



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Efecto antagónico de aislados bacterianos sobre el modelo *Stenomacra marginella* para su posterior aplicación en el control de plagas de la vainilla

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

**P R E S E N T A:
ROSAS TIRO CRISTIAN GUADALUPE**

**ASESOR DE TESIS:
DR. Alejandro Tovar Soto
CO-ASESOR:
Blól. Rolando Torres Coronel**



El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Nematología Agrícola del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Bajo la dirección del Dr. Alejandro Tovar Soto y la co-dirección del Biól. Rolando Torres Coronel. Forma parte del convenio de colaboración BEI-VAI-13-6 Red Vainilla-SAGARPA-COFUPRO-IPN y del proyecto de investigación SIP20140999.

ÍNDICE

Índice general.....	ii
Índice de tablas	iv
Índice de figuras.....	v
Resumen	vi
1.0 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Vainilla.....	1
1.1.1 Botánica de la vainilla	1
1.2 Cultivo	2
1.2.1 Requerimientos agroecológicos.....	2
1.2.2 Métodos de propagación de vainilla	3
1.2.3 Tutores	3
1.2.4 Floración	5
1.2.5 Polinización	5
1.2.5.1 Tiempo de vida de la flor	6
1.2.6 Maduración y cosecha	6
1.2.7 Vida útil de los vainillales	6
1.3 Producción	6
1.3.1 Producción de vainilla nivel mundial	6
1.3.2 Producción de vainilla nivel nacional	7
1.3.3 Importancia de su producción y usos	8
1.4 Enfermedades de la vainilla	8
1.4.1 Pudrición de raíz y tallo	8
1.4.2 Antracnosis	9
1.4.3 Control de enfermedades	9
1.5 Plagas de la vainilla	9
1.5.1 Gusano peludo	10
1.5.1.1 Control del gusano peludo	10
1.5.2 Chinche roja	11
1.5.2.1 Control de la chinche roja	12
1.5.3 Caracoles y babosas	12
1.6 Manejo integral	12
1.6.1 Control químico	13

1.6.1.1 Plaguicidas	13
1.6.2 Insecticidas naturales a partir de extractos vegetales	13
1.6.3 Control biológico	15
1.6.2.1 Antagonistas	15
1.7 Modelo biológico utilizado	15
1.7.1 <i>Stenomacra marginella</i>	15
1.7.1.1 Ciclo de vida de <i>Stenomacra marginella</i>	16
2.0 JUSTIFICACIÓN	18
3.0 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo general	19
3.2 Objetivos particulares.....	19
4.0 MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
4.1 Esquema general de trabajo	20
4.2 Purificación de los aislados bacterianos	21
4.3 Caracterización macroscópica y microscópica	21
4.3.1 Macroscópica	21
4.3.2 Microscópica	21
4.4 Bioensayo para medir mortalidad con el modelo <i>Stenomacra marginella</i>	22
4.4.1 Recolección de material biológico.....	22
4.4.2 Preparación de suspensiones bacterianas con cada aislado	23
4.4.3 Evaluación de la mortalidad de aislados bacterianos sobre <i>Stenomacra marginella</i>	23
5.0 RESULTADOS	25
5.1 Caracterización macroscópica y microscópica de aislados bacterianos	25
5.2 Evaluación de la mortalidad de aislados bacterianos sobre el modelo biológico <i>Stenomacra marginella</i>	26
6.0 DISCUSIÓN	27
7.0 CONCLUSIONES	31
8.0 BIBLIOGRAFÍA	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización microscópica y macroscópica de 17 aislados bacterianos de suelos de vainilla de los estados de Veracruz y Puebla.....	25
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura1. Flor de <i>Vanilla planifolia</i>	1
Figura 2. Principales árboles utilizados como tutores de <i>Vanilla planifolia</i>	4
Figura 3. Principales países productores de vainilla en el año 2012	7
Figura 4. Estados productores de vainilla en México para el año de 2012.....	7
Figura 5. Pudrición de raíz y tallo ocasionados por el hongo <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	8
Figura 6. Daño por antracnosis en tallo y hoja de vainilla	9
Figura 7. Gusano peludo <i>Plusia aurifera</i> , alimentándose sobre una hoja de vainilla	10
Figura 8. Chinche roja (<i>Tentecoris confusus</i>) en estado de adulto y en estado de ninfa	11
Figura 9. Ciclo de vida de <i>Stenomacra marginella</i>	17
Figura 10. Esquema general de trabajo seguido en el estudio	20
Figura 11. Sitio de recolección de <i>Stenomacra marginella</i> Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Zacatenco, México, D.F.....	22
Figura12. Efecto antagónico de aislados bacterianos procedentes de suelos de vainilla sobre el modelo <i>Stenomacra marginella</i>	26

RESUMEN

La vainilla tiene una alta cotización en el mercado internacional y en los últimos años este cultivo se ha visto afectado por diversas plagas. La eficacia de los insecticidas químicos hace posible controlar dichas plagas, pero su uso indiscriminado ha propiciado la aparición de resistencia, alto grado de contaminación y desequilibrio ecológico. Por esta razón, la OMS insiste en la búsqueda de nuevos métodos de control, fundamentalmente los biológicos. El control biológico es parte fundamental de los programas integrados para reducir las poblaciones de las plagas. Se basa en el uso directo o indirecto de enemigos naturales, depredadores o patógenos que controlan organismos plaga. Los objetivos fueron: caracterizar macroscópicamente y microscópicamente aislados bacterianos obtenidos a partir de suelos de vainilla, y evaluar su efecto antagónico en el modelo *S. marginella* para su posterior aplicación en el control de plagas de la vainilla. Se evaluó un total de 17 aislados bacterianos de los estados de Veracruz y Puebla; a partir de cada aislado se realizó una caracterización macroscópica y microscópica en donde se realizó una tinción de Gram. Posteriormente con cada aislado bacteriano se montaron bioensayos para evaluar la mortalidad sobre el modelo *S. marginella* utilizando dos niveles de inóculo (1×10^6 y 1×10^8) unidades formadoras de colonias/ml con lo que se determinó su actividad antagónica. Los resultados muestran que: los aislados bacterianos presentaron una morfología microscópica de bacilo, siendo nueve aislados Gram positivo y ocho Gram negativo, la mayoría de estos aislados tiene una morfología colonial similar a diferencia del color y el tamaño. El bioensayo sobre la mortalidad de *S. marginella* mostró que de los 17 aislados bacterianos evaluados solo cuatro presentaron mortalidad. En donde el aislado MP22 presentó una mejor actividad antagónica a partir de las 48 horas, teniendo un porcentaje de mortalidad del 20 y 30% para cada uno de los niveles de inóculo probados respectivamente; por su parte el aislado MP2 presentó el 10% de mortalidad a las 72h en ambas diluciones, el aislado MP10 presentó 30 % de mortalidad para ambas diluciones a las 72 h; así mismo, el aislado MP11 presentó mortalidad de 10 y 20 % con las diluciones 1×10^6 , 1×10^8 respectivamente. Se concluye que ninguno de los aislados evaluados reunió el criterio de presentar mortalidad superior al 50% en el modelo biológico para ser seleccionado.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Vainilla

La (*Vanilla planifolia* Jackson), aportación del mundo prehispánico al Viejo mundo, es nativa de las regiones húmedas tropicales de México y América central. Es una especie herbácea de la familia *Orchidaceae*, siendo la única orquídea que se cultiva sin propósitos ornamentales (CAD, 2003).

1.1.1 Botánica de la vainilla

De las especie de orquídeas es la única que produce frutos que se utilizan para obtener un extracto, además es una planta enredadera con raíces adventicias que nacen en brotes, es de tallo flexible, cilíndrico, de color verde, tienen hojas carnosas y flores que van del color blanco al amarillo y un solo estambre (Figura 1). El fruto tiene forma de vaina, es de color verde y alcanza un tamaño que va de 15 a 20 cm de largo. Al madurar toma un color amarillo y se abre a lo largo de toda la vaina, en su interior contiene alrededor de 90,000 semillas de color negro, las cuales son muy pequeñas y están contenidas en una cápsula que contiene sustancias que impiden la germinación, cabe destacar que la reproducción para el cultivo comercial se hace de forma vegetativa mediante esquejes (CAD, 2003).



Figura 1. Flor de *Vanilla planifolia* Jackson (Fuente: Flores, 2007).

1.2 Cultivo

Se propaga asexualmente por esquejes, que se seleccionan de plantas sanas con características sobresalientes de rendimiento y calidad de los frutos, por lo que no se necesitan las semillas ni semilleros. Los esquejes que se obtienen del tallo de la planta de la vainilla tienen una gran capacidad para enraizar al plantarlos (Naturland, 2000; Sánchez y Hernández, 2011).

Se cultiva perfectamente en armonía con los recursos forestales, ya que requiere de árboles llamados “tutores” que le dan sostén, materia orgánica y sombra; por lo tanto, el cultivo de vainilla propicia la reforestación y la conservación de la vegetación nativa. Además genera una gran cantidad de mano de obra familiar que se utiliza principalmente para la polinización manual de las flores (SAGARPA, 2013).

