño de las colonias varían desde fracciones de milímetros hasta 10 mm de diámetro. La mayoría de las colonias forman colonias de tamaño limitado al tiempo de incubación.

**Forma:** La forma de la colonia es la apreciación general de su figura, puede ser puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide y huso.

**Borde:** Se refiere al contorno de las colonias y puede ser: entero, ondulado, lobulado, lacerado, filamentoso y rizado.

**Color:** Blanco, amarillo, negro, marrón, anaranjado, etc.

**Superficie:** Lisa o rugosa.

**Elevación:** Elevada, plana, convexa, pulvinada, umbonada, umbilicada.

**Aspecto:** Húmedo, seco, algodonoso, pulverulento, aterciopelado, veloso, granuloso.

**Consistencia:** Suave (butirosa), viscosa, membranosa o dura.

El análisis microscópico se determinó mediante tinción de Gram (Bergey, 1994).

### 5.2.3. Caracterización bioquímica de las bacterias aisladas

Se realizaron las pruebas bioquímicas sugeridas según Bergey (1994) para la identificación de bacterias hasta nivel género (ANEXO II).

**Hidrólisis de almidón:** Se inoculó por estría abierta una caja Petri que contenía gelosa almidón a partir de la suspensión, se incubó a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación se añadieron unas gotas de lugol cubriendo la superficie de la placa y se observó la formación de un halo claro alrededor de la estría.

**Fermentación manitol:** Los cultivos microbianos se crecieron en caldo rojo fenol, produciendo ácido y/o gas en una campana de Durham, se observó la coloración del medio y el tiempo de incubación fue de 24 horas.

**TSI:** Se inoculó por picadura y estría en el pico de la flauta en medio TSI, los tubos inoculados se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Se observó la coloración del tubo.

**Voges Proskauer (VP):** Se inoculó en un tubo con caldo Vogues- Proskauer, se incubó a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, se añadieron 6 gotas de alfa-naftol y 2 gotas de KOH, en ese orden, se agitó suavemente y se dejó reposar 15 minutos y se observó si había cambio de coloración.

**Citrato:** Por estría abierta en forma de "S" se inoculó un tubo "slant" con medio agar citrato de Simmons, se incubó a 37°C durante 24 horas y se observó el cambio de coloración.

**Malonato:** En un tubo con caldo malonato se inoculó el cultivo celular y se incubó a 37°C durante 24 horas y se observó si existía cambio en la coloración del medio.

**Urea:** Se inoculó en un tubo con medio urea, se incubó a 37°C durante 24 horas y se observó la coloración del medio.

**Hidrólisis de gelatina:** En un tubo con gelatina nutritiva se inoculó por picadura y se incubó a 37°C durante 24 horas, posteriormente se colocó a -4°C durante 5 minutos junto con los testigos y se observó si había licuefacción de la gelatina, en caso de que la prueba fuera negativa se incubó durante 14 días.

**Movilidad:** En un tubo con medio SIM y MIO se inoculó por picadura y se incubó a 37°C durante 24 horas. La movilidad se determinó por la turbidez alrededor de la picadura.

**Indol:** En tubos con medio SIM y MIO se inoculó por picadura y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se adicionaron 3 gotas de reactivo de Kovac's para ver la presencia o ausencia de indol.

**Reducción de Nitratos a nitritos:** Se inoculó en un tubo con caldo nitrato, se incubó a 37° durante 24 horas. La presencia de nitritos se determinó añadiendo 3 gotas de alfa-naftilamina y 3 gotas de ácido sulfanílico y se observaron los cambios de coloración.

**Metabolismos oxidativo/ fermentativo:** En 2 tubos con medio Hugh Leifson, se inocularon por picadura y a uno de estos se le adicionó 0.4 mL de aceite mineral. Los dos tubos se incubaron a 37°C durante 24 horas, se anotó el color del tubo después de la incubación y se compararon de la manera siguiente:

Color del tubo	Tubo con sello de aceite	Tubo sin sello de aceite	Tipo de Metabolismo
Amarrillo	+	+	Fermentativo
Amarrillo	-	+	Oxidativo
Verde	+	+	No asimila glucosa

**Citocromo oxidasa:** En un pedazo de papel filtro se impregnó con reactivo de oxidasa (N.N.N.N.-tetrametil-p-fenilendiamina) recién preparado, se tomó una asada del cultivo de TSI y se frotó sobre el papel, observándose cambio de coloración

**Catalasa:** Se tomó una asada de los cultivos previamente crecidos en medio TSI durante 48 horas a 37°C y se colocó en un portaobjetos que contenía 2 gotas de peróxido de hidrogeno al 10%, observándose la presencia o ausencia de burbujas.

#### **5.2.4. Caracterización molecular de las bacterias aisladas**

##### **5.2.4.1. Extracción y purificación del DNA genómico**

La extracción y purificación del DNA bacteriano se llevó a cabo utilizando el kit Charge Switch gDNA minibacteria (Invitrogen, USA). A partir de los cultivos puros en placas Petri se tomó una asada y se resuspendió en 100 µL de buffer de resuspensión R4 con RNasa A (5 mg/ mL en 10 mM Tris- HCl, pH 8.5, 10mM EDTA) y 5 µL de lisozima (50 mg/mL), las mezclas fueron agitadas mecánicamente y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Pasando el tiempo se agregaron 500 µL del buffer de Lisis LI4 y 10 µL de

proteínasa K (5 mg/mL en 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 50% glicerol), mezclando cada tubo por inversión. Los lisados fueron incubados a 94°C por 5 minutos. Después de este tiempo se agregaron 40 µL de esferas magnéticas y se adicionaron 300 µL del buffer de unión B8, las mezclas fueron agitadas mecánicamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 minuto. Se colocaron las muestras en un magnaRack (Invitrogen, USA) durante 1 minuto hasta la formación del paquete celular (o *pellet*). Los tubos con paquete celular y esferas magnéticas se removieron del magnaRack y se agregó 1 mL de buffer de lavado W12. Se colocaron las muestras en el magnaRack durante 1 minuto hasta la formación de *pellet*. El sobrenadante fue desechado y las esferas magnéticas se lavaron tres veces. Después del tercer enjuague las esferas magnéticas se resuspendieron en 200 µL de buffer de elución E5 (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los tubos se colocaron en el magnaRack durante 10 minutos a temperatura ambiente. El DNA contenido en el sobrenadante se adicionó en un tubo de microcentrífuga estéril. Las muestras se guardaron a -20°C.

#### **5.2.4.2. Electroforesis en gel de agarosa**

El ADN, se separó por electroforesis en geles de agarosa al 0.7% en amortiguador Tris-borato-EDTA (1X: Tris- borato 0.45 M, EDTA 0.01 M, pH 8.3), como marcador de tamaño molecular se utilizó Hyperladder I (Bioline, Londres) con una escalera de moléculas de DNA en múltiplos de 100 pares de bases (pb). Los ácidos nucleicos se tiñeron con rojo Texas (0.01 µL/mL); se visualizaron bajo luz ultravioleta y se fotografiaron y digitalizaron las imágenes en un equipo marca Kodak-MI (Sambrook *et al.*, 2001, Vol.1).

#### **5.2.4.3. Identificación molecular y secuenciación del gen 16S rDNA**

Se amplificó la región 16S rDNA para su secuenciación, por la técnica de PCR para lo cual se utilizaron iniciadores universales para la región 800-1400 del gen 16S rDNA de bacterias, 16S-1400 RV (5'-G CGGTGTGTACAAGGCCCG) y 16S-800 FW (5'-CGTGGACTACCAGGGTATCTA) (Rosas, 2010).

La secuencia completa del gen 16S rDNA de bacterias se determinó mediante el diseño de iniciadores universales para la región 1-900 del gen 16S rDNA para las bacterias aisladas (Tabla 5-1) con el programa VECTOR NTI suite V 6.0.

**Tabla 5-1. Iniciadores diseñados para la amplificación de la región 1-900 del gen 16S rDNA de bacterias por PCR**

Nombre de secuencia	Secuencia 5'-3'	Numero de bases	Tm (°C)
Bac1F	AGAGTTTGATCVTGGCTCAG	20	59.7
Bac50F	TAAYACATGCAATCGARCGR	20	58.4
Bac910R	CCTGGGGAGTACGGYCGCAAG	21	69.4
Bac938R	AACTCAAAGKAATTGACGGGG	21	59.6

El ensayo de PCR se llevó a cabo en un termociclador marca CORBETTE RESEARCH modelo PALM-CYCLER. Se emplearon volúmenes de reacción de 50 µL que contenían: Agua desionizada libre de ADNasas, buffer de reacción (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), dNTP's (0.2 µM), iniciador 16S- 800 FW (0.2 µM), iniciador 16S-1400 RV (0.2 µM), Taq Polimerasa Invitrogen (1U), MgCl<sub>2</sub> (2 mM) y el ADN de interés (100 ng). Las condiciones de la reacción fueron 94°C por 3 minutos; 30 ciclos a 94°C por 30 segundos; a 57°C por 30 segundos y a 72°C por 30 segundos, finalizando por un periodo de extensión adicional de 3 minutos a 72°C (Rosas-Rocha, 2010).

Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.0% en amortiguador Tris-borato-EDTA (1X: Tris- borato 0.45 M, EDTA 0.01 M, pH 8.3); como marcador de peso molecular se utilizó Hyperladder I (Bioline, Londres) (Sambrook *et al.*, 2001, Vol.1).

Una vez amplificados, los fragmentos obtenidos se purificaron con Purelink PCR Purification Kit (Invitrogen, USA). Se adicionaron 4 volúmenes de buffer de unión HC a 1 volumen del producto de PCR (50 µL) y se mezcló. La mezcla fue transferida a una columna de purificación y se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10 000 rpm, el líquido permeado se desechó. Se adicionaron 650 µL de buffer de lavado a la columna y se centrifugó a temperatura ambiente durante 1 minuto a 10 000 rpm desechándose el líquido resultante. Se centrifugó nuevamente la columna a temperatura ambiente durante 3 minutos a 15 000 rpm. La columna se colocó en un tubo nuevo y se adicionaron 50 µL de buffer de elución (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA) por el centro de la columna. Se incubó a temperatura ambiente durante 1

minuto y se centrifugó a 15 000 rpm durante 2 minutos. El líquido resultante contenía el fragmento de interés, el cual se envió a secuenciar a la unidad de secuenciación del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México en México, en un equipo Applied Biosystem 3100 utilizando el reactivo Bigaye terminator v.3.2.

#### **5.2.4.4. Criterios para la identificación**

La identificación de las bacterias se definió por la similitud de la secuencia 16s rDNA  $\geq$  98% con la de la secuencia de la cepa prototipo en las bases de datos Ribosomal Database Project II (Maidak *et al*, 1999; <http://wddm.nig.ac.jp/RDP/html/index.html>) y GenBank (Altschul *et al*, 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

#### **5.2.4.5. Análisis filogenético**

La construcción de las relaciones filogenéticas de los microorganismos se llevó a cabo alineando las secuencias de estudio y las obtenidas de las bases de datos empleando el programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007) con el método de agrupamiento Neighbor-joining (Saitou, 1987), con el algoritmo CLUSTAL W (Kumar, 2008).

#### **5.2.5. Conservación de las bacterias identificadas**

Los microorganismos aislados se inocularon en caldo AN y MAES respectivamente adicionando como crioprotector glicerol estéril a una concentración final del 10%. Las muestras se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Madigan *et al.*, 2009).

### **5.3. Etapa 2: Producción de inoculantes a nivel laboratorio**

#### **5.3.1. Producción de los inoculantes a partir de las bacterias aisladas seleccionadas**

Para determinar el tiempo en que se alcanza una población de  $1 \times 10^9$  UFC/mL según la Federación Internacional de Movimientos de Agricultura Orgánica (IFOAM, 2005) se inoculó el matraz semilla conteniendo 50 mL de caldo nutritivo con 2.5 mL de cada uno de los tratamientos, se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas a 220 rpm, posteriormente se

tomaron 2.0 mL de cada tratamiento y se inocularon en matraces de producción (500 mL). Se homogenizó la suspensión en cada uno de los matraces y se tomaron 2 mL de cada muestra la cual correspondió al tiempo cero, se realizaron diluciones colocando 1 mL en 9 mL de solución salina al 85% de acuerdo al Tabla 5-2 (tomando muestras cada hora y haciendo las diluciones correspondientes). Para determinar las UFC/mL por el método de vaciado en placa se realizaron las diluciones indicadas y se tomaron 0.1 mL y se colocó en caja Petri con medio agar nutritivo por triplicado. Por el método de turbidimetría se tomaron las correspondientes lecturas desde el tiempo cero hasta el tiempo final. Los matraces de producción se incubaron a 37°C con una agitación orbital a 320 rpm (Camacho *et al.*, 2009). La ecuación para el cálculo de las UFC/mL:

$$\text{UFC/mL de muestra} = \frac{\text{No.de colonias} \times \text{Factor de dilución}}{\text{mL sembrados en la placa}} \dots\dots\dots (5-1)$$

**Tabla 5-2. Diluciones realizadas a los diferentes tiempos durante la cinética para la determinación del tiempo en que se alcanza una población 1x10<sup>9</sup> UFC/mL**

Tiempo	Dilución
T <sub>0</sub>	10 <sup>-2</sup>
T <sub>1</sub>	10 <sup>-3</sup>
T <sub>2</sub>	10 <sup>-4</sup>
T <sub>3</sub>	10 <sup>-5</sup>
T <sub>4</sub>	10 <sup>-6</sup>
T <sub>5</sub>	10 <sup>-7</sup>
T <sub>6</sub>	10 <sup>-7</sup>
T <sub>7</sub>	10 <sup>-7</sup>
T <sub>8</sub>	10 <sup>-7</sup>
T <sub>9</sub>	10 <sup>-7</sup>
T <sub>10</sub>	10 <sup>-8</sup>

#### 5.4. Etapa 3: Pruebas de los inoculantes a nivel laboratorio

##### 5.4.1. Obtención del material de propagación

##### 5.4.1.1. Selección de los frutos y extracción de semillas de *C. papaya*

Los frutos seleccionados para la obtención de las semillas procedieron de plantas sanas, que eran buenas productoras. El fruto era con forma cilíndrica y alargada. A partir del fruto maduro se extrajeron las semillas situadas en la parte central. Estas se

lavaron con agua corriente y se dejaron secar durante 3 días. Posteriormente se retiró el mucilago de las semillas (Maldonado, 2004).

#### **5.4.2. Ensayos de producción de *C. papaya***

##### **5.4.2.1. Preparación de sustrato y charolas de almácigo**

Se utilizaron charolas de almácigos para papaya, para probar los diferentes tratamientos. El sustrato fue una mezcla de tierra, fibra de coco y estiércol de res, en proporción 1:1:1 V/V (CONABIO, 2007). Esta mezcla se tinalizó durante 3 horas a 15 libras de presión para su desinfección. El pH del suelo fue de 6.5 (Sánchez, 2005).