1.2.1 Requerimientos Agroecológicos

La planta de vainilla para su óptimo desarrollo y producción requiere de las condiciones agroecológicas siguientes (INIFAP, 2011):

Clima. La *vanilla planifolia*, es una especie que prospera en clima tropical cálido húmedo.

Temperatura. Las características de las regiones donde la vainilla prospera de forma adecuada son: temperaturas de 20° a 30°C e incluso hasta los 32°C.

Precipitación. Requiere una precipitación media anual entre 2000 a 3000 mm. También la planta necesita de dos a tres meses relativamente secos para estimular la floración de la planta. En lugares, con una precipitación, mayor a 3000 mm anuales, las plantaciones tienen más ataque por hongos, principalmente por *Fusarium*. Por el contrario, en lugares con bajas precipitaciones y si no se tienen un sistema de riego, la escasez de agua constituye el peor enemigo de la vainilla (Vainilla, 2008).

Altitud. La altitud que favorece el cultivo de vainilla, se encuentra entre 0 m y 600 m, aunque se han encontrado plantas creciendo hasta los 1,100 metros sobre el nivel del mar.

Luz-sombra. La planta de vainilla para su crecimiento óptimo requiere 50% de luz o sombra en la mayor parte del año. Pero, en épocas secas con soles intensos, es preferible mantener una sombra de 50 a 70% que permita conservar la humedad del suelo y del aire.

Mientras que en los meses lluviosos, la cantidad de sombra, debe ser de 30 a 50% para evitar condiciones que favorezcan el desarrollo de enfermedades en el suelo.

Selección y preparación del terreno. Deben tener un excelente drenaje, ricos en humus y pH de 6 a 7; son preferibles aquellos terrenos que reciban la luz del sol por la mañana y no por la tarde, la preparación consiste en limpiar el terreno, mediante chapeos con machete o azadón.

Tutor. Por su carácter trepador, requiere de un árbol que le provea sostén y sombra, además de buena cantidad de luz y humedad (Domínguez, 2005).

1.2.2. Métodos de propagación de vainilla

El principal método de propagación es asexual por medio de esquejes. Los bejucos o esquejes son productos de los aclareos que se llevan a cabo en los huertos (Sánchez, 1993). Estos mismos esquejes pueden ser vendidos entre productores para mejorar cultivos ya establecidos, o para el inicio de nuevos vainillales. De tal suerte que un único gen puede estar presente en varios vainillales. Esto es, que sea un solo clon en todos los vainillales (Lubinsky *et al.*, 2008).

Normalmente se utilizan esquejes de seis a ocho nudos (de 80 a 120 cm de longitud y un cm de diámetro). Esquejes de mayor tamaño y vigorosos, aceleran el crecimiento de sus brotes y la floración, sin embargo, cuando se plantan, se dificulta su manejo y tienen un precio más alto (INIFAP, 2011).

1.2.3 Tutores

Los tutores son necesarios de sostén, sombra, sostén y humedad, entre las especies utilizadas encontramos a:

Naranja dulce (*Citrus sinensis*) es la especie mayormente utilizada como tutor en vainillales, es un árbol de tronco robusto con denso follaje, hoja perenne, flores perfumadas y fruto redondeado, puede alcanzar hasta los 10 metros es originario de Asia, en particular de China e India (Figura 2) (Ibáñez-Olea, 2007).

Pichoco o colorín (*Erythrina berteroana* Urban). Tienen todas las características deseables para un buen tutor, (adaptados a la región, no desprender su corteza, son resistentes, de fácil propagación y rápido crecimiento) excepto la de sombra, ya que pierde periódicamente todas sus hojas, siendo necesarios tener otro suministro de sombra combinado (Figura 2) (Damirón, 2004).

Cocuite (*Piscidia piscipula* (L.) Sarg.): es otra de las especies utilizadas como tutor; sin embargo, en los lugares en donde abunda la tuza (*Geomys* sp.) ésta le ocasiona grandes perjuicios, resultando su control bastante problemático y costoso (Figura 2) (Damirón, 2004).

Chaca (*Bursera simaruba* (L.) Osbeck): es un árbol de rápido enraizamiento, se desarrolla pronto y proporciona muy buena sombra. Pero tiene como desventaja que se descorteziza y en pocos años adquiere demasiado grosor, lo que es contrario a lo que se requiere para el crecimiento de la vainilla (Figura 2) (Damirón, 2004).



Naranja *Citrus sinensis* (L.) Osbeck



Chaca *Bursera simaruba* (L.) Sarg



Cocuite *Piscidia piscipula* (L.) Sarg



Pichoco o colorín *Erythrina berteroana*
Urban

Figura 2. Principales árboles utilizados como tutores de *Vanilla planifolia* (Fuente: Fitochapingo, 2010).

1.2.4 Floración

La primera floración abundante de la vainilla se da a los tres años después de haber plantado el esqueje. A partir de la primera floración, esta planta florea normalmente una sola vez durante el año (Vainilla, 2008).

Fechas de floración en diferentes lugares:

- En México se presenta en los meses de abril y mayo.
- La costa de Madagascar en noviembre y enero.
- Las islas Comores entre octubre y diciembre.
- Las islas Reunión en diciembre y enero
- Las Antillas Francesas, Charlotte Amelie, Sen Bartolomé, María Galante de febrero a marzo (Vainilla, 2008).

1.2.5 Polinización

Las flores de vainilla, en su interior, tienen una membrana llamada "rostelo" parecida a una lengüeta, que separa al órgano masculino (antera) del femenino (estigma), impidiendo de esta manera la autopolinización (INIFAP, 2011).

La polinización se hace por abejas silvestres del género *Melipona* y la formación de frutos es escasa. En la producción comercial se ha recurrido a la polinización artificial, descubierta en Madagascar y ahora usada en todas las otras regiones productoras. Esa operación consiste en levantar el rostelo con una aguja fina y larga que se maneja con la mano derecha y presionar con el pulgar izquierdo la parte superior de la columna para que las masas de polen alcancen el estigma (León, 2000).

Para facilitar el trabajo de polinizar la vainilla no se deja crecer a mucha altura y los tallos se doblan hacia abajo o se podan; estas operaciones aumentan también el número de flores. En una inflorescencia se abren dos o tres flores diariamente, las que se marchitan el mismo día. Como la floración ocurre en estaciones marcadas, comúnmente cada dos meses, el trabajo de polinización artificial es muy intenso durante ese período. Se polinizan sólo las flores de la parte inferior del racimo, pues las superiores dan frutos cortos y curvos (León, 2000).

1.2.5.1 Tiempo de vida de la flor

El tiempo de vida de la orquídea es relativamente corto pues las flores generalmente abren entre las 4:00 y 5:00 am, sólo se tiene hasta la 1:00 pm para la polinización. La flor que no se fecunda ese mismo día, al día siguiente se encuentra marchita e inservible para la polinización (Vainilla, 2008).

1.2.6 Maduración y cosecha

La maduración del fruto dura nueve meses. Los signos que indican que el fruto ha llegado a su completa maduración son:

- Cuando la vaina alcanza una longitud entre 15 a 25 cm
 - Color amarillo verdoso
 - Aroma tenue
 - Aspecto firme y grueso
- (Vainilla, 2008).

1.2.7 Vida útil de los vainillales

Los máximos rendimientos de vainilla se obtienen al cuarto o quinto año de establecido el cultivo (segunda o tercera cosecha). Después, en los siguientes años, se tienen altas y bajas producciones y a partir de los nueve años, los rendimientos empiezan a declinar, hasta que se acaba la productividad del vainilla, generalmente a los 12 años (INIFAP, 2011).

1.3 Producción

1.3.1 Producción de vainilla nivel mundial

La vainilla es considerada una de las plantas más famosas y preferidas sobre todo en el mercado Europeo, se elige por su alta calidad y ser mejor que la vainilla sintética. Los principales países productores de la vaina son: Madagascar (35.5%), Indonesia (34.5%), China (13.7%), Papúa Nueva Guinea (4.1%) y México (4.0%) (FAO, 2008 ; SHCP, 2014). Estos países representan un alto porcentaje en su producción (Figura 3).

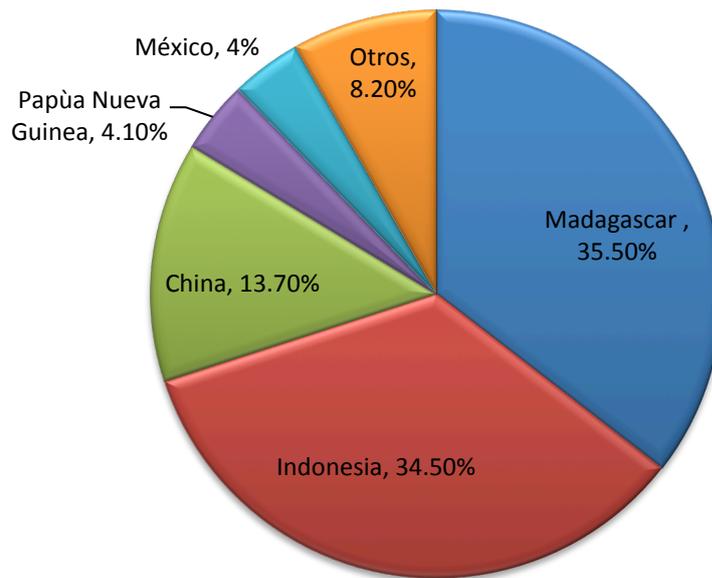


Figura 3. Principales países productores de vainilla en el año 2012. (Fuente: SHCP, 2014).

1.3.2 Producción de vainilla a nivel nacional

En México, la vainilla es producida principalmente, en la región totonaca formada por los estados de Veracruz y Puebla, zonas con las condiciones climatológicas idóneas para el cultivo de la vainilla (DOF, 2009).

Son cuatro las entidades del país que producen vainilla, siendo la más importante Veracruz, que en el años 2012 concentró el 57.4% del volumen y el 59.3% del valor obtenido. Le sigue en importancia: Oaxaca (17.9%, 28.9%), San Luis Potosí (16.2% y 7.1%) y finalmente Puebla (8.5%, 4.7%) (Figura 4) (SHCP, 2014).

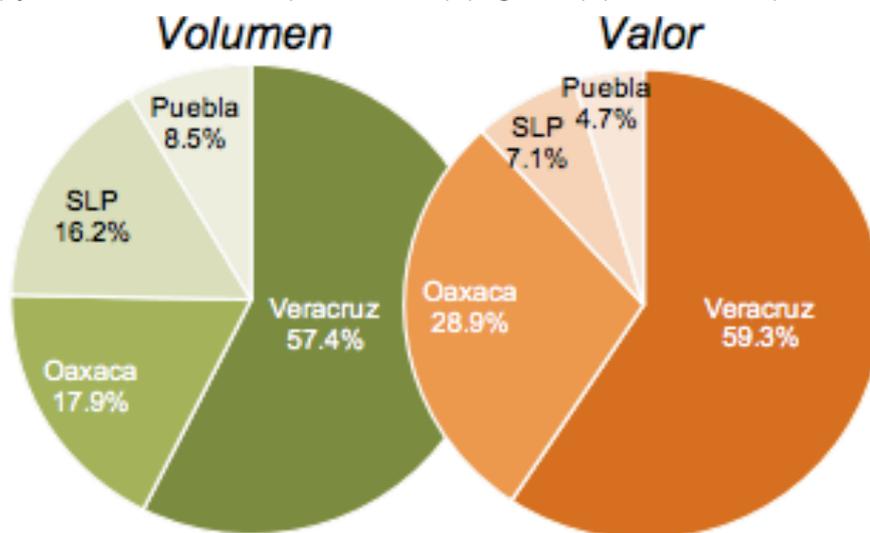


Figura 4. Estados productores de vainilla en México para el año 2012 (Fuente: SHCP, 2014).

1.3.3 Importancia de su producción y usos

La vainilla es muy utilizada en la industria de alimentos sobre todo en la producción de dulces de alta calidad, en repostería, pero también crece su importancia para la producción industrial de helados. Igualmente se utiliza vainilla orgánica en la producción de chocolates de alta y mediana calidad. Se comercializan las cápsulas procesadas (palitos de vainilla), el fruto molido (polvo de vainilla), ó el fruto mezclado con azúcar (azúcar de vainilla). Otros productos comerciales es el extracto de vainilla, que se utiliza como extracto alcohólico (35% de alcohol) mezclado con azúcar y fijado en diferentes grados de concentración (CAD, 2003). Debido a su gran uso en esta área se ha creado la vainilla sintética; sin embargo, los consumidores de algunos países industrializados principalmente de Europa, han incrementado el consumo de productores naturales desechando los sintéticos por considerar que los primeros son más saludables. Atendiendo a esta situación, se ha abierto un nuevo campo y camino para los productores de vainilla, ya que pese a que el costo en el mercado es mayor que el del producto artificial, esto no ha sido un impedimento para ciertos sector de consumidores (ASERCA, 2002).

1.4 Enfermedades de la vainilla

1.4.1 Pudrición de raíz y tallo

Fusarium oxysporum f. sp. *vainillae*. Es el hongo más dañino, que causa pudrición de raíces, tallos y frutos y en consecuencia la muertes de las plantas (Figura 5). Este hongo se encuentra causando daños en menor o mayor grado a todas las plantaciones de vainilla, principalmente en aquellas, que tienen un manejo de cultivos deficientes y en plantas en producción (INIFAP, 2011).

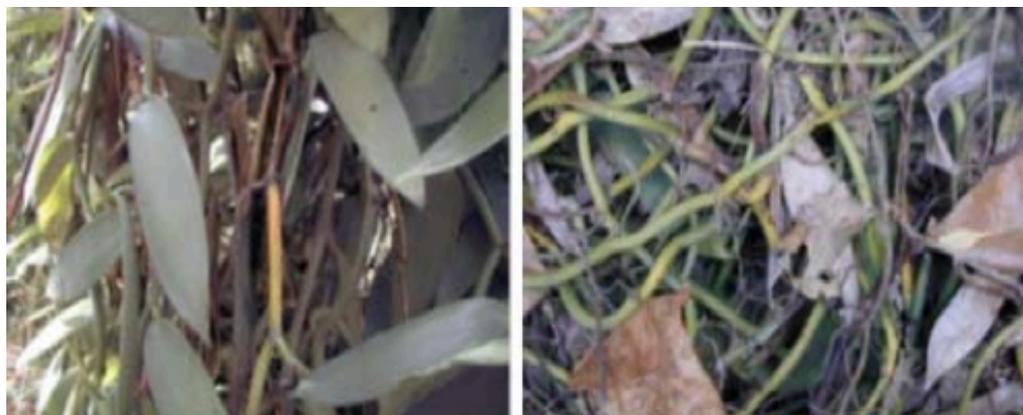


Figura 5. Pudrición de raíz y tallo ocasionados por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (Fuente: INIFAP, 2011).

1.4.2 Antracnosis

Colletotrichum gloeosporioides. Es un hongo que ataca a hojas, frutos, tallos y flores; se identifican por la aparición de pequeñas manchas hundidas, irregulares, de color café oscuro (Figura 6). Los frutos infectados se caen prematuramente antes de alcanzar su madurez comercial y en consecuencia el rendimiento disminuye significativamente hasta el 50% (Castro, 2008).



Figura 6. Daño por antracnosis en tallo y hoja de vainilla (Fuente: INIFAP, 2011).

1.4.3 Control de enfermedades

Para el control se utilizan fungicidas comerciales, la aplicación se hace de una a dos veces por mes durante la época de lluvia.

- El carbendazim en dosis de 2 g/L de agua.
- Caldo bordelés, pero en ausencia de radiación solar intensa para evitar problemas de quemaduras.
- Oxiclóruo de cobre o mancozeb, en concentración de 2 g/L de agua (INIFAP, 2011).

1.5 Plagas de la vainilla

Existen diversas plagas las cuales atacan a la vainilla entre las de mayor importancia destacan el gusano peludo y la chinche roja que a continuación se describen con más detalle.

1.5.1 Gusano peludo

Orden: Díptera.

Nombre científico: *Plusia aurifera*.

Es un gusano o larva cuyo cuerpo está cubierto con bastantes pelos de color negro, aumenta de grosor y tamaño hasta 5 cm de longitud (Figura 7). Es una plaga que puede devorar dos o tres cogollos por noche, lo que retrasa el crecimiento, principalmente de plantas recién establecidas (COVECA, 2010).



Figura 7. Gusano peludo *Plusia aurifera*, alimentándose sobre una hoja de vainilla (Fuente: COVECA, 2010).

1.5.1.1 Control del gusano peludo

El control que se lleva a cabo es la aplicación de un compuesto orgánico sobre las plantas, el cual se prepara con tres cebollas (*Allium cepa*), tres cabezas de ajo (*Allium sativum*) (molidas en licuadora) y una barra de jabón neutro (en pedazos), disueltos en 40 litros de agua, conocido como “CAJA”, se deja reposar por 48 horas y luego se aplica con una bomba de aspersión (INIFAP, 2011).

Otra opción de control es recolectar los gusanos y matarlos manualmente, durante la noche o al amanecer.

También se puede llevar a cabo el control con el uso de un insecticida biológico a base de *Metarhizium anisopliae*, el cual se aplica por aspersión a una concentración de 250 a 500 gramos por ha (COVECA, 2010).

1.5.2 Chinche roja

Orden: Hemíptera.

Nombre Científico: *Tentecoris confusus* Hsiao and Sailer

La chinche roja, es la plaga de un insecto que causa más daño en el cultivo de vainilla, se deposita en el envés de las hojas en donde se alimenta succionando la savia de la planta, ataca primero a las hojas, luego el tallo y finalmente los frutos. Las heridas causadas por la plaga favorece la entrada de hongos y bacterias que provocan la pudrición, secamiento y desprendimiento de las hojas, hasta una defoliación total de la planta (INIFAP, 2011).