##### **5.4.2.2. Características del cuarto de cultivo**

Se utilizaron lámparas lineales fluorescentes de 40 Watts emitiendo una luminancia aproximadamente de 2000 luxes (Hurtado, 1987; <http://www.firstrays.com/measurelight.htm>). El fotoperiodo fue de 16 horas luz. El porcentaje de humedad relativa promedio fue del 45%. La temperatura en el cuarto de cultivo fue regulada a 26°C. Se proporcionaron riegos diarios con agua corriente, por aspersion a las charolas de almácigo (González *et al.*, 2005).

#### **5.4.3. Inoculación de tratamientos seleccionados**

##### **5.4.3.1. Diseño experimental: Distribución completamente al azar (DBA)**

El diseño experimental que se empleó fue una **Distribución Completamente al azar (DBA)**. Los tratamientos probados fueron 17 (Tabla 5-3) con 15 repeticiones cada uno, teniendo un total 255 unidades experimentales (Figura 5-2).

	17	1	4	5	7	11	1	15	1	11	14	10	14	13	5	15	15	4	12	3	
	7	4	3	17	3	8	9	16	1	6	11	12	3	7	16	17	17	4	4	13	
	13	10	6	15	12	7	4	4	14	9	5	16	6	3	12	14	17	12	2	14	
	2	3	14	11	2	6	14	1	15	7	1	6	4	10	6	15	16	11	15	17	
16	2	11	15	5	3	1	13	7	11	11	1	16	17	17	8	13	4	1	2	12	16
4	5	6	3	12	14	8	10	5	14	5	5	8	5	12	8	10	13	9	16	12	6
14	6	13	10	7	5	14	13	2	13	8	17	8	13	3	15	15	3	9	17	11	1
11	16	8	9	6	17	17	15	3	9	12	8	10	2	12	2	5	10	6	10	8	11
2	11	2	15	15	2	7	13	3	4	16	16	9	9	7	10	2	8	6	12	17	15
12	16	10	5	7	1	1	9	5	16	1	7	10	7	11	1	14	15	10	14	2	13
10	9	4	4	14	1	12	10	11	3	4	8	8	6	12	7	5	6	17	9	13	3
5	3	6	7	2	8	9	13	4	7	10	14	8	9	9	9	11	16	16	13	3	17

**Figura 5-2. Diseño Completamente al Azar (DCA) de los tratamientos a probar en los cultivos de *C. papaya* a nivel laboratorio. Los números indican el tratamiento que se aplicó.**

**Tabla 5-3. Tratamientos a probar en los cultivos de *C. papaya* a nivel laboratorio**

Número de Tratamiento	Tratamiento
1	MMRL1
2	MMRL2
3	MMRL3
4	MMRL4
5	MMRL5
6	MMRL6
7	MMRL7
8	MMRL8
9	MMRL9
10	MMRL10
11	MMRL11
12	MMRL12
13	MMRL13
14	CMP ( Consorcio microbiano)
15	Testigo positivo químico ( Nitrofoska)
16	Testigo positivo biofertilizante ( PHC BioPak)
17	Testigo negativo

#### 5.4.3.2. Aplicación del inoculante

El inoculante se aplicó por aspersión directamente sobre la semilla antes de la siembra. Por cada 3 semillas se utilizaron 0.5 mL del inoculante ( $1 \times 10^9$  UFC/mL); se utilizó una solución de sacarosa al 15% para facilitar la adherencia de los inoculantes (Bernal *et al.*, 2002). Posteriormente la inoculación de los diferentes inoculantes se realizó en el

suelo, cada quince días como lo indicaban los productos comerciales adquiridos (ANEXO IV).

#### 5.4.4. Medición de variables respuesta en el cuarto de cultivo

El efecto de crecimiento de las plantas de *C. papaya* por la aplicación de los diferentes tratamientos se evaluó por las variables de respuesta siguientes, durante un tiempo de 65 días:

**Porcentaje de emergencia de plántulas:** Se contabilizó el número de plántulas emergidas de cada tratamiento durante 65 días, considerando desde la aparición del hipocótilo sobre el suelo (Quiñones *et al.*, 2003).

**Tiempo de germinación:** Se observó y anotó durante 65 días el día de emergencia de las plántulas de cada uno de los tratamientos y se realizó el promedio, determinando así el tiempo que tardaron en germinar cada una de las plantas (Chilo *et al.*, 2009).

**Altura de planta:** Se midió cada 3 días con un flexómetro desde la base del tallo hasta la yema apical, determinándose la altura alcanzada de las plantas de cada tratamiento después de 65 días y se calculó el promedio de estas por cada tratamiento (Salguero, 2006).

**Número de hojas:** Se determinó el número de hojas presentes a los 65 días después de la siembra y se calculó el promedio de estas por cada tratamiento (Salguero, 2006).

### 5.5. Análisis de datos

#### 5.5.1. Análisis estadístico GraphPad Prism 5

Los datos de las variables se analizaron de acuerdo a un diseño completamente al azar, mediante el programa GraphPad Prism 5. Se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Respuesta en la  $j$ -ésima unidad experimental con el tratamiento  $i$ -ésimo

$\mu$  = Media general, común a todas las unidades antes de aplicar los tratamientos

$\tau_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

$\varepsilon_{ij}$  = Error experimental en la  $j$ -ésima repetición del  $i$ -ésimo tratamiento

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Aislamiento de microorganismos

Para el aislamiento de los microorganismos del suelo de *C. papaya*, la porción del suelo muestreada corresponde a la zona de la rizosfera ya que es la porción que está sujeta a la influencia de las raíces, y es donde se lleva a cabo una intensa actividad microbiana, debido a la liberación de compuestos orgánicos por parte de la planta (Calle, 2005).

Se utilizaron 2 medios de cultivo (simple y sintético) específicos para bacterias aerobias, el medio agar nutritivo (AN) y medio agar extracto de suelo (MAES) (ANEXO I), esto debido a que la mayoría de las bacterias que son importantes para las plantas necesitan oxígeno para crecer (Sánchez, 2005). Otras características de los microorganismos benéficos para los cultivos es que estos son heterótrofos y mesófilos, por lo que se utilizó una temperatura en los experimentos de 37°C para el crecimiento de las bacterias.

Se obtuvieron 13 aislados de la rizosfera de *C. papaya* (MMRL1, MMRL2, MMRL3, MMRL4, MMRL5, MMRL6, MMRL7, MMRL8, MMRL9, MMRL10, MMRL11, MMRL12 y MMRL13). Posteriormente se obtuvo el cultivo puro de cada de una de las cepas aisladas para su estudio y almacenamiento. Como ejemplo del aislamiento, en la Figura 6-1 se muestra el cultivo puro de MMRL11 en medio MAES.



**Figura 6-1. Aislado MMRL11 de la rizosfera de *C. papaya*. Cultivo puro en medio Agar Extracto de Suelo (MAES).**

## 6.2. Análisis macroscópico y microscópico

Para la identificación bacteriana primeramente se realizó el análisis macroscópico y microscópico (Bergey, 1994).

En el análisis macroscópico los microorganismos aislados se sembraron en AN y MAES y se incubaron a 37°C durante 24 horas utilizando la técnica de estría cruzada. Transcurrido este tiempo se analizaron las características morfológicas de las colonias bacterianas.

Los 13 aislados (MMRL1 a MMRL13) presentaron colonias de tamaño mediano (1.0-2.0 mm) a grande (>2.0 mm); de color blanco, beige, blanco-hialino. Su crecimiento fue en forma circular, irregular y rizoide; bordes entero, lobulado y lacerado; su elevación fue convexa y elevada, la superficie fue lisa, de aspecto húmedo y consistencia suave (Tabla 6-1).

**Tabla 6-1. Análisis macroscópico de las bacterias aisladas de la rizosfera de *C. papaya* en medio AN y MAES**

Muestra	Medio de cultivo	Tamaño (mm)	Forma	Borde	Elevación	Color	Superficie	Aspecto	Consistencia
MMRL1	AN	1.5	Circular	Entero	Convexa	Blanco	Lisa	Húmedo	Suave
MMRL2	AN	3	Irregular	Lobulado	Convexa	Beige	Lisa	Húmedo	Suave
MMRL3	AN	2	Circular	Entero	Convexa	Blanco	Lisa	Húmedo	Suave
MMRL4	AN	2.5	Circular	Entero	Elevada	Blanco	Lisa	Húmedo	Suave
MMRL5	MAES	2	Circular	Entero	Elevada	Blanco	Lisa	Húmedo	Suave
MMRL6	MAES	1	Rizoide	Lacerado	Elevada	Blanco	Lisa	Húmedo	Suave
MMRL7	MAES	3.5	Circular	Lobulado	Convexa	Blanco	Lisa	Húmedo	Suave
MMRL8	MAES	3	Circular	Entero	Elevada	Blanco-Hialino	Lisa	Húmedo	Suave
MMRL9	MAES	2	Rizoide	Lacerado	Convexa	Blanco	Lisa	Húmedo	Suave
MMRL10	MAES	4	Circular	Entero	Elevada	Blanco	Lisa	Húmedo	Suave
MMRL11	MAES	4.5	Irregular	Lobulado	Elevada	Blanco	Lisa	Húmedo	Suave
MMRL12	MAES	5	Irregular	Lobulado	Elevada	Blanco	Lisa	Húmedo	Suave
MMRL13	MAES	2	Circular	Entero	Convexa	Blanco	Lisa	Húmedo	Suave

Forma: Puntiforme , Circular , irregular , rizoide , filamentosa , como huso   
 Borde: Entero , ondulado , lobulado , lacerado , filamentoso , rizado   
 Elevación: Plana , elevada , convexa , pulvinada , umbilicada 

Para realizar el análisis microscópico, los microorganismos aislados se sembraron por estría cruzada en AN y MAES y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se realizó una tinción de Gram, la cual aporta dos ideas básicas para la definición taxonómica de las bacterias aisladas. La primera es el colorante retenido tras la tinción, identificando el grupo al que pertenecen las bacterias Gram positivo (violeta) o Gram negativo (rojo) y la segunda es la forma que presentan las células bacterianas como lo son cocos, bacilos, espirilos, vibrios, etc. (Madigan, 2009).

Los resultados de la tinción de Gram se muestran en el Tabla 6-2, determinando que de las 13 bacterias aisladas, 8 aislados bacterianos (61%) corresponde a bacilos Gram positivos con extremos redondeados y cuadrados, 4 aislados bacterianos (31%) a bacilos negativos con formas rectas y 1 aislado bacteriano (8%) a cocos Gram positivos en formas irregulares.

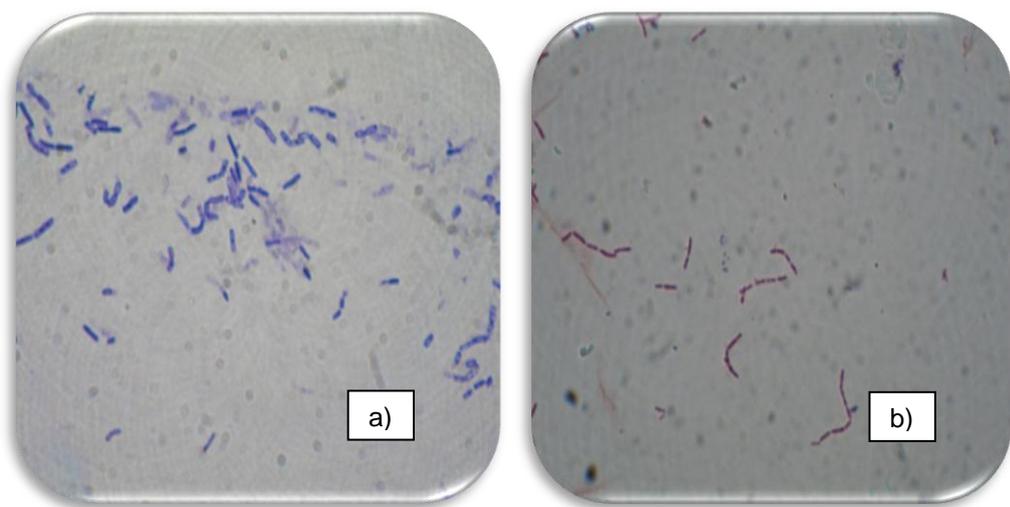
En la figura 6-2 se observan las imágenes de microscopía con el objetivo 100X realizadas a las cepas aisladas MMRL4 y MMRL5 las cuales corresponden a bacterias con forma de bacilos (bastones rectos) y Gram positivo y negativo.

En el suelo la mayoría de las poblaciones bacterianas aerobias están compuestas por géneros Gram positivos. No sería correcto generalizar los porcentajes de varios grupos, pero no es extraño encontrar que hasta el 70% de la totalidad de los aislamientos bacterianos del suelo se clasifican dentro de las bacterias Gram positivas (Grant, 1998). Mientras que la forma característica de las bacterias del suelo comúnmente es bacilar, en menor proporción cocos y raramente espirilos (Varma, 2005).

Una vez conocido el Gram, se prosiguió con la identificación de los microorganismos, ya que este permitió realizar la selección de pruebas bioquímicas recomendadas; ya que existen pruebas que son comunes en ambos grupos y otras que son esenciales para la identificación (Bergey, 1994).

**Tabla 6-2. Análisis microscópico de los microorganismos aislados de la rizosfera de *C. papaya***

Cepa	Medio de cultivo	Gram	Forma	Agrupación
MMRL1	AN	(+)	Bacilos	Estreptobacilos
MMRL2	AN	(+)	Bacilos	Estreptobacilos
MMRL3	AN	(+)	Bacilos	Estreptobacilos
MMRL4	AN	(+)	Bacilos	Estreptobacilos
MMRL5	MAES	(-)	Bacilos	Estreptobacilos
MMRL6	MAES	(-)	Bacilos	Células libres
MMRL7	MAES	(-)	Bacilos	Células libre
MMRL8	MAES	(-)	Bacilos	Células libres
MMRL9	MAES	(+)	Bacilos	Estreptobacilos
MMRL10	MAES	(+)	Cocos	Estafilococos
MMRL11	MAES	(+)	Bacilos	Estreptobacilos
MMRL12	MAES	(+)	Bacilos	Células libres
MMRL13	MAES	(+)	Bacilos	Estreptobacilos



**Figura 6-2. Microscopía de cepas MMRL4 y MMRL5 con el objetivo 100X. a) MMRL4. Presenta forma de bacilos y Gram positivos y b) MMRL5. Se observa forma de bacilos y Gram negativos.**

### 6.3. Caracterización bioquímica de los microorganismos aislados

Las pruebas bioquímicas se realizaron para la identificación de los 13 microorganismos aislados con base en la detección de enzimas vinculadas con la respiración (oxidasa y catalasa), requerimientos de oxígeno (metabolismo Oxidativo/Fermentativo), detección de enzimas y vías metabólicas (Rojo metilo y Vogues Proskauer), fermentación de carbohidratos (hidrólisis de almidón, caldo rojo fenol, fermentación de azúcares en medio TSI), utilización de sales orgánicas como única fuente de carbono (citrato, malonato, urea), movilidad (SIM y MIO) utilización de compuestos nitrogenados (reducción de nitratos a nitritos) e hidrólisis de proteínas y aminoácidos (licuefacción de gelatina, indol) y movilidad (Bergey, 1994) .