Es un insecto pequeño que pasa por los estadios o fases de huevo, ninfa (cuatro estadios) y adulto. En estado de ninfa miden menos de 5 mm de longitud y es cuando mayor daño causa en la vainilla y en estado adulto son de color amarillento con tonos naranja en la parte inferior del abdomen, requieren de 20 días para llegar al estado adulto, cuando son de color rojo y negro, miden de 5 a 6 mm (Figura 8), de ahí el nombre de chinche roja (Sánchez y Hernández, 2011).



Figura 8. Chinche roja (*Tentecoris confusus*) en estado de adulto (izquierda) y en estado de ninfa (derecho) (Fuente: Sánchez y Hernández, 2011).

1.5.2.1 Control de la chinche roja

La chinche roja se controla manualmente cuando existen bajas poblaciones, aplastándolas con la mano sobre la hoja donde se encuentran, en las primeras horas de la mañana, que es cuando están quietas (Prodesis, 2005).

También, se controlan con un producto orgánico conocido como "CAJA" (INIFAP, 2011).

Aspersión de malation, en dosis de 1,5 c.c. por litro de agua dirigiendo estas aspersiones en el envés de las hojas, para lograr una mayor efectividad del tratamiento (COVECA, 2010).

Tratándose de un insecto chupador, se recomienda aspersiones con sulfato de nicotina y jabón. La proporción mínima del insecticida es de una parte en 400 de agua y 4 partes de jabón. Cabe señalar que las aplicaciones resultan más efectivas cuando el insecto se encuentra en estado de ninfa (Damirón, 2004).

1.5.3 Caracoles y babosas

Estas plagas se alimentan de las partes jóvenes de las plantas. Se encuentran entre la materia orgánica y generalmente son de hábito nocturno. Se les controla con cebos envenenados, con formulas tradicionales a base de formaldehídos, los cuales se distribuyan en los sitios en donde se observe el daño (Sánchez y Hernández, 2011).

Cada plaga tiene un nivel bajo, por lo tanto no es económicamente necesario aplicar ninguna medida de control, pues los enemigos naturales mantienen el equilibrio biológico, sin causar mayores problemas. Sin embargo, en ocasiones puede ocurrir que llegue a un nivel en el cual empieza a causar daño económico y amerita aplicar las medidas de control más apropiadas para cada caso (Prodesis, 2005).

1.6 Manejo Integral

El manejo integral de plagas (MIP) constituye un esquema para la toma de decisiones en el control de plagas, en el que se toman en cuenta las consecuencias económicas, sociales y ecológicas que pudiesen resultar de la aplicación de la medida de control. Este esquema propone convivir con las especies que pudiesen ser dañinas, generando acciones que permitan mantener

su densidad poblacional en un nivel en el que el daño sea mínimo. El MIP no contempla la erradicación, ya que se entiende que la existencia de cada individuo, que es potencialmente dañino, pudiendo llegar a ser parte de una red de cadenas tróficas, que son la base de los ecosistemas (García y Medrano, 2001).

1.6.1. Control químico

Bajo el enfoque integrado de plagas, el uso indiscriminado de insecticidas debe ser muy limitado porque a pesar de estar formulado con moléculas de interés para el bienestar humano, su empleo sin restricciones presenta varios inconvenientes (García y Medrano, 2001) es fundamental tener conocimiento suficiente de todas estas herramientas de naturaleza química que constituyen una solución contra los diferentes tipos de plagas.

1.6.1.1 Plaguicidas

A los plaguicidas se les conoce con el nombre alternativo de “pesticidas” y son sustancias químicas cuyo objetivo es repeler, matar, atraer interrumpir o regular el crecimiento de los seres vivos considerados “plagas” (Ramírez y Lacasaña, 2001).

La aplicación de un plaguicida, involucra el cambio momentáneo de la ecología química del ambiente en el que se encuentra el insecto, así como el que lo rodea, por lo que estas moléculas deben ser consideradas contaminantes (García y Medrano, 2001).

1.6.2 Insecticidas naturales a partir de extractos vegetales

A partir de la necesidad por encontrar una nueva alternativa natural para el control de insectos plagas y reemplazar así los pesticidas sintéticos aparecen los insecticidas botánicos ofreciendo seguridad para el medio ambiente y una eficiente opción agronómica. (Borembaum, 1989).

Muchas plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que poseen propiedades biológicas con importancia contra insectos plagas. La selección de plantas que contengan metabolitos secundarios capaces de ser utilizados como insecticidas naturales deben ser de fácil cultivo y con principios activos potentes, con alta estabilidad química y de óptima producción (Silva *et al.*, 2002).

Las principales compuestos aislados de plantas usadas desde hace mucho tiempo para fines insecticidas son:

La rotenona, extraída de una planta llamada derris, (*Derris elliptica* y *Lonchocarpus utilis*, Fam. Leguminosae) es un flavonoide que se extrae de las raíces de estas plantas. De la primera se puede obtener un 13% de rotenona mientras que de la segunda un 5%. *Derris* es nativa de los trópicos orientales, mientras que *Lonchocarpus* es del hemisferio occidental. Este compuesto es un insecticida de contacto e ingestión, y repelente. Su modo de acción implica una inhibición del transporte de electrones a nivel de mitocondrias bloqueando la fosforilación del ADP a ATP. Por esto se dice que actúa inhibiendo el metabolismo del insecto. Los síntomas que presentan los insectos intoxicados con rotenona son: disminución del consumo de oxígeno, depresión en la respiración y ataxia que provocan convulsiones y conducen finalmente a la parálisis y muerte del insecto por paro respiratorio (Silva *et al.*, 2002).

Las piretrinas son ésteres con propiedades insecticida obtenidas de las flores del piretro (*Chrysanthemum cinaerifolium*, Fam Compositae). Los componentes de esta planta con actividad insecticida reconocida son seis ésteres, formados por la combinación de los ácidos crisantémico y pirétrico y los alcoholes piretrolona, cinerolona y jasmolona. Estos compuestos atacan tanto el sistema nervioso central como el periférico lo que ocasiona descargas repetidas, seguidas de convulsiones. Diversos estudios han demostrado que estos compuestos taponan las entradas de los iones sodio a los canales, generando que dichos canales sean afectados alterando la conductividad del ión en tránsito. Sin lugar a dudas la característica más importante de estos compuestos es su alto efecto irritante o "knock down" que hace que el insecto apenas entre en contacto con la superficie tratada deje de alimentarse y caiga. Las piretrinas son el mejor ejemplo de la copia y modificación de moléculas en laboratorio porque dieron origen a la familia de los piretroides (Silva *et al.*, 2002).

La nicotina es un alcaloide derivado especialmente de tabaco (*Nicotiana tabacum* Fam. Solanaceae). Sus propiedades insecticidas fueron reconocidas en la primera mitad del siglo XVI. Este compuesto no se encuentra en la planta en forma libre sino que formando maleatos y citratos. La nicotina es básicamente un insecticida de contacto no persistente. Su modo de acción consiste en mimetizar la acetilcolina al combinarse con su receptor en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular. El receptor acetilcolínico, es un sitio de acción de la membrana postsináptica que reacciona con la acetilcolina y altera la permeabilidad de la membrana; la actividad de la nicotina ocasiona la generación de nuevos impulsos que provocan contracciones

espasmódicas, convulsiones y finalmente la muerte. Hoy en día se encuentran en el mercado un grupo de insecticidas conocidos como neonicotinoides que son copias sintéticas o derivadas de la estructura de la nicotina como son Imidacloprid, Thiacloprid, Nitempiram, Acetamiprid y Thiamethoxam entre otros (Cremllyn, 1985).

1.6.3 Control biológico

El uso de enemigos naturales, denominado como control biológico, consiste en conservar y/o reproducir y liberar organismos que promueven la regulación de la población del insecto plaga, en este rubro existen depredadores, patógenos y parásitos que están siendo empleados para contrarrestar a las plagas. La liberación de enemigos naturales, sobre todo depredador y parásito se constituyó como una práctica común en la última década en cultivos como caña de azúcar y algodón en diversas regiones del país. Adicionalmente, otros patógenos como virus y nematodos constituyen fuentes de control alternativo que aún no son tan populares. Definitivamente, esta táctica es ideal para apoyar un programa MIP debido al casi nulo impacto sobre los ecosistemas que tienen la introducción de enemigos naturales (García y Medrano, 2001).

1.6.2.1 Antagonistas

Se entiende como antagonistas de la plaga aquellos microorganismos capaces de inhibir su crecimiento o erradicarla por completo. Para la búsqueda de éstos, es necesario que inmediatamente después de la muerte del insecto en cuestión se haga un aislamiento del microorganismo a partir del cuerpo mismo. De este modo se podrá saber si fue algún microorganismo el que provocó su muerte o solo es parte de su microbiota (García y Medrano, 2001).

1.7 Modelo biológico utilizado

1.7.1 *Stenomacra marginella*

La chinche de árbol *Stenomacra marginella* es un insecto que pertenece a la familia Largidae del orden Hemiptera, se distribuye en los estados de Guerrero, Estado de México y en el Distrito Federal, y se caracteriza por el contraste entre el color negro y naranja de su cuerpo y de sus patas, en donde también se intercalan estos colores. Las ninfas se distinguen por tener una mancha en forma de rombo en la parte superior de su cuerpo y algunas marcas rojizas en la parte del abdomen.

Aunque esta especie se le ha considerado como una plaga desagradable en ciertas épocas del año, cabe destacar que no causa ningún daño directo al hombre; sin embargo, debido al gran número que puede existir en una sola áreas *S. marginella* puede ser desagradable. En la ciudad de México, las plantas con mayores infestaciones son los árboles de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) y el de tepozán (*Buddleja cordata* Kunth) (Nava *et al.*, 2007; Silvestre, 2011). Los adultos están presentes desde finales del invierno hasta mediados del verano, produciendo una generación por año; comienzan a reproducirse en el mes de mayo hasta el mes de julio; colocando grupos de 30 a 50 huevecillos en el envés de las hojas de los árboles (Ramos-Morales, 2014)

1.7.1.1 Ciclo de vida de *Stenomacra marginella*

Huevo ovalado, bastante alargado, de color amarillento al ser depositado y tornándose rosado a rojo al madurar el embrión. Opérculo rodeado por alrededor de 11 procesos micropilares mide 1.2 de largo por 0.71 mm de ancho (Figura 9). una vez madurado el huevo pasa por diferentes estadios:

Primer estadio: forma ligeramente piriforme, con anchura máxima en el segmento abdominal. Cabeza, antenas, rostro, tórax, patas y abdomen de color pardo oscuro, casi negro: uniones entre los segmentos antenales, coxas de todas las patas, ojos prominentes y de color rojo oscuro mide 2.7 mm (Figura 9).

Segundo estadio: tiene una forma bastante piriforme, con anchura máxima en el segmento abdominal, muy similar al primer estadio, sin embargo, aumenta en tamaño y el abdomen dorsal adquiere una coloración rojiza y mide 3.1 mm (Figura 9).

Tercer estadio: alargado con anchura máxima en el segmento abdominal y la coloración parda se hace todavía más oscura, mancha rojiza del abdomen se hace más definida aunque varía en la cubierta y mide 4.4 mm (Figura 9).

Cuarto estadio: de forma muy larga, cabeza y tórax adquieren coloración más oscura, los márgenes laterales del cuerpo siguen siendo amarillo pálido miden 6.2 mm (Figura 9).

Quinto estadio: cuerpo muy alargado, sin que exista diferencia en la anchura del mesonoto, metanoto y abdomen, coloración igual a la de cuarto estadio, mide 9.0 mm (Figura 9).

Adulto: se distingue por sus segmentos antenales (rostrales, tibias y tarsos) completamente negros con tonos pardos rojizos y mide 11.1 mm. Todos los estadios ninfales son ápteros (sin alas) (Figura 9) (Silvestre, 2011).

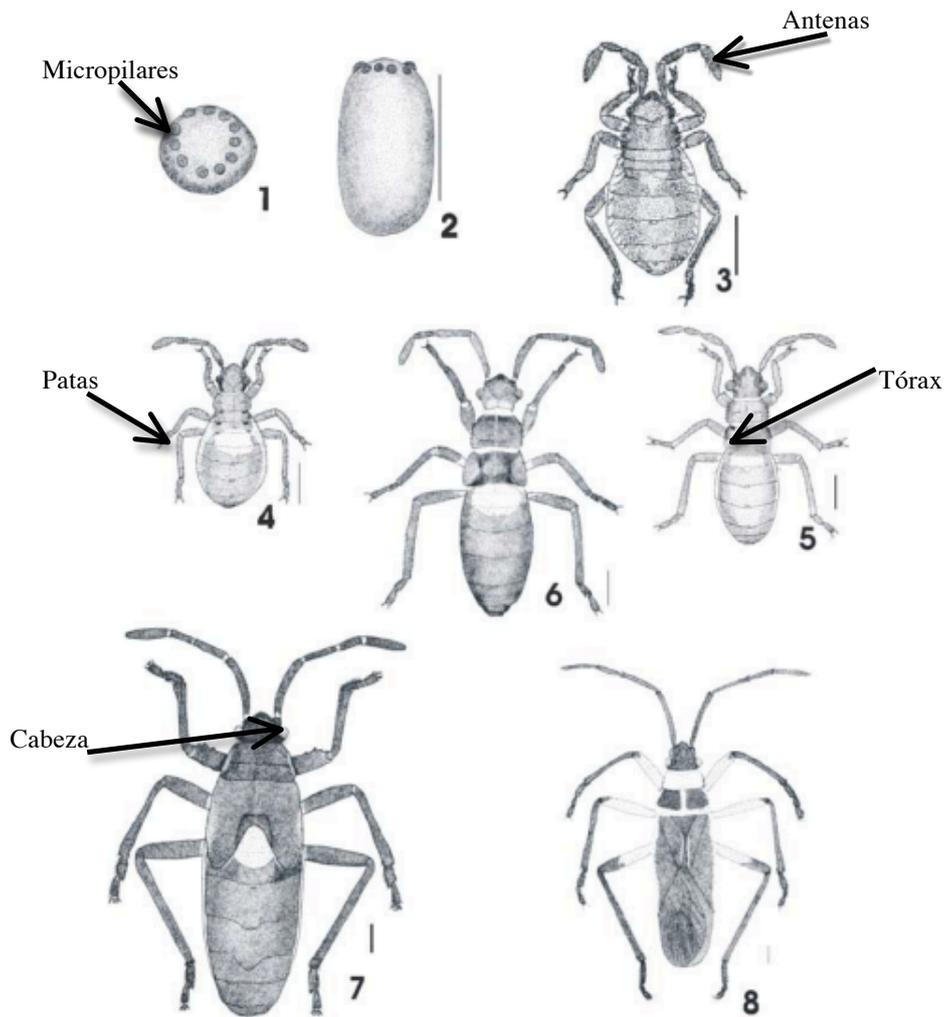


Figura 9. Ciclo de vida de *Stenomacra marginella* 1) Vista dorsal del huevo; 2) Vista lateral del huevo (la escala es la misma para ambas vistas); 3) Primer estadio; 4) Segundo estadio; 5) Tercer estadio; 6) Cuarto estadio; 7) Quinto estadio; 8) Adulto macho (Báez-Santacruz, *et al.*, 2013).

2.0 JUSTIFICACIÓN

La vainilla tiene una alta cotización en el mercado internacional, ya que se considera uno de los saborizantes de mayor importancia. Pero en los últimos años, el cultivo de vainilla se ha visto afectado por diversos factores entre los que destacan las plagas por insectos como son la "chinche roja" (*Tentecoris confusus*) que se alimenta de los tallos y de las vainas produciendo severos daños a este cultivo. La eficacia de los insecticidas químicos hace posible controlar esta plaga, pero su uso indiscriminado ha propiciado la aparición de resistencia, alto grado de contaminación y desequilibrio ecológico. Por esta razón, la OMS insiste en la búsqueda de nuevos métodos de control, fundamentalmente los biológicos. Una estrategia que se propone es el empleo de aislados bacterianos a partir de suelos de vainilla con efecto antagónico, para la chinche roja contribuyendo a disminuir el uso de insecticidas químicos.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto antagónico de aislados bacterianos a partir de suelos de vainilla sobre el modelo *Stenomacra marginella* para su posterior aplicación en plagas de la vainilla.

3.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar macroscópica y microscópicamente aislados bacterianos provenientes de suelos de vainilla de la zona del Totonacapan.
2. Evaluar el efecto antagónico de aislados bacterianos de suelos de vainilla sobre el modelo *Stenomacra marginella*.

4.0 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Esquema general de trabajo

La metodología que se siguió en este trabajo se muestra en la figura 10.