La caracterización bioquímica permitió la identificación presuntiva de los microorganismos aislados del suelo de la rizosfera de *C. papaya* a nivel de género (MMRL4, MMRL5, MMRL6, MMRL7, MMRL8, MMRL9, MMRL10, MMRL11, MMRL12) y en el caso de las cepas MMRL1, MMRL2, MMRL3, MMRL12 y MMRL13 hasta nivel de especie (Tabla 6-3).

Los microorganismos obtenidos fueron *Bacillus megaterium.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus psychrodurans*, *Sporarosarcina sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.* , *Stenotrophomonas sp.*, *Acidovorax sp.*, *Bacillus sp.*, *Staphylococcus gallinarum*, *Arthrobacter sp.*, *Nocardioides sp.*, y *Bacillus pumilus*. Los resultados de la identificación bioquímica se muestran en la Tabla 6-3.

Se observó que todos los microorganismos fueron positivos a la prueba de catalasa, lo cual comprueba que todas las cepas aisladas son aerobias a excepción de *Staphylococcus sp.* que es una bacteria aerobia facultativa. Sin embargo sólo *Pseudomonas sp.* y *Arthrobacter sp.* poseen la enzima citocromo oxidasa, la cual es característica de estos géneros. MMRL1, MMRL3, MMRL5, MMRL6, MMRL7, MMRL9, MMRL10, MMRL12 y MML13 utilizan el metabolismo oxidativo para actuar sobre un hidrato de carbono, mientras que MMRL2, MMRL4 y MMRL11 utilizan metabolismo fermentativo. En la utilización de carbohidratos el 77% hidroliza almidón, el 23% manitol y 23% Voges Proskauer (característico del género *Staphylococcus*). En lo que corresponde a la utilización de sales orgánicas el 31% utiliza citrato, 54% urea, ninguna

cepa utiliza malonato de sodio como fuente de carbono debido a que es una prueba característica de los géneros de *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, etc. En hidrólisis de proteínas y aminoácidos el 77% realizaron licuefacción de gelatina (prueba definitiva para distinguir especies de *Pseudomonas*) y el 38% hidrolizan el indol (característico *Bacillus*). El 77% reduce nitratos y el 54% presentan flagelos es decir son móviles (características del género *Bacillus*, excepto *Bacillus anthracis* y *Bacillus mycoides*) (MacFaddin 2004; Bergey 1994).

Según Grant (1989) el suelo generalmente está compuesto por bacterias de los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes* y *Nocardia*.

Chung *et. al* (2001) mencionan que por el método de aislamiento de dilución de suelo y sembrado en medio de cultivo sólido destacan los géneros de *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Brevibacterium*, *Caulobacter*, *Cycloclasticus*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Metallogenium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pedomicrobium*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Rasltonia* y *Xanthomonas*. Observándose en el Tabla 6-3 que se aislaron géneros similares a los reportados.

**Tabla 6-3. Pruebas bioquímicas para la identificación de los microorganismos aislados de la rizosfera de *C. papaya***

PRUEBA	C E P A												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Hidrolisis de almidón	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
Fermentación de manitol	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Fermentación de glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Voges Proskauer (VP)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Utilización de Citrato	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Utilización malonato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilización de Urea	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Hidrólisis de gelatina	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Movilidad	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+
Indol	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Reducción de nitratos a nitritos	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Metabolismo oxidativo (O)/ Fermentativo (F)	O	F	O	F	O	O	O	O	O	O	F	O	O
Citocromo Oxidasa	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Identificación presuntiva	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus psychrodurans</i>	<i>Sporosarcina sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Arthrobacter sp</i>	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	<i>Nocardiodes sp.</i>	<i>Bacillus pumilus</i>

#### 6.4. Caracterización molecular de los microorganismos aislados

Para llevar a cabo la caracterización molecular de los microorganismos aislados se amplificó el gen 16S rDNA mediante PCR utilizando el DNA genómico extraído de las diferentes cepas como se describe en la sección 5.2.4 de materiales y métodos. Se utilizaron iniciadores universales para bacterias diseñados como se describe en la sección 5.2.4.3. En todos los casos se obtuvo un fragmento > 500 pb lo cual se verificó al separarlos por electroforesis en un gel de agarosa (resultados no mostrados).

Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias reportadas en el GenBank. Se observó que la secuencia obtenida de los microorganismos MMRL1, MMRL2, MMRL3, MMRL4, MMRL5, MMRL6, MMRL7, MMRL8, MMRL9, MMRL10, MMRL11, MMRL12, MMRL13 presentan una similitud mayor al 98% a los microorganismos *Bacillus sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus psychrodurans*, *Sporosarcina sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter johnsonii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acidovorax sp.*, *Bacillus luciferencis*, *Staphylococcus gallinarum*, *Arthrobacter sp.*, *Nocardioides sp.*, y *Bacillus pumilus.*, respectivamente (Tabla 6-4).

La caracterización molecular permitió la identificación de género y de especie de algunas de las bacterias aisladas de la rizosfera de *C. papaya*. Sin embargo en *Bacillus sp.* (MMRL1) y *Pseudomonas sp.* (MMRL5) no se obtuvieron las secuencias completas de la región 16S rDNA evitando la unión de la región 1-900 y 800-1400 en la herramienta CONTIG del VECTOR NTI, por lo tanto sólo se puede garantizar que MMRL1 y MMRL5 corresponden a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, respectivamente. Mientras que en cuanto a *Sporosarcina sp.* (MMRL4), *Acidovorax sp.* (MMRL8), *Arthrobacter sp.* (MMRL11) y *Nocardioides sp.* (MMRL12), sólo se identificaron hasta nivel de género (Tabla 6-4), debido a errores que presentaron los electroferogramas.

**Tabla 6-4. Identificación molecular de las bacterias aisladas de la rizosfera de *C. papaya* por la similitud de la región 16S rDNA**

Cepa aislada	Microorganismo presuntivo	Similitud (%)
MMRL1 (HM804302)	<i>Bacillus sp.</i> (HM104232)	99%
MMRL2 (HM804296)	<i>Bacillus cereus</i> (HM026606)	100%
MMRL3 (HM804297)	<i>Bacillus psychrodurans</i> (EF101552)	99%
MMRL4 (HM804303)	<i>Sporosarcina sp.</i> (AM237400)	100%
MMRL5 (HM804304)	<i>Pseudomonas sp.</i> (HM216202)	99%
MMRL6 (HM804298)	<i>Acinetobacter jonhsonii</i> (GQ169068)	100%
MMRL7 (HM804299)	<i>Stenotrophomonas malthophilia</i> (HM137729)	100%
MMRL8 (HM804305)	<i>Acidovorax sp.</i> (AB167244)	98%
MMRL9 (HM804300)	<i>Bacillus luciferensis</i> (DQ870692)	100%
MMRL10 (HM804306)	<i>Staphylococcus gallinarum</i> (GQ280080)	99%
MMRL11 (HM804307)	<i>Arthrobacter sp.</i> (AY605543)	98%
MMRL12 (HM804308)	<i>Nocardioides sp.</i> (GQ921951)	100%
MMRL13 (HM804301)	<i>Bacillus pumilus</i> (GU568205)	100%

Hasta la fecha, no se han encontrado reportes acerca de la población microbiana de la rizosfera de *C. papaya*, a pesar de ser un cultivo importante en nuestro país como se mencionó en la sección 1.1. Por lo que este trabajo permitió conocer algunos de los géneros y especies que se encuentran en la microbiota bacteriana de la rizosfera de *C. papaya*. Siendo de suma importancia para la realización de nuevas tecnologías agrícolas como lo son los inoculantes que se verá más adelante en la sección 6.7.

Cabe mencionar que los microorganismos identificados en este trabajo (Tabla 6-4), se han encontrado con anterioridad en el suelo de diversos cultivos en diferentes regiones (Tabla 6-5).

**Tabla 6-5. Reportes de géneros de bacterias aisladas de suelo, identificadas en este trabajo.**

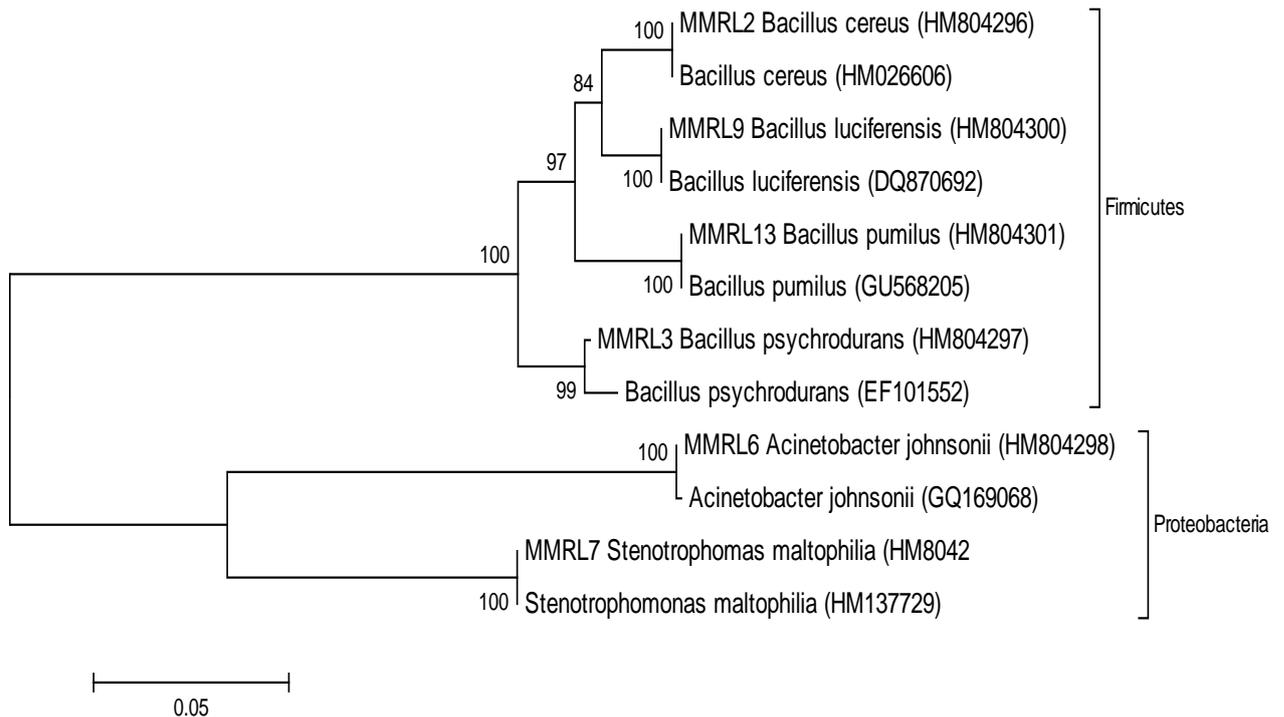
<b>Genero</b>	<b>Autor</b>	<b>Microorganismo</b>
<b>Bacillus</b>	Benavides <i>et al.</i> , 2006	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus licheniformis</i>
	Hye Sook <i>et al.</i> , 2009	<i>Bacillus luciferensis</i>
	Vivas <i>et al.</i> , 2008	<i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>Sporosarcina</b>	kwon, 2007	<i>Sporosarcina koreensis</i> <i>Sporosarcina soli</i> <i>Sporosarcina psychrophila</i>
<b>Pseudomonas</b>	Benavides <i>et al.</i> , 2006	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	Perez <i>et al.</i> 2010	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Benavides <i>et al.</i> , 2006	<i>Pseudomonas putida</i>
<b>Acinetobacter</b>	Nichimura <i>et al.</i> , 1988	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter johnsonii</i> <i>Acinetobacter radioresistence</i>
<b>Stenotrophomonas</b>	Lee <i>et al.</i> , 2002	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	Heylen <i>et al.</i> , 2007	<i>Stenotrophomonas terrae</i> <i>Stenotrophomonas humi</i>
	Yoon <i>et al.</i> , 2006	<i>Stenotrophomonas dokdonensis</i>
<b>Acidovorax</b>	Choi <i>et al.</i> , 2010	<i>Acidovorax facilis</i> <i>Acidovorax soli</i>
<b>Staphylococcus</b>	Arriaga, 2009	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus gallinarum</i>
<b>Arthrobacter</b>	Zhang <i>et al.</i> , 2009	<i>Arthrobacter alpinus</i>
	Lee, 2003	<i>Arthrobacter koreensis</i>
	Pipke, 1988	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>
<b>Nocardioides</b>	Yoon, 2005	<i>Nocardioides kribbensis</i>
	Cho, 2010	<i>Nocardioides panacisoli</i>

### 6.5. Análisis filogenético

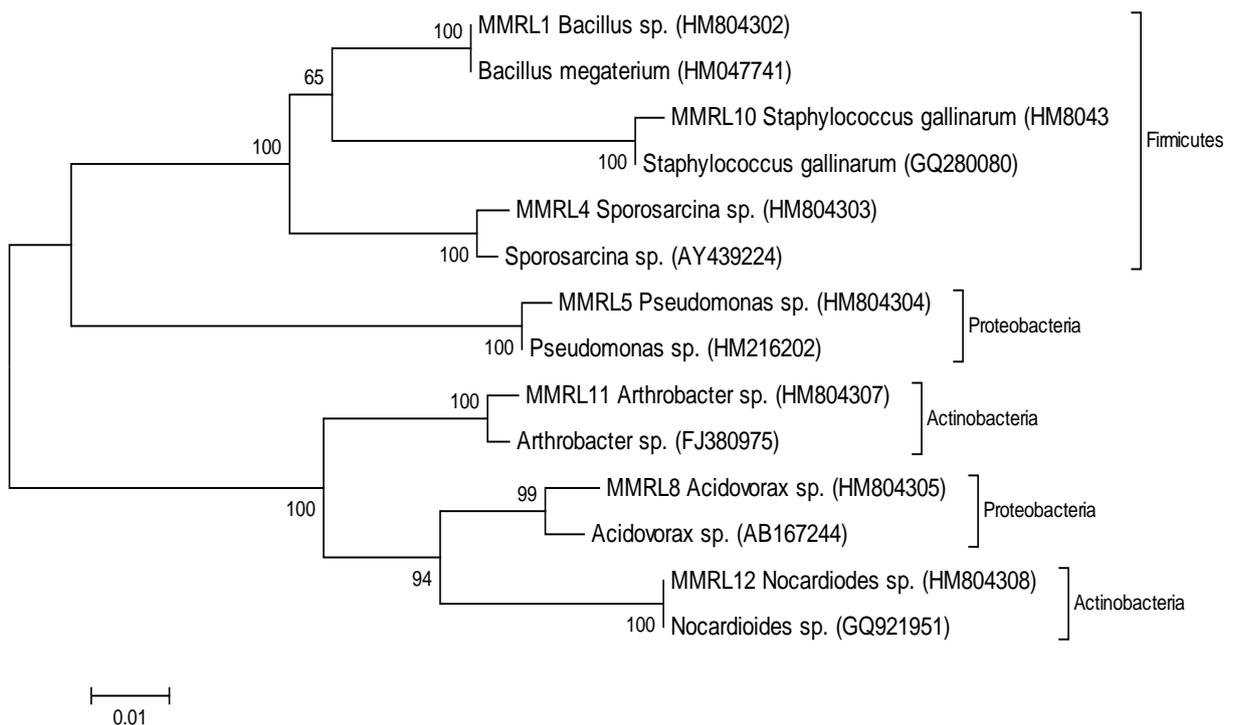
Para determinar la relación filogenética de los microorganismos aislados de la rizosfera de *C. papaya* se construyó un árbol filogenético utilizando la herramienta Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) del programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007).