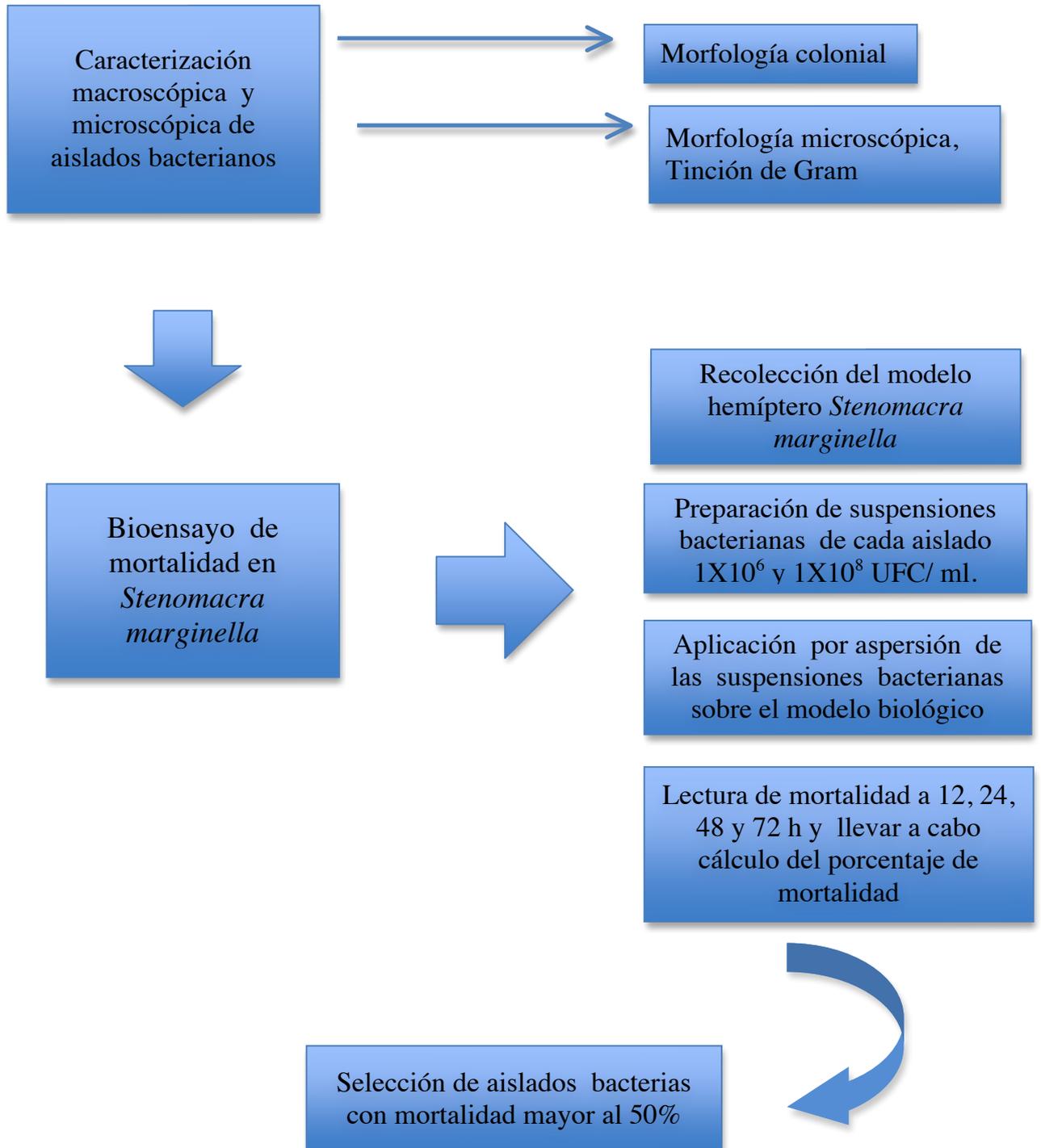


Figura 10. Esquema general de trabajo seguido en el estudio.

4.2 Purificación de los aislados bacterianos

En total se purificaron 17 aislados bacterianos, que ya previamente habían sido obtenidos de suelos de vainilla de los estados de Veracruz y Puebla. Partiendo del aislado original se resembraron en placas de agar nutritivo, se incubaron a 37°C aproximadamente de 24 a 48 horas dependiendo del crecimiento de cada aislado, se observó que cada una de las placas mostrara una sola morfología colonial y sin ninguna contaminación (Ortigoza y Ruiloba de León, 2011).

4.3 Caracterización macroscópica y microscópica

4.3.1 Macroscópica

Posterior a la purificación se seleccionaron las colonias bacterianas de las placas de agar nutritivo con base a su morfología colonial; tamaño, color, forma, borde, elevación, aspecto, luz reflejada, producción de pigmento y consistencia. Este proceso se siguió con cada uno de los 17 aislados bacterianos (Ortigoza y Ruiloba de León, 2011)..

4.3.2 Microscópica

Tinción de Gram donde se siguió este procedimiento:

1. Se hizo un frotis de cada aislado bacteriano fijándose con calor.
2. Se cubrieron los frotis con cristal violeta y se dejó actuar durante un minuto. se escurrió el exceso de colorante y lavó con un chorro suave de agua.
3. Cada frotis se cubrió con solución de lugol y se dejó actuar durante un minuto, escurrir el mordente y lavó con un chorro suave de agua.
4. Se colocaron los frotis en forma vertical y usando un fondo blanco, se decoloró añadiendo gota a gota el alcohol- acetona durante 5 a 15 segundos. El momento preciso para terminar la decoloración con agua es cuando dejan de fluir “hilos de colorante“ por el frotis. Este es el paso crítico de la tinción. Se lavó inmediatamente con un chorro de agua suave.
5. Se cubrieron los frotis con safranina y se dejó actuar durante un minuto, se escurrió el colorante y se lavó con un chorro suave de agua . Dejo secar al aire.
6. Cada tinción se observó al microscopio con el objetivo de inmersión observando las bacterias Gram positivas de color morado y las bacterias Gram negativas de color rosa o rojo (Ortigoza y Ruiloba de León, 2011).

4.4 Bioensayo para medir mortalidad con el modelo *Stenomacra marginella*.

4.4.1 Recolección del material biológico

La recolecta de los especímenes de *S. marginella* se realizó durante la primavera del 2014 y 2015 en la localidad de la Unidad Profesional Adolfo López Mateos, del IPN en Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero (Figura 11) y en la ENCB Unidad profesional Lázaro Cárdenas, Col. Santo Tomas, Delegación Miguel Hidalgo México, Distrito Federal. La recolecta de las chinches se hizo en fase adulta y se llevó a cabo en arboles de Tepozán (*Buddleja cordata* Kunth), los insectos se buscaron especialmente en el envés de las hojas, así como en los tallos, posteriormente, se colocaron en un frasco con hojas de tepozán, esto con el fin de mantenerlas viables durante su traslado en el caso de la Unidad Zacatenco a la Unidad Santo Tomas. Una vez que las chinches se tuvieron en el invernadero de la ENCB, se mantuvieron con trozos de melón (*Cucumis melo*) o lechuga (*Lactuca sativa*) y agua hasta ser empleadas en los bioensayos (Aguilar-Pérez, 2014).



Figura 11. Sitio de recolección de *Stenomacra marginella* Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Zacatenco, México, D.F. (lado izquierdo), hojas de Tépozán (*Buddleja cordata* Kunth) (Lado derecho).

4.4.2 Preparación de suspensiones bacterianas con cada aislado

1. Se colocaron 10 ml de agua estéril en 30 tubos de 15 x 125 mm
2. Con ayuda de una asa, se realizó una suspensión de cada uno de los aislados bacterianos con agua estéril hasta obtener una turbidez igual al tubo No 1 del Nefelómetro de Mcfarland equivalente a una concentración de 3×10^8 . La comparación se llevó a cabo sobre un papel blanco como fondo en el que se hayan trazado dos líneas horizontales negras. La igualación de la turbidez se hizo comparando la intensidad de las líneas observadas a través de ambas suspensiones, la bacteriana y la del tubo del nefelómetro recientemente agitados (Ortigoza y Ruiloba de León, 2011).

De la suspensión a la concentración de 3×10^8 de cada aislado se hicieron diluciones a una concentración 1×10^6 y 1×10^8 UFC/ml, ya que la bibliografía señala que para un bioensayo se deben utilizar estas dos concentraciones (García-Gutiérrez y Lezama-Gutiérrez, 2009; Durán-Ramírez, 2010).

4.4.3 Evaluación de la mortalidad de aislados bacterianos sobre *Stenomacra marginella*.

1. En el laboratorio se hizo un bioensayo de testigo el cual consistió en colocar agua destilada por aspersion sobre 10 chinches adultas, realizando esto por triplicado.
2. Para los bioensayos primero se colocaron las suspensiones bacterianas en atomizadores de plástico de 30 ml con los respectivos niveles de inóculo 1×10^6 y 1×10^8 UFC/ml, posteriormente por aspersion se aplicaron sobre 10 insectos adultos de *Stenomacra marginella* esto se hizo por triplicado.
3. Se llevaron a cabo lecturas de mortalidad de *Stenomacra marginella* a las 12, 24, 48, y 72 horas de cada bioensayo y su respectiva repetición. Al termino de las lecturas se realizaron los cálculos para obtener el porcentaje de mortalidad, se realizó el promedio de cada triplicado obteniendo este valor se sacó el porcentaje tomando como un 100% de vivencia el testigo.

4. Se seleccionan los aislados bacterianos que presentaron efecto antagónico con un porcentaje de mortalidad mayor al 50 % (García y Medrano, 2001; Durán-Ramírez, 2010).

5.0 RESULTADOS

5.1 Caracterización macroscópica y microscópica de los aislados bacterianos

La morfología colonial se observó en cultivos de 24 horas de cada uno de los aislados, algunos aislados presentaron ciertas características en cuanto a morfología colonial forma, color, borde, elevación y aspecto (Tabla 1). Sin embargo; se diferenciaron unas de otras por el tamaño, la luz reflejada, producción de pigmento y consistencia. Por la tinción de Gram se clasificaron en Gram positivos y Gram negativos y su forma. Todos los aislados presentaron una morfología microscópica de bacilo, de éstos diez fueron Gram negativo y siete Gram positivo como se muestra en la tabla1.