La Figura 6-3 muestra el alineamiento de secuencias de más de 1300 pb, mientras que la Figura 6-4 muestra un alineamiento con 600 pb, debido a las situaciones mencionadas en el apartado 6.4.

En las figuras 6-3 y 6-4 se puede ver que se identificaron microorganismos pertenecientes a las proteobacterias dentro de las cuales se encuentran *Pseudomonas*, *Stenentrophomonas*, *Acinetobacter* y *Acidovorax*. También se encontraron firmicutes entre las cuales se lograron identificar *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Sporosarcina*. Así mismo se observan Actinobacterias como *Arthrobacter* y *Nocardioides*



**Figura 6-3. Árbol filogenético utilizando secuencias completas. La suma de la longitud de la rama es de 0.48496491. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. El análisis filogenéticos se realizó en MEGA 4 (Tamura, 2007). Los número en los nodos muestran los valores de bootstrap >84% (Felsenstein J., 1985).**



**Figura 6-4. Árbol filogenético utilizando secuencias incompletas. La suma de la longitud de la rama es de 0.33041522. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. El análisis filogenético se realizó en MEGA 4 (Tamura, 2007). Los números en los nodos muestran los valores de bootstrap >65% (Felsenstein J., 1985).**

### **6.6. Identificación de los microorganismos de la rizosfera de *C. papaya***

Las pruebas bioquímicas y la caracterización molecular permitieron identificar el género y la especie (exceptuando MMRL1, MMRL4, MMRL5, MMRL8, MMRL11 y MMRL12), de los microorganismos aislados de la rizosfera de *C. papaya*, estableciendo que los microorganismos aislados son: *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus psychrodurans*, *Sporosarcina* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter johnsonii*, *Stenotrophomonas malthophilia*, *Acidovorax* sp., *Bacillus luciferensis*, *Staphylococcus gallinarum*, *Arthrobacter* sp., *Nocardioides* sp., y *Bacillus pumilus* (Tabla 6-6).

Así mismo mediante la identificación de los géneros y especies bacterianas de la rizosfera de *Carica papaya*, se contribuyó al conocimiento de la biodiversidad de esta;

microbiota que puede ser capaz de producir inoculantes ya que los microorganismos en asociación con los cultivos son importantes para el logro de cultivos de alta producción.

El mejoramiento en la calidad microbiológica de los suelos agrícolas debido a la incorporación de microorganismos seleccionados para contribuir a la implantación, desarrollo y producción de cultivos es una alternativa que contribuye al logro de mejores cultivos (Benavides *et al*, 2008). Por lo tanto la identificación de las bacterias del suelo es de gran interés biotecnológico, debido a las oportunidades que presentan para desarrollar tecnología innovadora como lo son los inoculantes.

**Tabla 6-6. Resultados comparativos de caracterización bioquímica y molecular**

<b>Cepa</b>	<b>Microorganismo de Caracterización bioquímica</b>	<b>Microorganismo de Caracterización molecular</b>
MMRL1	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus sp.</i>
MMRL2	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
MMRL3	<i>Bacillus psychrodurans</i>	<i>Bacillus psychrodurans</i>
MMRL4	<i>Sporosarcina sp.</i>	<i>Sporosarcina sp.</i>
MMRL5	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
MMRL6	<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
MMRL7	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	<i>Stenotrophomonas malthophilia</i>
MMRL8	<i>Acidovorax sp.</i>	<i>Acidovorax sp.</i>
MMRL9	<i>Bacillus luciferensis</i>	<i>Bacillus luciferensis</i>
MMRL10	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
MMRL11	<i>Arthrobacter sp.</i>	<i>Arthrobacter sp.</i>
MMRL12	<i>Nocardioides sp.</i>	<i>Nocardioides sp.</i>
MMRL13	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>

## 6.7. Selección de las cepas aisladas con potencial para ser utilizadas como inoculantes en los cultivos de *C. papaya*

Para seleccionar los microorganismos a utilizar como inoculantes se llevo a cabo una revisión bibliográfica en la cual se buscó el potencial que han mostrado los microorganismos identificados (Tabla 6-6) en trabajos previos. Así se encontró que miembros del género *Bacillus* han sido empleados como inoculantes ya que presentan funciones fungicidas como es el caso de *Bacillus luciferencis* (Hye Sook *et al*, 2009), algunos otros como *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* y *Bacillus pumilus* favorecen la absorción de nutrientes, fijan nitrógeno y promueven el crecimiento. El género *Sporosarcina* es degradador de urea, facilitando la absorción de nutrientes del suelo. Algunos microorganismos del género *Pseudomonas* son biorreguladores de plagas y enfermedades como *Pseudomonas putida* y algunos otros promueven el crecimiento vegetal. Microorganismos del género *Acinetobacter* pueden solubilizar el fósforo de los suelos para ponerlo a disposición de la planta (Rai, 2006).

Algunas bacterias del género *Staphylococcus* son fijadoras de nitrógeno y solubilizadoras de fosfato como *Staphylococcus gallinarum* (Caballero, 2006).

El género *Arthrobacter* ayuda a promover el crecimiento vegetal (Rai, 2006) y ha sido empleado para la biorremediación de suelos como lo es la especie de *Arthrobacter atrocyaneus* (Pipke, 1988).

Para los géneros *Stenotrophomonas* y *Acidovorax* no se encontró ningún beneficio específico para las plantas, aunque es importante mencionar que al género *Stenotrophomonas* lo reportan con capacidad para degradar tolueno, benceno, etilbenzeno, y xileno como *Stenotrophomonas maltophilia* (Lee *et al.*, 2002), esto permite plantear su potencial en la biorremediación de suelos; mientras que el género *Acidovorax* ha sido estudiado en procesos de degradación de herbicidas de la familia de las s-triazinas (Rai, 2006).

La búsqueda bibliográfica permitió confirmar el potencial de los microorganismos aislados como inoculantes debido a sus funciones benéficas hacia los cultivos, lo cual ha sido comprobado con anterioridad. En base a esto, se planteó analizar las 13 bacterias aisladas de la rizosfera de *C. papaya* y también se decidió probar un consorcio microbiano (CMP) utilizando los microorganismos aislados, que fueran similares al de un producto orgánico comercial, en este caso PHC BioPak. A su vez se

compararon con un testigo positivo químico (Nitrofoska), testigo positivo orgánico (PHC Biopak) y testigo negativo (en el cual el inoculante consistía en agua) (Tabla 6-7).

**Tabla 6-7. Composición de los diferentes inoculantes probados en *C. papaya* a nivel laboratorio**

<b>Número de Tratamiento</b>	<b>Tratamiento</b>
1	<i>Bacillus sp.</i>
2	<i>Bacillus cereus</i>
3	<i>Bacillus psychrodurans</i>
4	<i>Sporosarcina sp.</i>
5	<i>Pseudomonas sp.</i>
6	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
7	<i>Stenotrophomas malthophilia</i>
8	<i>Acidovorax sp.</i>
9	<i>Bacillus luciferensis</i>
10	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
11	<i>Arthrobacter sp.</i>
12	<i>Nocardioides sp.</i>
13	<i>Bacillus pumilus</i>
14	CMP ( Consorcio microbiano): <i>Bacillus sp., Bacillus cereus y Pseudomonas sp.</i>
15	Testigo positivo químico (Nitrofoska)
16	Testigo positivo biofertilizante ( PHC BioPak)
17	Testigo negativo

El diseño experimental que se empleó para el análisis estadístico de los datos fue un Diagrama Completamente al azar como se muestra en la Figura 5-2.

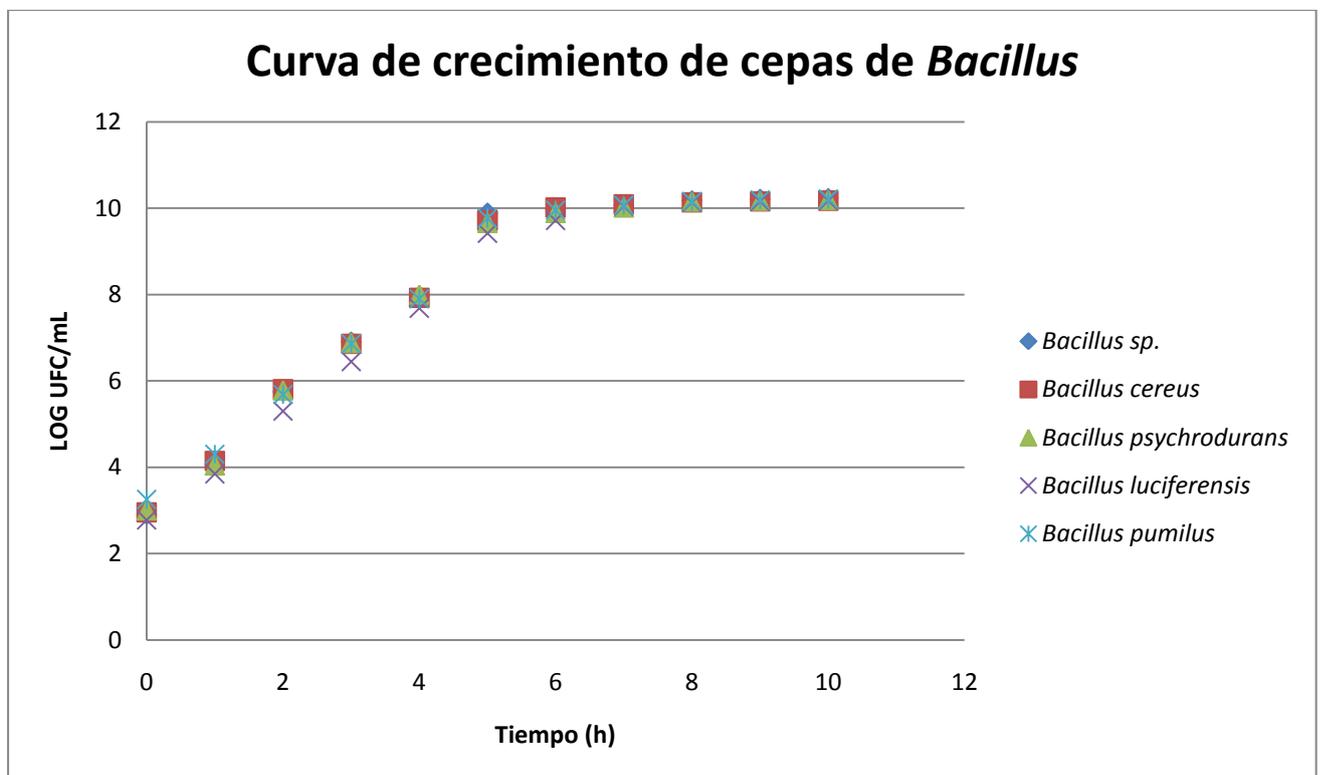
### **6.8. Producción de inoculantes**

Para la producción de los inoculantes las 13 bacterias aisladas fueron llevadas a un medio líquido con los mismos elementos nutricionales que los medios sólidos, para la obtención de un inóculo semilla incubado durante 12 h a una agitación de 220 rpm a una temperatura de 37°C.

La cinética de crecimiento se llevó a cabo durante 10 h a 320 rpm a 37°C. Para determinar el crecimiento microbiano de cada uno de los aislados, se utilizó el método directo de siembra por extensión con varilla (sección 5.2.1.) tomando muestra cada hora.

En la figura 6-5 se muestra la dinámica de crecimiento microbiano en UFC/mL a los diferentes tiempos de toma de muestra ( $t_0$ - $t_{10}$ ) de las bacterias aisladas del género *Bacillus*, obtenidos de la rizosfera de *C. papaya*: *Bacillus sp.* (MMRL1), *B. cereus* (MMRL2), *B. psychrodurans* (MMRL3), *B. luciferensis* (MMRL9) y *B. pumilus* (MMRL13). El valor inicial de microorganismos en el género de *Bacillus* La interpolación de los datos obtenidos permitió obtener el tiempo en que se alcanza una población de  $1 \times 10^9$  UFC/mL de cada una de las cepas a probar.

El tiempo de propagación para alcanzar  $1 \times 10^9$  UFC/ mL para las cepas puras y el consorcio se muestra en el Tabla 6-8.



**Figura 6-5. Curva de crecimiento de las de cepas de *Bacillus*. El tiempo en que se alcanza una población de  $1 \times 10^9$  UFC/ mL para el género de *Bacillus* es aproximadamente 4.20 horas.**

**Tabla 6-8. Tiempo en que se alcanza la población de  $1 \times 10^9$  UFC/ mL de los microorganismos aislados**

<b>Microorganismo</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Tiempo para formar <math>1 \times 10^9</math> UFC/ mL (h)</b>
<b>MMRL1</b>	<i>Bacillus sp.</i>	4.30
<b>MMRL2</b>	<i>Bacillus cereus</i>	4.10
<b>MMRL3</b>	<i>Bacillus psychrodurans</i>	4.20
<b>MMRL4</b>	<i>Sporosarcina sp.</i>	4.05
<b>MMRL5</b>	<i>Pseudomonas sp.</i>	4.25
<b>MMRL6</b>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	4.40
<b>MMRL7</b>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4.35
<b>MMRL8</b>	<i>Acidovorax sp.</i>	4.45
<b>MMRL9</b>	<i>Bacillus luciferensis</i>	4.40
<b>MMRL10</b>	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	4.40
<b>MMRL11</b>	<i>Arthrobacter sp.</i>	4.40
<b>MMRL12</b>	<i>Nocardioides sp.</i>	4.25
<b>MMRL13</b>	<i>Bacillus pumilus</i>	4.15
<b>CMP</b>	( <i>Bacillus sp.</i> , <i>B. cereus</i> y <i>Pseudomonas sp.</i> )	4.17

#### **6.9. Ensayo de cultivo de *C. papaya* inoculado con diferentes tratamientos bajo condiciones de cuarto de cultivo**

La inoculación de los 17 tratamientos a las plantas de *C. papaya* inició el 25 de Febrero de 2010 y finalizó el 30 de Abril del 2010, es decir se analizaron, midieron y observaron diferentes características en el crecimiento y desarrollo de los cultivos de *C. papaya* durante 65 días, las cuales se muestran a continuación:

La inoculación de *C. papaya* se realizó cada quince días, realizándose un total de 5 inoculaciones durante 65 días. El volumen que se inoculó de cada tratamiento en *C. papaya* fue 0.5 mL (Tabla 6-9).

**Tabla 6-9. Inoculación de los 17 tratamientos en las plántulas de *C. papaya* durante el período del 25-Feb-10 al 30-Abr-2010**

Mes	Días						
	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
Febrero				25 1° Inoculación	26	27	28
Marzo	1	2	3	4	5	6	7
	8	9	10	11	12 2° Inoculación	13	14
	15	16	17	18	19	20	21
	22	23	24	25	26	27 3° Inoculación	28
	29	30	31				
Abril				1	2	3	4
	5	6	7	8	9	10	11 4° Inoculación
	12	13	14	15	16	17	18
	19	20	21	22	23	24	25
	26 5° Inoculación	27	28	29	30		

La temperatura promedio en el cuarto de cultivo fue de 25.5°C, obteniendo un máximo alcanzando de 27 °C y un mínimo alcanzado de 21°C. Maldonado (2004) menciona que la temperatura óptima para el crecimiento de plántulas de *C. papaya* se encuentra en un intervalo de 22°C hasta 28°C.

La humedad relativa promedio fue de 45-50%, el cual es un factor que no se controló, sin embargo se trató de corregir por el riego constante de las plántulas. Maldonado (2004) reporta que la humedad relativa óptima para plántulas de *C. papaya* es de 70-80% notándose que es un rango superior al que se registró, el cual se discutirá más adelante.

## 6.10. Variables respuesta

### 6.10.1. Porcentaje de emergencia de plántulas

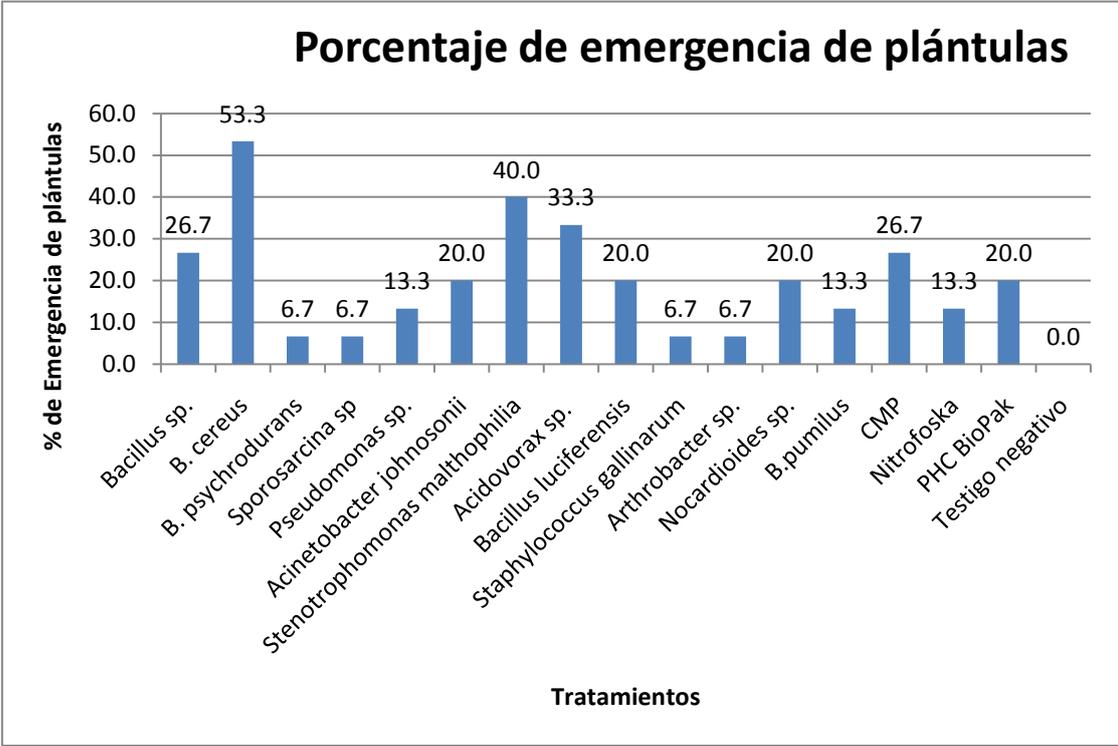
El porcentaje de emergencia de plántulas fue el número de plantas emergidas totales de *C. papaya* inoculadas con cada uno de los 17 tratamientos por las 15 repeticiones a los 65 días de sembradas (Quiñones *et al.*, 2003)

Cabe mencionar que como se quería evaluar el efecto real de los inoculantes, es decir sin la influencia de un método que pudiera mejorar o aumentar el porcentaje de emergencia de plántulas de *C. papaya* en un tiempo determinado; las semillas utilizadas fueron directamente del fruto (semillas silvestres), es decir no se utilizaron semillas certificadas las cuales tienen un porcentaje de emergencia de plántulas mayor al 80% (CONABIO, 2007), así mismo no se le realizó ningún método pregerminativo a las semillas, ya que estos métodos influyen en el porcentaje de emergencia de plántulas dando resultados aproximados del 50-60% en semillas silvestres (Ávila, 2007), y por último el cultivo de *C. papaya* es considerado difícil debido a que las semillas son sensibles a los cambios de temperatura, humedad, etc. Y dichos cambios causan una disminución progresiva de la vialidad y en el porcentaje de emergencia de plántulas (CONABIO, 2007).

En la figura 6-6 se observa el porcentaje de emergencia de plántulas de los 17 tratamientos aplicados por 15 repeticiones, siendo el Tratamiento 2 (*Bacillus cereus*) el que obtuvo la mejor respuesta ( $P < 0.05$ ) con respecto a los demás tratamientos (ANEXO V), incluso con los tratamientos positivos PHC BioPak y Nitrofoska. Así mismo se observó que en los tratamientos inoculados con el testigo negativo no presentaron emergencia durante los 65 días en los que se llevó a cabo el experimento, esto se atribuye a que se utilizó suelo estéril y se inoculó con agua corriente dificultando la emergencia de las plántulas.

El porcentaje de emergencia de plántulas obtenido por el tratamiento 2 (*Bacillus cereus*) fue del 53.3% el cual se considera alto, ya que fue a partir de semillas silvestres, sin ningún método pregerminativo (Ávila, 2007; CONABIO, 2007), esto es

importante ya que la propagación mediante semillas sigue siendo uno de los métodos que, en general resulta más económico y eficiente para la propagación de plantas y el que más utilizan los agricultores (Castro, 2003).



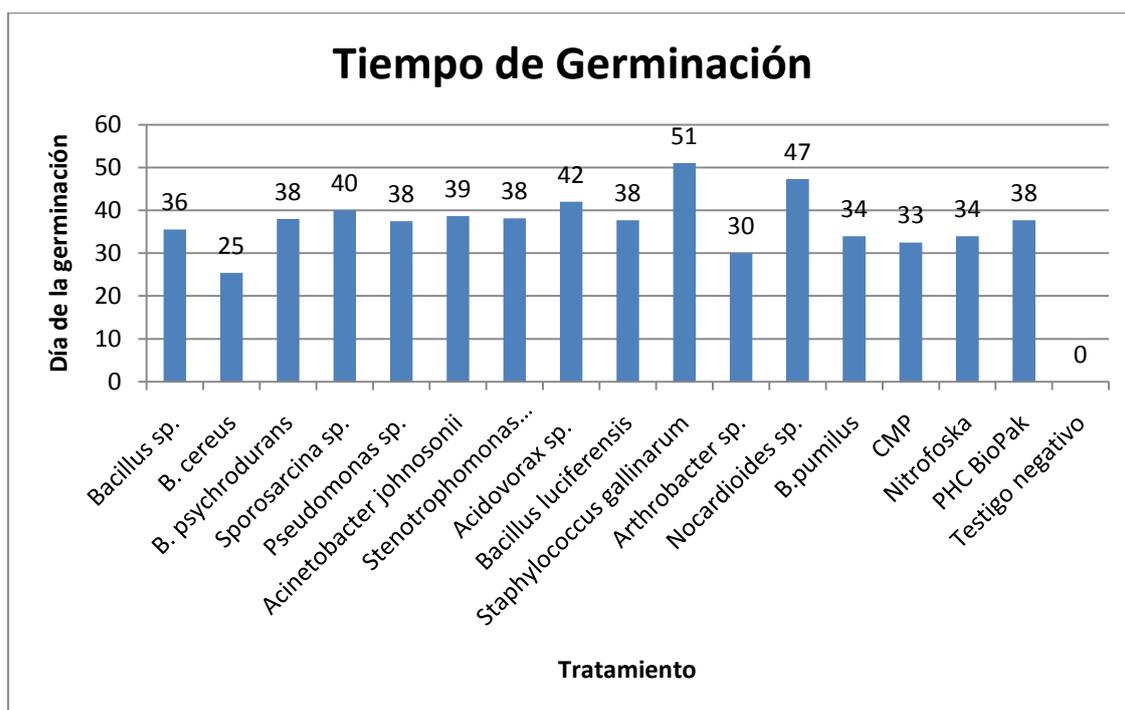
**Figura 6-6. Porcentaje de emergencia de plántulas de los tratamientos probados en los cultivos de *C. papaya*.**

**6.10.2. Tiempo de germinación**

En el tiempo de germinación se anotó el día de emergencia de las semillas para cada uno de los tratamientos y se realizó el promedio (Chilo *et al.*, 2009). El análisis estadístico indicó que había un efecto significativo del tratamiento 2 (*Bacillus cereus*) obteniendo una diferencia significativa de  $P < 0.05$  con respecto a los demás tratamientos e incluso superior a los tratamientos positivos PHC BioPak y Nitrofoska. (Anexo V).

La figura 6-7 muestra el tiempo promedio de germinación de los 17 tratamientos aplicados por 15 repeticiones cada uno, donde se observa que el tratamiento 2

(*Bacillus cereus*) germinó a las 25 días. El cual es un valor que se encuentra dentro de lo reportado en la literatura especializada, que menciona que el tiempo de germinación para semillas silvestres de *C. papaya* es aproximadamente de 20-40 días (Salvador, 2005), mientras que CONABIO (2007) menciona de 15 a 21 días aproximadamente para semillas de *C. papaya* aplicando un método pregerminativo.



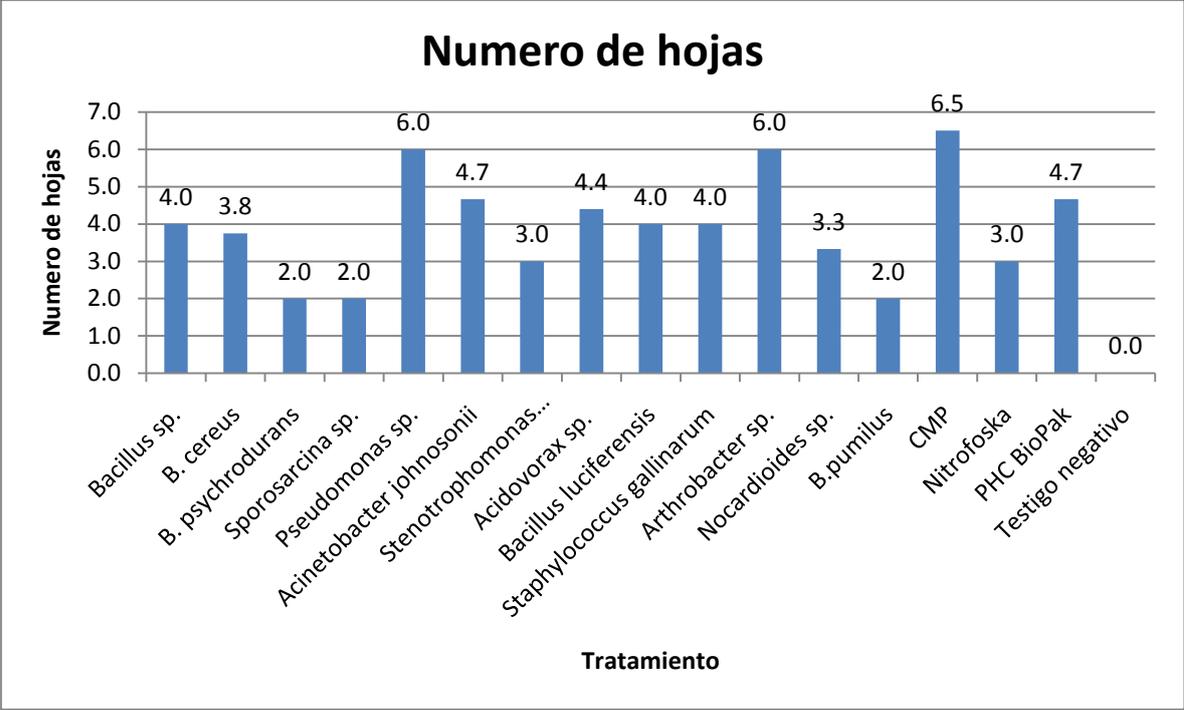
**Figura 6-7. Efecto de los tratamientos sobre el tiempo de germinación en los cultivos de *C. papaya*.**

### 6.10.3. Número de hojas

El número de hojas se determinó cuantificando el número de hojas que poseía cada una de las plantas de *C. papaya* inoculadas con los 17 tratamientos por 15 repeticiones (Salguero, 2006). El análisis indicó diferencias significativas  $P < 0.01$  utilizando el tratamiento 14 (CMP), con respecto a los demás tratamientos (ANEXO V).

En la figura 6-8 se observa el valor mayor de hojas promedio 6.5 de las 4 plántulas de *C. papaya* inoculadas con el tratamiento 14 (CMP) a los 65 días sembradas. No se encontraron datos reportados para la comparación de los resultados obtenidos de esta

variable de respuesta a nivel invernadero, sin embargo, al comparar estos tres tratamientos con los tratamientos positivos (PHC BioPak y Nitrofoska) se puede observar que el CMP y las cepas aisladas en el presente estudio superan notablemente a los productos comerciales.