Tabla 1. Caracterización microscópica y macroscópica de 17 aislados bacterianos de suelos de vainilla de los estados de Veracruz y Puebla.

Clave del aislado	Morfología microscópica		Morfología macroscópica
	Gram	Bacilos / Cocos	
MP2	-	Bacilos	3mm, redonda, blanca, convexa, borde entero, aspecto húmedo, butirosa, opaca, brillante.
MP5	-	Bacilos	Redonda, borde entero, convexa de aspecto húmedo.
MP8	-	Bacilos	
MP9	-	Bacilos	
MP10	+	Bacilos	3mm, circular, borde entero, crema, convexa, aspecto húmedo, butirosa.
MP11	+	Bacilos	2mm, redonda, beige, borde entero, convexa, aspecto húmedo, brillante.
MP12	-	Bacilos	Redonda, borde entero, convexa, aspecto húmedo.
MP13	-	Bacilos	
MP14	+	Bacilos	
MP16	-	Bacilos	
MP20	+	Bacilos	
MP22	+	Bacilos	2mm, circular, borde entero, blanca, convexa, aspecto húmedo, butirosa.
MP23	+	Bacilos	Redonda, borde entero, convexa, aspecto húmedo.
MP28	-	Bacilos	
MP31	-	Bacilos	
MP32	+	Bacilos	
MP33	-	Bacilos	

5.2 Evaluación de la mortalidad de aislados bacterianos sobre el modelo biológico *Stenomacra marginella*

Cada bioensayo se realizó por triplicado con su respectivo testigo, para cada uno de los 17 aislados bacterianos, en cada caso se promedió para realizar el análisis del porcentaje de mortalidad que ejercieron los aislados bacterianos sobre el modelo biológico *S. marginella* los aislados con la clave MP2, MP10 y MP11 obtuvieron porcentajes de mortalidad entre 10 y 30 % a las 72 h, por su parte el aislado MP22 presento el 20% de mortalidad en un tiempo de 48h y a las 72h el 30% como se muestra en la (Figura 12), tomando como el 100% de vivencia al testigo y los 14 aislados restantes no presentaron mortalidad sobre *Stenomacra marginella*.

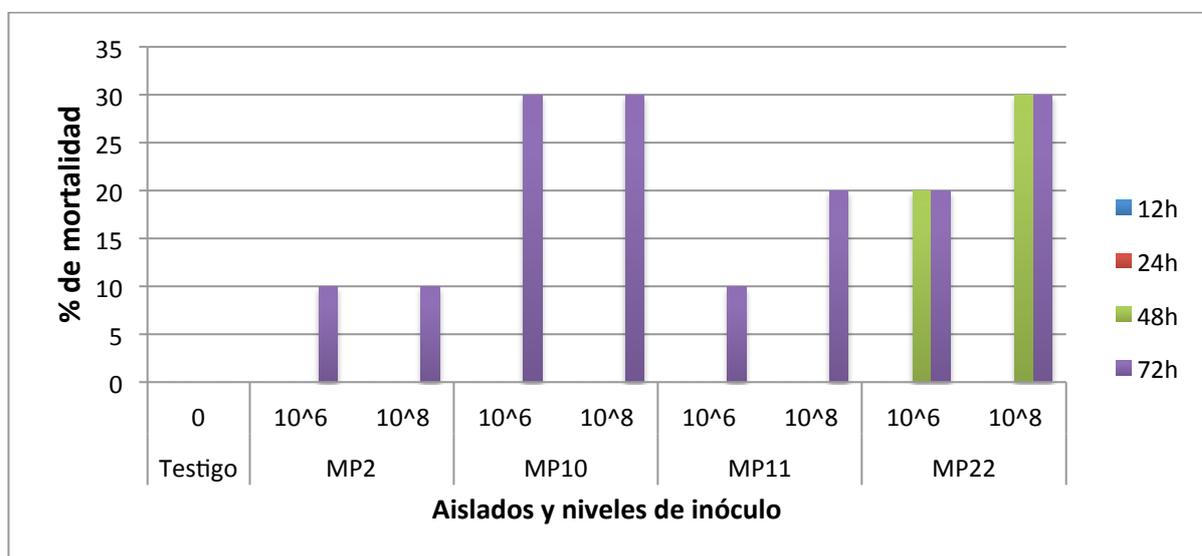


Figura 12. Efecto antagónico de aislados bacterianos procedentes de suelos de vainilla sobre el modelo *Stenomacra marginella*. Por cada aislado bacteriano se hizo el bioensayo por triplicado utilizando dos concentraciones bacterianas (1×10^6 y 1×10^8 UFC/ml). Incluyendo el testigo que representó el 100% de vivencia y así graficándose el promedio de estos.

6.0 DISCUSIÓN

La vainilla tiene una alta cotización en el mercado internacional, ya que se considera uno de los saborizantes de mayor importancia aunque en los últimos años, el cultivo de vainilla se ha visto afectado por diversas plagas (INIFAP, 2011; SAGARPA, 2013). La aplicación de los insecticidas químicos hace posible controlar algunas plagas de la vainilla, pero su uso indiscriminado ha propiciado la aparición de resistencia, alto grado de contaminación y desequilibrio ecológico. Por esta razón, la OMS insiste en la búsqueda de nuevos métodos de control, fundamentalmente los biológicos. El control biológico es parte fundamental de los programas integrados para reducir las poblaciones de plagas y se basa en el uso directo o indirecto de enemigos nativos naturales, depredadores o patógenos que controlan organismos plaga (Badii y Abreu, 2006; Armengol *et al.*, 2007).

De los 17 aislados bacterianos aislados a partir de suelos de vainilla de los estados de Veracruz y Puebla, diez fueron bacilos Gram negativos. De estos 17 aislados bacterianos evaluados solo cuatro presentaron mortalidades que van de (10 a 30%) sobre el modelo *S. marginella*. El aislado MP22 presentó una mejor actividad antagónica a partir de las 48 h, en los dos niveles de inóculo, teniendo un porcentaje de mortalidad del 20 y 30% para los niveles de inóculo 1×10^6 y 1×10^8 respectivamente.

En otros países como en Colombia se han realizado aislamientos de microorganismos de la rizosfera de plantas de vainilla en un cultivo piloto ubicado en el municipio de Sopetrán (Antioquia). Donde se encontró una alta variedad de microorganismos destacándose 17 cepas del género *Pseudomonas*, siete de *Bacillus*, cuatro de *Serratia*, cuatro de *Enterobacter*, tres del género *Acinetobacter*, dos correspondientes a *Chromobacterium* y dos al género *Klebsiella* (Álvarez-López, 2012). Por lo que en base a lo anterior en efecto los bacilos Gram negativos, son los que predominan en los cultivos de vainilla por lo que se esperaba obtener aislados con efecto antagónico ya que se ha reportado que los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, se utilizan como bio-control en cultivos de vainilla (Osorio-Mosqueda, 2012) perteneciendo estos al grupo de bacilos Gram negativos.

Por otra parte porcentajes de mortalidad se han observado cuando se hace el empleo de extractos de especies vegetales como gobernadora (*Larrea tridentata*) y epazote de zorrillo (*Chenopodium graveolens*) utilizando disolventes metanólicos y

hexanolicos los porcentajes obtenidos son del 5.55% hasta 44.4% en un periodo de 24 a 72 h; sin embargo, uno de los inconvenientes resulta ser el tiempo de extracción, ya que el método empleado es el de maceración el cual tiene como fin el lograr una mayor obtención en número y concentración de los principios activos; por otra parte la cantidad de extracto obtenido depende del disolvente que se utiliza, cabe mencionar que de igual manera la proporción que esté presente en la planta donde los extractos hexánicos están presentes en poca cantidad (Aguilar-Pérez, 2014). Por lo que al hacer empleo de bacterias antagónicas se obtuvieron resultados similares pero en un tiempo de 48h así como la obtención del biomasa es más económico en cuanto que son microorganismos no exigentes nutricionalmente y que este método no utilizó disolventes; sin embargo, cabe mencionar que para poder utilizar como control biológico debe presentar porcentajes de mortalidad superiores al 50% (García y Medrano, 2001). Sin embargo, en un estudio donde se aisló el 79.5% de bacterias, donde la interpretación de los números de poblaciones son complejas, se puede afirmar que éstos se encuentran en valores iguales o superiores a 1×10^6 UFC/g (Osorio-Mosqueda, 2012) por lo que se utilizó una concentración mayor a esta en los bioensayos realizados para observar el efecto antagónico.