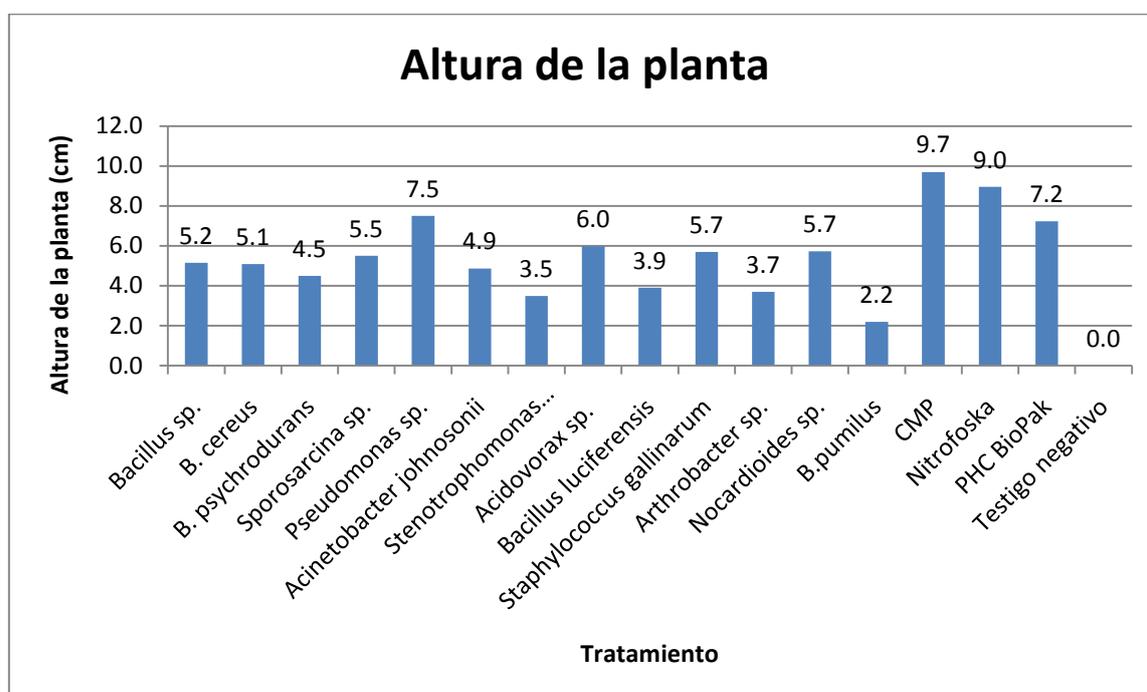
**Figura 6-8. Efecto de los tratamientos en el número de hojas de las plántulas de *C. papaya* a los 65 días de sembradas.**

**6.10.4. Altura de la planta**

La altura de la planta se determinó midiendo con un flexómetro cada una de las plantas de *C. papaya* desde la base del tallo hasta la yema apical inoculadas con los 17 tratamientos por 15 repeticiones (Salguero, 2006). El análisis indicó diferencias significativas en la variable de respuesta de altura de la planta de *C. papaya* a los 65 días de siembra de  $P < 0.01$  del tratamiento 14 que corresponde al CMP con respecto a los demás tratamientos incluyendo a los testigos positivos PHC BioPak y Nitrofoska (ANEXO V)

En la figura 6-9 se muestra que la altura promedio de las 4 plantas de *C. papaya* a los 65 días de sembradas, inoculadas con el tratamiento 14 (CMP) fue de 9.7 cm, valor que se encuentra debajo de lo que reporta CONABIO (2007), donde sitúa un promedio de 10 -15 cm a los 60 días de sembradas, sin embargo esto se atribuye al uso de semillas silvestres, sin ningún método pregerminativo, al no controlar el porcentaje de humedad relativa, el cual es un factor muy importante para el crecimiento de *C. papaya* (Maldonado, 2004) y a los otros problemas que se presentaron y que ya se mencionaron anteriormente.

No obstante al comparar la altura de las plantas con los tratamientos positivos PHC BioPak y Nitrofoska si obtienen diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 6-9. Efecto de los tratamientos en la altura de la planta de *C. papaya* a los 65 días de sembrada.**

### 6.11. Efectividad de los inoculantes

La efectividad de los inoculantes en este trabajo radicó en que estos proporcionaran los mismos o mejores resultados que los productos comerciales (en este caso PHC BioPak y Nitrofoska) y los resultados reportados en la literatura, en lo que correspondía a

porcentaje de emergencia de plántulas, tiempo de germinación, , número de hojas y altura de la planta, brindando a los productores de *C. papaya* nuevas opciones de productos orgánicos que eleven el desarrollo y crecimiento en la etapa germinativa y vegetativa de estos cultivos.

Por lo tanto en los resultados obtenidos en la sección 6.10 se muestra que el tratamiento 2 que corresponde a *Bacillus cereus* presentó efectos positivos en el porcentaje de emergencia de plántulas (53.3%) y tiempo de germinación de las semillas (25 días) de *C. papaya*. Lo cual es importante ya que el tratamiento 2 ofrece a los agricultores dedicados a la germinación de *C. papaya* resultados similares en el porcentaje de emergencia de plántulas y tiempo de germinación utilizando semillas silvestres sin realizarles a estas ningún método pregerminativo y sin la aplicación de productos químicos (Ávila, 2007; CONABIO, 2007). En la figura 6-10 se muestra una plántula de *C. papaya* inoculada con el tratamiento 2 (*Bacillus cereus*).

Así mismo, se encuentra reportado para otros cultivos como trigo y tomate que *Bacillus cereus* como inoculante promueve el crecimiento vegetal (Terry *et al.*, 2005). Armenta (2010) reportó que esta bacteria también ha sido utilizada como controlador biológico de parásitos, entomopatógenos, antagonistas de artrópodos y microorganismos como hongos, bacterias y nematodos.



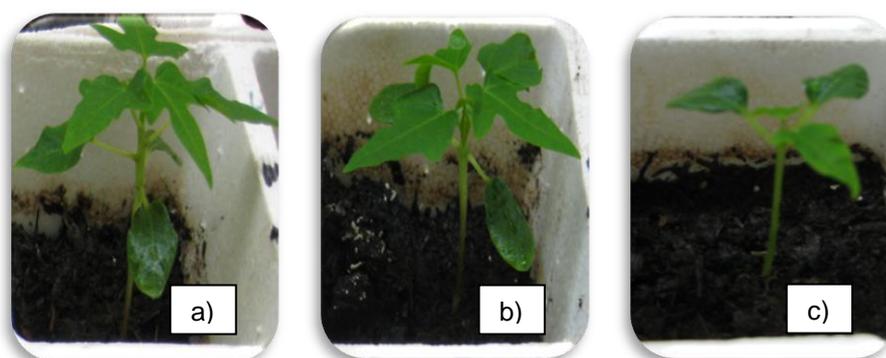
**Figura 6-10. Plántula de *C. papaya* inoculada con el tratamiento 2. Plántula de papaya germinada a los 30 días**

Mientras que las plantas inoculadas con el tratamiento 14 que corresponde al CMP compuesto por *Bacillus cereus*, *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.* Fue el que presentó

mayor número de hojas (6.5 unidades) y altura de la planta (9.7 cm), ofreciendo ventajas en el desarrollo y crecimiento de las plantas de *C. papaya*.

En la figura 6-11 se observa una comparación de los tratamientos 14 (CMP) y de los 2 testigos positivos que son los tratamientos 15 (Nitrofoska) y tratamiento 16 (PHC BioPak).

Para otros cultivos como cebolla y zanahoria, se encuentra reportado que en consorcio los géneros de *Bacillus* y *Pseudomonas* son microorganismos del suelo promotores de crecimiento, y en consorcio estos microorganismos aumentan follaje, promueven el desarrollo y crecimiento de las plantas y previenen y contralan enfermedades (Terry *et al.*, 2005).



**Figura 6-11. Comparación de la altura de la planta. a) Tratamiento 14 (CMP) altura promedio 9.7 cm. b) Tratamiento positivo químico (Nitrofoska) altura promedio 9 cm. c) Tratamiento positivo orgánico (PHC BioPak) altura promedio 7.2 cm.**

Por lo tanto este trabajo demostró la factibilidad como inoculante del tratamiento 2 (*Bacillus cerus*) y el tratamiento 14 (CMP), lo cual es importante ya que el uso de inoculantes en los sistemas productivos, es una alternativa viable e importante para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conserva del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad.

## 7. CONCLUSIONES

- ❖ Las cepas identificadas en la rizosfera de *C. papaya* fueron *Bacillus sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus psychrodurans*, *Sporosarcina sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter johsonii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acidovorax sp.*, *Bacillus luciferensis*, *Staphylococcus gallinarum*, *Arthrobacter sp.*, *Nocardioides sp.*, y *Bacillus pumilus*.
- ❖ Este es el primer trabajo en la literatura abierta que identifica los microorganismos presentes en la rizosfera de *C. papaya*.
- ❖ La concentración de microorganismos utilizada en la formulación de los inoculantes fue de  $1 \times 10^9$  UFC/mL y el tiempo en que se alcanzó esta población microbiana a 300 rpm a 37°C fue en general de 4.3 h.
- ❖ El inoculante formulado con *Bacillus cereus* (MMRL2) permitió un menor tiempo de germinación (25 días), además de demostrar una mejor respuesta en el porcentaje de emergencia de plántulas (53.3%) que los fertilizantes comerciales probados.
- ❖ El inoculante formulado con *Bacillus sp.*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas sp.* (CMP) permitió un mejor desarrollo foliar (6.5 hojas), además de demostrar una mejor respuesta en el crecimiento de las plantas (9.7 cm) que los fertilizantes comerciales probados
- ❖ El presente trabajo ofrece una estrategia agronómica a los agricultores como lo es el uso de inoculantes formulados a partir de las bacterias aerobias aisladas autóctonas de la rizosfera de *C. papaya*.

## 8. PERSPECTIVAS PARA TRABAJOS FUTUROS

- ❖ Escalar el bioproceso de producción de inoculantes para papaya, formulados a partir de los microorganismos aislados de la rizosfera de *C. papaya* aportando un nuevo producto a los agricultores y contribuyendo a la investigación y desarrollo del país.
- ❖ Finalizar la etapa de caracterización e identificación de especies de los microorganismos aislados MMRL1, MMRL4, MMRL5, MMRL8, MMRL10, MMRL11 y MMRL8 de la rizosfera de *C. papaya* para complementar la información de la biodiversidad microbiana de la rizosfera de *C. papaya* y evaluar la patogenicidad de estos.
- ❖ En la formulación de los inoculantes, evaluar diferentes combinaciones o consorcios de los microorganismos aislados y probar diferentes concentraciones de los inoculantes como  $1 \times 10^8$  UFC/mL y  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL, determinando la funcionalidad de estos.
- ❖ En la producción de inoculantes, determinar los parámetros cinéticos de los microorganismos aislados y con base en esto encontrar las características adecuadas de crecimiento de cada una de las bacterias.
- ❖ En la pruebas de los inoculantes, llevar a cabo el experimento a campo y evaluar variables de respuesta como número total de frutos, rendimiento de los frutos, peso individual del fruto, etc.

## 9. GLOSARIO

**Inoculante:** Es un insumo de nutrición vegetal elaborado a base de microorganismos, que al aplicarse al suelo o a las semillas, favorece el aprovechamiento de los nutrimentos en asociación con la planta o su rizosfera (NOM-077-FITO-2000).

**Inóculo:** La introducción de microorganismos en un sustrato cualquiera (INIFAP, 2009)

**Porcentaje de emergencia de plántulas:** Es el número de plantas emergidas totales durante un tiempo determinado (Quiñones *et al.*, 2003).

**Tiempo de germinación:** Es el tiempo en días que tarda en germinar la planta (Chilo *et al.*, 2009).

**Número de hojas:** Es el número de hojas que posee la planta en un tiempo determinado (Salguero, 2006).

**Altura de la planta:** Es la altura de la planta alcanzada en cm durante un tiempo determinado (Salguero, 2006).

## 10. REFERENCIAS

- Alarcon, A. y Ferrera-Cerrato, R. (1999). Manejo de micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas fructícolas. *TERRA* 17 (3): 179-188
- Albareda, M., N., R., Camacho, M. y Temprano, F. (2008). Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculantes: Solida and liquid formulations. *Soil & Biology Biochemistry* 40(11): 2771-2779.
- Alcántara, J. (2000). Adaptación y rendimiento de genotipos de papaya: *Carica papaya* e incidencia del Virus Mancha Anular en Tuxpan Guerrero. Tesis Maestría. Guerrero: Universidad Autónoma de Guerrero, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Ambientales.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25(17): 3389-3402.
- Armenta, D., García, G., Camacho, B., Apodaca, S., G., M. y Nava, P. (2010). Biofertilizantes en el desarrollo Agrícola de México. *Ra Ximhai* 6(1): 51-56.
- Arriaga, L. (2009). Implicaciones del cambio de uso de suelo en la biodiversidad de los matorrales xerófilos un enfoque multiescalar. *Investigación ambiental* 1(1): 6-16.
- Ávila, J. (2007). Efecto de tratamientos pregerminativos en la germinación de semillas de papaya (*Carica papaya*). Tesis Licenciatura. Honduras: Universidad Zamorano.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plants growth-promoting bacteria for use in agriculture *Biotechnol Adv* 4(16): 62-79.
- Becker, S. (1958). The production of papain- an agricultural industry for tropical America. *Economic Botanic* 12(1): 62-79.
- Benavides, L., Quintero, G., Guevara, V., Jaimes, C., Gutierrez, R. y Miranda, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo *Nova- Pùblicaçión científica* 4(5): 82-91.
- Benavides, L., Quintero, G. y Ostos, O. (2006). Aislamiento e identificación de diez cepas bacterianas desnitrificantes a partir de un suelo agrícola contaminado con abonos nitrogenados proveniente de una finca productora de cebolla de la Laguna de Tota, Boyacá, Colombia. *Nova- Pùblicaçión científica* 4(6): 50-54.

- Benavides, R.G. y Hermida, S.A. (2008). Aislamiento e identificación de Flora Bacteriana nativa del suelo de los Páramos Cruz Verde y Guasca (CUNDINAMARCA). Tesis Licenciatura. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.
- Bergey, D. H., Buchanan, R. E., Gibbons, N. E. y American Society for Microbiology. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins Co.
- Bernal, G., Suarez, A., Pérez, M., Campana, D. (2002). Inoculación de la semilla de leguminosas con la bacteria Rhizobium 401 [en línea]. Disponible en <http://agris.fao.org/agri-search/search/display.do;jsessionid=744A2A86382E8A9963F926A513AF01EF0?f=2004/EC/EC04001.xml;EC2003000043>. Consultado 5 Julio 2010.
- Bio-terra2000. BioSafe Agroproductos Bio-rationales [en línea]. Disponible en <http://www.fertibioterra.com/>. Consultado 5 Junio 2010.
- Caballero, M. (2006). Microbiología agrícola e interacciones microbianas con plantas. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48(2): 154-161.
- Camacho, A., M., G., Ortigón, M., Serrano, B. y Velázquez, O. (2009). Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Laboratorio de Alimentos.
- Carrillo, L. (2005). Manual de Microbiología Agrícola. 2º Edición. Argentina: Editorial EDIUNJU.
- Chilo, G., Vacca, M. M., Carabajal, R. y Ochoa, M. (2009). Efecto de la temperatura y salinidad sobre la germinación y crecimiento de plántulas de dos variedades de *Chenopodium quinoa*. *Agriscientia*. 26(1): 15-22
- Cho, C. H., Lee, J. S., An, D. S., Whon, T. W. y Kim, S. G. (2010). *Nocardioides panacisoli* sp. nov., isolated from the soil of a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol* 60(Pt 2): 387-392.
- Choi, J. H., Kim, M. S., Roh, S. W. y Bae, J. W. (2010). *Acidovorax soli* sp. nov., isolated from landfill soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*. ijs.0.019661-0v1- ijs.0.019661-0. En proceso de publicación.
- Chung, W. K. y King, G. M. (2001). Isolation, characterization, and polyaromatic hydrocarbon degradation potential of aerobic bacteria from marine macrofaunal burrow sediments and description of *Lutibacterium anuloderans* gen. nov., sp.

- nov., and *Cycloclasticus spirillensus* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* 67(12): 5585-5592.
- CODEX alimentarius. (2005). Norma del Codex para papayas. En la *Norma del CODEX para la papaya* N° (CODEX STAN 183-1993), FAO/OMS.p.1-4
- CONABIO. (2007). Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad [en línea]. Disponible en <http://www.conabio.gob.mx>. Consultado 01 Junio 2010
- Deaker, R., R., R. y Kennedy, I. R. (2004). Legume seed inoculation technology- a review. *Soil & Biology Biochemistry* 36(1): 1275-1288.
- Dibut, A. (2005). *Biofertilizantes en agricultura sostenible*. México: Editorial Humiworm.
- Dobbelaere S., Vanderleyden, J. y Okon, Y. (2003). Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22(2): 107-149.
- Eldor, A. P. y Francis, C. P. (2007). *Soil Microbiology and Biochemistry*. 3° edición. United Kingdom: Editorial Elsevier.
- FAOSTAT. (2007). Consulta de bases indicadoras de producción mundial y comercio internacional de papaya. FAO [en línea]. Disponible en <http://faostat.fao.org>. Consultado 07 Diciembre 2009.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- First Rays. Measuring Light Intensity with your Cameras's meter [en línea]. Disponible en <http://www.firstrays.com/measurelight.htm>. Consultado 30 Enero 2010
- González A. y Trujillo, G. (2005). Susceptibilidad de *Vasconcellea cauliflora* al virus de la mancha anillada de la lechosa. *Revista de la Facultad de Agronomía* 22(3): 229-240
- Grant, W. y Long, P.E. (1989). *Microbiología ambiental*. España: Editorial Acribia.
- Heylen, K., Vanparys, B., Peirsegaele, F., Lebbe, L. y De Vos, P. (2007). *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(Pt 9): 2056-2061.
- Huerta, A.J.L. (2007). Producción de inoculantes micorrízicos con cepas mexicanas. Tesis Licenciatura. México: Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial.
- HUMIGAMA. Tecnoabono, la salud y nutrición del campo [en línea]. Disponible en <http://www.tecnoabono.com/>. Consultado 21 Enero 2010

- Hurtado, M. D. y Merino, M. M. (1987). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. México: Editorial Trillas.
- Hye Sook, K., Mee, K., Inn Shik, M., Se Chul, C. & Ki, D. (2009). Characterization of *Bacillus luciferensis* Strain KJ2C12 from Pepper Root, a Biocontrol Agent of *Phytophthora Bling* of Pepper. *Plant Pathology Journal* 25(1): 62-69.
- IFOAM. (2005). International Federation of Organic Agriculture Movements [en línea]. Disponible en <http://www.ifoam.org/>. Consultado 9 Diciembre 2009
- INTA. (2002). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [en línea]. Disponible en [http://www.inta.gov.ar/barrow/info/documentos/agricultura/Maiz/informe\\_inocul\\_s\\_olubiliz.pdf](http://www.inta.gov.ar/barrow/info/documentos/agricultura/Maiz/informe_inocul_s_olubiliz.pdf). Consultado 7 Julio 2010.
- INEGI (2005). Estadísticas de Producción de papaya maradol en Oaxaca [en línea]. Disponible en <http://www.inegi.org.mx>. Consultado 7 Noviembre 2010
- Jiménez, D.R., Virgen, C. G., Franco, T.S. y Olalde, P. S. (2001). Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: agro-biotecnología. *Avance y perspectiva* 20: 395-400.
- Quiñones, A. E., Ferrera, C.R., Gavi, R.F., Fernández, L.L., Rodríguez, V.R. y Alarcón, A. (2003). Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia* 37(6): 585-594.
- Kennedy, A. C. (1999). Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 74(1): 65-76.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J. y Tamura, K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 9(4): 299-306.
- Kwon, S. W., Kim, B. Y., Song, J., Weon, H. Y., Schumann, P., Tindall, B. J., Stackebrandt, E. y Fritze, D. (2007). *Sporosarcina koreensis* sp. nov. and *Sporosarcina soli* sp. nov., isolated from soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(Pt 8): 1694-1698.
- Lee, E. Y., Jun, Y. S., Cho, K. S. y Ryu, H. W. (2002). Degradation characteristics of toluene, benzene, ethylbenzene, and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. *J Air Waste Manag Assoc* 52(4): 400-406.
- Lee, J. S., Lee, K. C., Pyun, Y. R. y Bae, K. S. (2003). *Arthrobacter koreensis* sp. nov., a novel alkalitolerant bacterium from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 53(Pt 5): 1277-1280.

- López, C. A., Maya, Y., Troyo, E. y Landa, H. (2001). *Bacterias Criptobióticas: una alternativa de agricultura orgánica, Programa de agricultura en zonas áridas*. México: Editorial CIBNOR, Fundación produce Baja California Sur, A.C., Consejo nacional de Ciencia y Tecnología.
- MacFaddin, J. F. (2004). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3° edición. Argentina: Editorial Lippincott Williams & Wilkins.
- Madigan, M. T. y Brock, T. D. (2009). *Brock biology of microorganisms*. 10° edición. San Francisco: Editorial Pearson/Benjamin Cummings.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Parker, C. T., Jr., Garrity, G. M., Larsen, N., Li, B., Lilburn, T. G., McCaughey, M. J., Olsen, G. J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T. M., Tiedje, J. M. y Woese, C. R. (1999). A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* 27(1): 171-173.
- Maldonado, B. L. (2004). Efecto de diversos tratamientos pregerminativos en la semilla de la papaya (*Carica papaya*). Tesis Licenciatura. Honduras: Universidad Zamorano. Unidad de Cultivos Frutales.
- Mandujano, B. R. (2007). Cómo cultivar papaya orgánica en México [en línea]. Disponible en [http://vinculando.org/mercado/full/cultivo\\_organico\\_papaya\\_en\\_mexico.html](http://vinculando.org/mercado/full/cultivo_organico_papaya_en_mexico.html). Consultado 02 Noviembre 2009.
- Mirafuentes, H. F. (2000). *Manual para producir papaya en Tabasco*. México: Editorial INIFAP-Fundación produce.
- Montgomery, D. (2002). *Diseño y análisis de experimentos*. 2° edición. México: Wiley Limusa editorial.
- Nishimura, Y., Ino, T. & Iizuka, H. (1988). *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from Cotton and Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38(2): 209-211.
- Pérez, C., De la Fuente, L., Arias, A. y Altier, N. (2010). Uso de *Pseudomonas Fluorescens* nativas para el control de enfermedades de implantación en *Lotus corniculatus*. *Agrociencia*. 6(1): 41-47.
- Pipke, R. y Amrhein, N. (1988). Degradation of the Phosphonate Herbicide Glyphosate by *Arthrobacter atrocyaneus* ATCC 13752. *Appl Environ Microbiol* 54(5): 1293-1296.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Delisle, G., Tomalty, L. y Klein, D. A. (2002). *Microbiology*. 5° edición. Boston: Editorial McGraw-Hill.

- Rai, M. K. (2006). *Handbook of microbial biofertilizers*. USA: Editorial Food Products Press.
- Reyes, C. (1997). *Diseño de experimentos aplicados: Agronomía, biología, química, industria aplicada*. México: Trillas.
- Rodicio, M. R. y Mendoza, M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22(4): 238-245
- Rosas, R. L. (2010). Identificación de microorganismos de sedimentos de ventilas. Tesis Maestría. México: Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología-IPN. Departamento de Bioprocesos.
- SAGARPA (2000). Requisitos y especificaciones para la realización de estudios de efectividad biológica de los insumos de nutrición vegetal. In *NOM-077-FITO-2000* México: Diario Oficial de la Federación.
- SAGARPA (2006). Ley de Productos orgánicos. In *DOF 07-02-2006*. México: Diario Oficial de la Federación.
- Said, I. S. y Zarate, L. (1990). *Métodos estadísticos y enfoque interdisciplinario*. 2ª edición México: Editorial Trillas.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4): 406-425.
- Salguero, Z. O. (2006). Rendimiento del papayo maradol en respuesta a la fertilización foliar y aplicación de hormonas. Tesis Licenciatura. México: Centro de Estudios Profesionales. Colegio Superior Agropecuario.
- Secretaría de Salud. (1994). Bienes y Servicios. Método para la cuenta de Bacterias Aerobias en placa. Vol. NOM-092-SSA1-1994 México.
- Salvador, F. M., Adriano, A. M. y Becerra, O. C. (2005). Efecto del remojo en agua sobre la germinación de semillas de papaya variedad Maradol. *Revista Chapingo, Serie horticultura* 11(1): 27-30.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ª edición. Cold Spring Harbor, N.Y.: Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, M. J. (2004). *Microbiología de suelos: Técnicas, métodos y medios de cultivo*. México: Editorial Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Autónoma de México.
- SIAP Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera México: SAGARPA [en línea]. Disponible en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>. Consultado 07

Diciembre 2009

- Stainer, Y., Ingraham, J., Wheelis, M. y Painter, P. (1992). *Microbiología*. 2° edición. España: Editorial Reverté S.A.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24(8): 1596-1599.
- Tamura, K., Nei, M. y Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(30): 11030-11035.
- Terry, A.E., Leyva, A. y Hernández, A. (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate. *Revista colombiana de Biotecnología* 7(2): 47-54.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22): 4673-4680.
- USDA (2000). United States Department of Agriculture [en línea]. Disponible en <http://www.usda.gov/wps/portal/usdahome>. Consultado 31 Octubre 2009
- Varma, A., Buscot, F. y SpringerLink (Online service) (2005). Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions. In *Soil biology*, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Vivas, J. M., Martínez, B. M. y Salgado, B. R. (2008). Identificación y caracterización de una bacteria degradadora de parafinas. *Investigación universitaria Multidisciplinaria* 7(1): 51-61.
- Yoon, J. H., Kang, S. J., Oh, H. W. y Oh, T. K. (2006). *Stenotrophomonas dokdonensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 56(Pt 6): 1363-1367.
- Yoon, J. H., Kim, I. G., Lee, M. H. y Oh, T. K. (2005). *Nocardioides kribbensis* sp. nov., isolated from an alkaline soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(Pt 4): 1611-1614.
- Zhang, D. C., Schumann, P., Liu, H. C., Xin, Y. H., Zhou, Y. G., Schinner, F. y Margesin, R. (2009). *Arthrobacter alpinus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from alpine soil. *Int J Syst Evol Microbiol*.

## ANEXOS

### ANEXO I.

#### COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

##### MEDIO AGAR NUTRITIVO

Formula en g/L de agua destilada

Peptona de gelatina..... 5 g

Extracto de carne de res.... 3 g

Agar ..... 1 g

pH final= 6.8 +/- 0.2

##### MEDIO AGAR EXTRACTO DE SUELO

Agar.....15 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 0.4 g

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 0.5 g

Mg SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O..... 0.05 g

MgCl<sub>2</sub>.....0.1 g

FeCl<sub>3</sub>..... 0.01 g

CaCl<sub>2</sub>.....0.1 g

Peptona.....1.0 g

Extracto de levadura.....1.0 g

Extracto de suelo..... 250 mL

Agua destilada..... 750 mL

Se ajusta a pH 7.4

Para ajustar el pH se utiliza NaOH, KOH, HCl 1 N, según se requiera

## ANEXO II.

### Medio de cultivo para pruebas bioquímicas

#### AGAR CITRATO DE SIMMONS

Formula en g/L de agua destilada:	
Fosfato dihidrogenado de amonio	1 g
Fosfato dipotásico	1 g
Cloruro de sodio	5 g
Citrato de sodio	2 g
Sulfato de magnesio	0.20 g
Agar	15 g
Azul de bromotimol	0.8 g

pH final=  $6.9 \pm 1$

Método de preparación:

Suspender 24.2g de polvo en un litro de agua destilada y deja remojar durante 5 a 0 minutos. Mezclar bien y calentar suavemente agitando frecuentemente hasta que el medio hierva un minuto. Distribuir 5 mL en tubos de 13x100mm y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se deja enfriar en posición inclinada

#### AGAR MIO

Fórmula en g/L de agua destilada:	
Peptona de gelatina	10 g
Extracto de levadura	3 g
Peptona de caseína	10 g
L-ornitina	5 g
Glucosa	1 g
Agar	1 g
Purpura de bromocresol	0.02 g

pH final=  $6.5 \pm 0.2$

Método de preparación:

Suspender 31 g de polvo en un litro de agua destilada. Calentar hasta ebullición durante un minuto hasta disolver completamente y distribuir 5 mL en tubos de 13x100 mm. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos

#### AGAR HIERRO LISINA

Fórmula en g/L de agua destilada:	
Peptona de gelatina	5 g
Extracto de levadura	3 g
Glucosa	1 g
L-lisina	10 g
Citrato férrico de amonio	0.5 g
Tiosulfato de sodio	0.4 g
Purpura de bromocresol	0.02 g
Agar	13.5 g

pH final=  $6.7 \pm 0.2$

Método de preparación:

Suspender 33 g de polvo en un litro de agua destilada. Calentar agitando con frecuencia hasta el punto de ebullición para disolver el medio por completo. Distribuir 5 mL en tubos de 13x100 mm y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Dejar en posición inclinada

#### **AGAR ALMIDÓN**

Fórmula en g/L de agua destilada:	
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Almidón de maíz soluble	10 g
Agar	15 g

pH final= 5.6 ± 0.1

Método de preparación:

Suspender 39 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta disolución completa, distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos

#### **CALDO ROJO DE METILO Y VOGUES PROSKAUER (RM-VP)**

Fórmula en g/L de agua destilada:	
Peptona especial No.1	7 g
Glucosa	5 g
Fosfato dipotásico	5 g

pH final=6.9 ± 0.2

Método de preparación:

Suspender 17 g del polvo en un litro de agua destilada. Disolver calentando y hervir aproximadamente un minuto si es necesario. Distribuir 6 mL en tubos de 13x100 mm y esterilizar en autoclave durante 12-15 minutos a 121°C. Al término de la incubación el volumen de este tubo se dividirá en dos uno para la prueba del Rojo de metilo y la otra mitad para la prueba de VP

#### **CALDO DE MALONATO DE EWING MODIFICADO**

Fórmula en g/L de agua destilada:	
Extracto de levadura	1 g
Sulfato de amonio	2 g
Fosfato dipotásico	0.6 g
Cloruro de sodio	0.4 g
Malonato de sodio	2 g
Dextrosa	0.25 g
Azul de bromotimol	0.025 g

pH final= 6.7 ± 0.2

Método de preparación:

Disolver 9.3 g de polvo en un litro de agua destilada. Distribuir en tubos de ensaye adecuado y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos

### CALDO ROJO DE FENOL CON LACTOSA

Fórmula en g/L de agua destilada:	
Peptona de caseína	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Rojo de fenol	0.018 g
Lactosa	5 g

pH final= 7.4 ± 0.2

Método de preparación:

Disolver 20 g de polvo en un litro de agua destilada. Mezclar y calentar frecuentemente hasta su ebullición y completa disolución. Distribuir y esterilizar en autoclave de 116 a 118°C durante 15 minutos

### CALDO NITRATO

Fórmula en g/L de agua destilada:	
Peptona de gelatina	5 g
Extracto de carne de res	3 g
Nitrato de Potasio	1 g

pH final= 7 ± 0.2

Método de preparación:

Pasar exactamente las cantidades, rehidratar con agua destilada y calentar suavemente hasta disolución total. Distribuir 5 mL en tubos de 13x100 y esterilizar a 121°C durante 15 minutos

### CIANURO DE POTASIO

Preparar un tubo con tapón de rosca, estéril	
KCN	0.5 g
Agua destilada	100 mL

\*No absorber la solución de KCN con la pipeta por la boca, usar una pipeta de jeringa o bulbo.

A los 5 mL del medio básico frío agregar 1 mL de KCN al 0.5% utilizando una pipeta de bulbo y mezclar bien.

### MEDIO PARA PRUEBA DE MOVILIDAD (SIM)

Fórmula en g/L de agua destilada:	
Peptona de caseína	20 g
Extracto de carne	6.1 g
Sulfato de hierro y amonio	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g
Agar	3.5g

pH final=7.3 ± 0.2

Método de preparación:

Suspender 30 g del material seco en un litro de agua destilada. Mezclar bien y cuando se tenga la suspensión uniforme, calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos

#### MEDIO BASAL OF O MEDIO DE HUGH Y LEIFSON

Fórmula en g/L de agua destilada:	
Caseína digerida por enzimas pancreáticas	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato dipotásico	0.3 g
Agar	2.5 g
Azul de bromotimol	0.03 g

pH final= 6.8 ± 0.1

Método de preparación:

Suspender 9.8g de polvo en un litro de agua destilada. Mezclar bien, calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Agregar 10 mL de solución de dextrosa estéril por filtración a través de membrana al 10% a 100 mL de base estéril. Agregar 10 mL de solución lactosa estéril al 10% a una tercera porción de 100mL

Otra forma de preparar el medio es agregar los carbohidratos antes de la esterilización en autoclave y esterilizar a 118°C durante 10 minutos

#### GELATINA NUTRITIVA

Fórmula en g/L de agua destilada:	
Peptona de gelatina	5 g
Extracto de carne de res	3 g
Gelatina	120 g

pH final= 6.8 ± 0.2

Método de preparación:

Suspender 128g de polvo en un litro de agua destilada. Calentar ligeramente para disolver y distribuir en tubos. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos

#### PRUEBA ROJO DE METILO

Fórmula	
Rojo de metilo	0.1 g
Alcohol etílico	300 mL
Agua destilada	200 mL

Disolver el rojo de metilo en el alcohol y diluir con el agua destilada, para llevar a cabo la prueba, añadir 5 gotas de la solución a 5 mL del cultivo problema.

Resultados: Un color rojo demuestra un pH menor a 4.5 y la prueba es positiva. Un color amarillo se reporta como prueba negativa

### PRUEBA DE VOGUES PROSKAUER

Fórmula	
Alto naftol	5 g
Alcohol etílico absoluto	100 mL

Añadir 0,6 mL de la solución de alfa naftol y 0.2 mL de una solución acuosa al 40% de KOH a 1 mL de cultivo

Resultados: El desarrollo de una coloración roja en 15 minutos constituye una reacción positiva

### PRUEBA DE OXIDASA

Fórmula	
N, N, N, N- Tetrametil-p-Fenilendiamino	0.5 g
Agua destilada	100 mL

Conservar en frasco oscuro a 5-10°C. El reactivo se conserva durante 14 días.

Sembrar en un tubo de base gelosa para sangre. Incubar 18 horas a 35°C agregar 03mL de reactivo.

Resultado: La reacción positiva se observa por la producción de un color azul en un minuto

### REACCIÓN DE INDOL

Fórmula	
P-dimetilaminobenzaldehido	5 g
Alcohol amílico alcohol isoamílico	750 mL
Acido clorhídrico concentrado	25 mL

Disolver el p-dimetilaminobenzaldehido en el alcohol amílico y agregar el acido clorhídrico lentamente, gota a gota agitando. Debe conservarse en frasco ámbar con tapón esmerilado; el color del reactivo cae del amarillo al café claro. Se debe conservar a 4°C

Disolver los ingredientes en agua destilada. Mezclar bien y calentar a ebullición, agitando ocasionalmente hasta completa disolución. Enfriar a 60°C y ajuste el pH de 7.3 +/- 0.1

**ANEXO III.**  
**Secuencias de la región 16S rDNA de las bacterias aisladas de la rizosfera de *C. papaya***

**Secuencias completas**

**>MMRL2 (HM804296)**

ACACGTGGGTAACCTGCCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACCGCA  
TGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC  
GGCTCaCCAAGGCAACGATGCGTAGCCGaCCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGC  
TTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACC  
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTTGGGCGT  
AAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGA  
GACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGG  
CGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTA  
GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACT  
CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCG  
GGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGG  
ATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGAC  
CGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAAT  
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT

**>MMRL3 (HM804297)**

CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC  
TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA  
GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGTGAAGT  
CTCGTACCTTGACGGTACCTCATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA  
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGATGTGAAATCCCACGGCTCAACC  
GTGGAAGGTCAATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTACAGAAGAGGAAAGCGGAATTCCAAAGTGTAGCGGTGAAATGCGT  
AGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAG  
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTCGCCCCCTTAGT  
GCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCCGCTGACCG  
GCCTAGAGATAGGCTTTCCCTTCGGGGACAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGTCTGTCGTCGATGAT  
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGC  
CGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
ATGGACGGTACAGAGGGTTCGCAACCCCGGAGGGTGAGCAAATCCCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCT  
GCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG  
TACACACCGCC

**>MMRL6 (HM804298)**

CTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTG  
AGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCaGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCC  
GCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTAAAGCGAGGAGGAGGCTACTTGGATTAATACTCTaGGATA  
gTTGGACGTTaCTCGCAGAATAaGcAcCGcTaACTCTgTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAgAGGGTGCAGCGGTTA  
ATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGTAGGCGGCTtTTAAGTcGgATGTGAAATCCCTGAGCTTAACTTAGGAA  
TTGCATTcGATACTGGGAAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCAGGtGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT  
CTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACa  
GGTATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCA  
GCTAACCGGATAAGTAGACCCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACA  
AGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATAGTAAGAACTTTCCAGA  
GATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTTACATACAGGTGTCATGGCTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT  
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCTTATTTGCCAGCGGGTTAAGCCGGGAACCTTTAAGGATACTGCCAGTGA  
CAAACCTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAAGTCAATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTC  
GGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACT

CGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA  
CCGCA

>MMRL7 (HM804299)

GTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTG  
CGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTC  
TGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGAC  
AATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAAGCCCTTTTGTGGGAAA  
GAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCAGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCC  
GCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTTCGTTAAGTCCGTT  
GTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAATGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTC  
TGGTGTAGCAGTGAATGGCTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACATTGACACT  
GAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTT  
GGGTGCAATTTGGCAGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTTCGCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAAC  
TCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTTCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCTG  
GCCTTGACATGTCGAGAACTTTCCAGAGATGGATCGGTGCCTTCGGGAAGTCAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCG  
TCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGG  
TGGGAAGTCTAAGGAGACCGCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC  
CAGGGCTACACACGTAATAATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTAAGCCAATCCAGAAAACCTA  
TCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCG  
GTGAATACGTTCCCGGGCCTT

>MMRL9 (HM804300)

GTCGAGTCGTCGACTAATGGGAGCTTGCGGTCCCGTTAGCTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACTCT  
GTAAGTGACCTGTAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATGACATAAAGGAACTCCTGTTCCCT  
TTATTGAAAGGATGGCCTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC  
ACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCCCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAACAACGCCCGTGAGCGATGAAGGCCTT  
CGGGTCGTAAGACTCTGTTGTTAGGGAAGAATAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGA  
AAAGCCACGGCTAACTAGCTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAATGGGCGTAA  
AGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAA  
AACTTGAGTGCAGAAGAAGGAAAGTTCGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGCAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAAACCCA  
GTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCT  
GGTAGTCCACGCTGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAG  
CACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGTGGTGGAGCATG  
TGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCC  
TTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA  
GCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT  
GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTTGCA  
AGACCGGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCG  
GAATCACTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT

>MMRL13 (HM804301)

CGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGCGGACGGCTGAGTAA  
CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCCTGAAACCGCA  
TGTTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAA  
GGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTATGAAGGT  
TTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTAAGTCTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACC  
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTAATGGGCGTA  
AAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAA  
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGC  
GAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAG  
TCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC  
CGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGG  
GGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGATGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA  
ACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA  
TGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCGAGACC

GCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATC  
GCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG

## Secuencias incompletas

### >MMRL1 (HM804302)

TAGAGGATTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAA  
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA  
GGTCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTG  
TCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAG  
TTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA  
CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAAACCA  
TTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG  
GTGAATACGTTCCCGGGCC

### >MMRL4 (HM804303)

GGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTC  
AAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT  
CTTGACATCCCGCTGCCCGGTGTAGAGATACGCCTTTCCCTTCGGGGACAGCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCG  
TCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTG  
GGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT  
GGGCTACACACGTGCTACAATGGATGATACAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCATAAAAATCATTC  
CCAGTTCGGATTGGAGGCTGCAACTCGCCTCCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTG  
AATACGTTCCCGGGCCTT

### >MMRL5 (HM804304)

CAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCA  
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCA  
GAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGTGAGATGTTGGG  
TTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGT  
GACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG  
TCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAA  
CTTC

### >MMRL8 (HM804305)

TTCCACGTGTTCCGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAG  
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTG  
ACATACACCGGAAAGCTGCAGAGATGTAGCCCCCTTTTAGTCCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCGTGAGTCTG  
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCTTATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCA  
TAAGAGACTGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCA  
CGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCG  
GATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTCGTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGT  
TCCCGGGCCTTGACACACCG

### >MMRL10(HM804306)

GGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGGATACGACCGCAAGGTTGAAACTC  
AAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAAAT  
CTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCG  
TCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATCATTAAGTTG  
GGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTT  
GGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATAACAAAGGGCAGCTAAACCCGCGAGGTGATGCAAATCCCATAAAGTTGTTT  
TCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTG  
AATACGTTCCCGGGCCTT

### >MMRL11 (HM804307)

TTCCACGTCTTCCGCGCCGAGCTAACGCATTAAGTCCCCGCTGGGGAGTACGTCCGCAAGGCTAAAACTCAAAG  
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCAAGAACCTTACCAAGGCTTG  
ACATGTGCCGACCGTCCCAGAGATGGGGCTTCCCTTCGGGGCCGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTGAGTCT  
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCATGTTGCCAGCACTTTAAGGTGGGGAC

TCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGTCTTGGGCT  
TCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAGCCGGTCTCANT  
TCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATA  
CGTTCCCGGGCCTTG

**>MMRL12 (HM804308)**

TTCCATGGGTTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAG  
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTG  
ACATACACCGGAAGCCCCCAGAGATGGGGGTCTCTTTGATACTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG  
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTTCCATGTTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGACT  
CATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTT  
CACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATCCCGTGAGGGGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTT  
CGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATAC  
GTTCCCGGGCCTT

## ANEXO IV.

### Composición de Nitrofoska y PHC Biopak-F

#### Nitrofoska® Azul

**Dosificaciones y modalidades de aplicación:** Para semilleros colocar 3 gránulos a una distancia de 5 cm cada uno. Fertilizar cada quince días.

Abono complejo NPK (Mg-S) 12-12-17 (2-20) con micronutrientes

#### Contenido:

12 % Nitrógeno (N) total  
5,0 % Nitrógeno (N) nítrico  
7,0 % Nitrógeno (N) amoniacal  
12 % Pentóxido de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) soluble en citrato amónico neutro y en agua  
7,8 % Pentóxido de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) soluble en agua  
17 % Óxido de potasio (K<sub>2</sub>O) soluble en agua  
2 % Óxido de magnesio (MgO) total  
1,6 % Óxido de magnesio (MgO) soluble en agua  
20 % Trióxido de azufre (SO<sub>3</sub>) total  
16 % Trióxido de azufre (SO<sub>3</sub>) soluble en agua  
0,02 % Boro (B) total  
0,01 % Zinc (Zn) total

#### PHC BioPak-F

**Dosificaciones y modalidades de aplicación:** Asperjar una solución de 2 a 4 g de PHC BioPak-F / Lt de agua limpia al momento de la siembra antes de cubrir la semilla. Fertilizar cada quince días por aspersion (2 a 4 g/Lt).

#### Contenido:

300 millones de unidades formadoras de colonias (ufc/g) de *bacillus spp.*  
10 millones de UFC de *Streptomyces spp.* por gramo de producto.  
1 millón de UFC de *Trichoderma spp.* por gramo de producto  
Maltodextrina 48 %.  
Extracto de Levaduras 5 %.  
Algas Marinas (*Ascophyllum nodosum*) 13 %.  
Acidos Húmicos 17 %.  
Ingredientes Inertes 17 %.

## ANEXO V.

### Análisis de varianza de las variables respuesta

#### Análisis de varianza. Porcentaje de brotes

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	Pr>F	Valor crítico para F
Tratamientos	16	4.431	0.277	1.909	0.0204	1.458
Error	238	34.53	0.1451			
Total	254	38.96				

#### Análisis de varianza. Tiempo de germinación

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	Pr>F	Valor crítico para F
Tratamientos	16	11163	697	3.428	0.0006	1.871
Error	44	8454	203.5			
Total	60	20117				

#### Análisis de varianza. Número de hojas

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	Pr>F	Valor crítico para F
Tratamientos	16	174.6	10.91	7.199	0.0006	1.871
Error	44	66.7	1.516			
Total	60	241.3				

#### Análisis de varianza. Altura de la planta

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	Pr>F	Valor crítico para F
Tratamientos	16	422	26.38	3.603	0.0004	1.871
Error	44	332.1	7.321			
Total	60	744.1				