Los enemigos naturales efectivos como controladores biológicos deben presentar una serie de características donde destaca la adaptabilidad a los cambios en las condiciones físicas del medio ambiente, alto grado de especificidad a un determinado huésped/presa, velocidad de crecimiento poblacional, alta capacidad de búsqueda, particularmente, a bajas densidades del huésped o presa y acción biológica sobre la plaga (producción de enzimas o toxinas), sincronización con la fenología del huésped/presa y capacidad de sobrevivir períodos en los que el huésped/presa esté ausente además debe tener capacidad de modificar su acción en función de su propia densidad e inocuas para el hombre y otros microorganismos vivos (Huffaker y DeBach, 1971) y presentar un porcentaje de mortalidad mayor al 50% (García-Gutiérrez y Lezama-Gutiérrez, 2009) citadas las características para la selección de un microorganismos con capacidad antagónica con los bioensayos llevados a cabo en laboratorio solo se evaluó la velocidad de crecimiento que efecto fue favorable; sin embargo la acción biológica sobre la plaga no fue favorable reflejado que no supero el 50% de mortalidad.

En un estudio llevado a cabo en el Laboratorio de Alta Tecnología de Xalapa, S. C. (Universidad Veracruzana). En el cual se seleccionaron 19 cepas bacterianas de la

rizósfera de vainilla de la localidad de Francisco Sarabia, municipio de Papantla, Veracruz desarrolladas en medio de cultivo. Se evaluó “in vitro” e “in vivo” la capacidad antifúngica de las cepas bacterianas aisladas mediante la inoculación simultánea del hongo y la bacteria. Seis cepas bacterianas fueron capaces de inhibir in vitro en más del 90%, el desarrollo de *F. oxysporum* y *F. solani* hongos que producen enfermedad en la vainilla. Las pruebas “in vivo” mostraron que las bacterias en estudio inhibieron de manera eficaz el desarrollo de *F. solani* solo en tallo y que *F. oxysporum* presentó mayor resistencia que *F. solani*, al antagonismo microbiano (Adame-García, 2009). Este es uno de los pocos estudios de control biológico que se ha realizado en el cultivo de vainilla en nuestro país; sin embargo, este control es llevado a cabo para hongos. Se conoce que entre los mecanismos antagónicos a través de los cuales ocurre el proceso de control biológico de las bacterias sobre los hongos se encuentran las relaciones de competencia, la producción de antibióticos, enzimas y de otras sustancias como sideróforos, que permiten a estos microorganismos ejercer su capacidad biocontroladora (Bais *et al.*, 2006).

El mecanismo antagónico que llevan a cabo las bacterias utilizadas para control biológico de insectos plaga, se introducen a los hospederos. Estas bacterias se multiplican en el aparato digestivo de los insectos, produciendo algunas enzimas (como la lecitinasa y las proteinasas) y toxinas, las cuales dañan las células del intestino medio y facilitan la invasión del hemocele del insecto plaga. Los pasos que siguen a la infección varía según el tipo de bacterias. Habitualmente, una vez que invaden el hemocele, se multiplican y matan al hospedero por septicemia, por la acción de toxinas o por ambos (Van Driesche *et al.*, 2007). El mecanismo antagónico es un criterio muy importante para la selección de bacterias antagónicas al igual que presentar un porcentaje de mortalidad mayor al 50% ya que dependerá del microorganismo antagónico utilizado así como del tipo de plaga que se quiera controlar, resulta ser que el control biológico de bacterias sobre hongos en base a los resultados reportados por el Laboratorio de Universidad Veracruzana es eficaz; sin embargo el llevado a cabo de bacterias a insectos es menos común o no factible. Se ha investigado la actividad de bacterias contra diversos insectos de los órdenes *Lepidoptera*, *Coleóptera*, *Díptera*, *Hymenoptera*, *Orthoptera* (Durán-Ramírez, 2010); sin embargo, para el orden *Hemiptera* al cual pertenece *S.marginela* no.

Las ventajas de realizar bioensayos en condiciones controladas son;

- Permitir un adecuado control de los factores nutricionales de los insectos.
- Evitar la introducción de patógenos.
- Poder realizar los experimentos en cualquier época del año, debido a que se puede contar con grandes cantidades de insectos, mantenidos en condiciones uniformes, permitiendo corregir las variaciones debidas a diferentes estadios del insecto.
- Permiten eliminar la incertidumbre propiciada por las diferencias de actividad biocontroladora que presentan las diferentes cepas, ya que se ensayan los organismos de prueba bajo las mismas condiciones
- Poder medir directamente la capacidad insecticida de una determinada cepa, la cual al no estar formulada como producto comercial, no contiene impurezas que interfieran con el bioensayo.

7.0 CONCLUSIONES

- Se caracterizó un total de 17 aislados bacterianos que presentaron una morfología microscópica de bacilo en mayor proporción Gram negativas; sin embargo no se realizó una caracterización bioquímica al no presentar el porcentaje de mortalidad requerido.
- Solo cuatro aislados bacterianos presentaron efecto antagónico sobre el modelo *Stenomacra marginella*, siendo el aislado MP22 el que presentó la mejor actividad antagónica a partir de las 48 h, teniendo un porcentaje de mortalidad del 20 y 30% para cada uno de los niveles de inóculo probados respectivamente; sin embargo, ninguno de los aislados cubrió el requisito de tener mortalidad mayor al 50% para ser seleccionado.

8.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Adame-Garcia, G. [en línea]: Bacterias antagonistas de hongos fitopatógenos asociadas a la raíz de vainilla planifolia andrews. 2009 [Fecha de consulta: Septiembre, 2015]. Disponible en: http://www.somas.org.mx/pdf/pdfs_libros/agriculturasostenible6/61/4.pdf
2. Aguilar-Pérez, S. 2014. Búsqueda de antagonistas y extractos vegetales para el control de *Tentecoris confusus* una plaga de la vainilla en México. Tesis licenciatura, ENCB-IPN, México D.F. 51-53 p.
3. Álvarez-López, C.A. 2012. Identificación y caracterización bioquímica, morfológica y molecular de microorganismos cultivables asociados a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla. Tesis de Maestría Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín Facultad de ciencias. 55-60 p.
4. Armengol, G., Escobar M.C., Maldonado, M.E. and Orduz, S. 2007. Diversity of Colombian Strains of *Bacillus thuringiensis* with Insecticidal Activity Against Dipteran and Lepidopteran Insects. J Appl Microbiol 102:77-88.
5. ASERCA. 2002 . Más allá de nuestro campo. Revista Claridades Agropecuarias, 2:17-26.
6. Badii, M. H. and Abreu J. L. 2006. Biological control a sustainable way of pest control. International J of Good Conscience 1:82-9
7. Báez-Santacruz, J., Cervantes-Peredo, L., Ponce-Saavedra, J. 2013. Ciclo de vida de *Stenomacra marginella* (Hemiptera: Heteroptera: Largidae). Revista mexicana de biodiversidad 4:84
8. Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G. and Gilroy, S., Vivanco JM. 2006. The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. Annu Rev Plant Biol 57:233-266.
9. Borembaum, M.R. 1989 . What is synergy Pharmacological. Rev 41: 93-141
10. CAD (Colombia Alternative Development). 2003. Manual de fitoprotección y análisis de plaguicidas. Cultivo: VAINILLA (*vainilla planifolia*). Colombia. 4 p.
11. Castro, B. G. 2008. Evaluación del cultivo y producción de vainilla en la zona de Papantla, Veracruz, México. Agrociencia 3:45
12. COVECA. [en línea]: Monografía de la vainilla 2010. Gobierno del estado de Veracruz, Veracruz. [Fecha de consulta: abril, 2014]. Disponible en : <http://portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs/PAGE/COVECAINICIO/IMAGE>

- NES/ARCHIVOSPDF/ARCHIVOSDIFUSION/TAB4003236/VAINILLA2010.PDF.
13. Cremlyn, R. J. 1985. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. Ed. Limusa. México. 20-23p.
 14. Damirón, R. [en línea]: La vainilla y su cultivo. Dirección General de Agricultura del Estado de Veracruz, México. 2004 [Fecha de consulta: Abril, 2014]. Disponible en: www.concitver.com
 15. DOF. (2009). NMX-FF-074-SCFI-2009. Productos no industrializados para uso humano, vainilla (*vanilla fragrans* (salisbury) ames- especificaciones y métodos de prueba.
 16. Domínguez, G.R. 2005. Crecimiento y Niveles nutrimentales en *Vanilla planifolia*. Tesis Maestría Colegio de Posgraduados, Montecillos, México. 59 p.
 17. Durán-Ramírez, F. 2010. Control biológico de plagas. Grupo latino. Colombia. 23-44 p.
 18. FAO [en línea]: 2008 [Fecha de consulta: Abril, 2014]. Disponible en : http://www.unpa.edu.mx/tesis_Tux/tesis_digitales/FRESVINDA%20YASMIN%20VASQUEZ%20REYES.pdf.
 19. Fitochapingo [en línea]: 2010. [Fecha de consulta: Abril, 2014]. Disponible en: <https://www.fitochapingo.com./search?q=vainilla>
 20. Flores [en línea]: El jardín botánico virtual. 2007 [fecha de consulta: Abril 2014]. Disponible en: http://www.virboga.de/Vanilla_planifolia.htm
 21. García-Gutiérrez, C. y Lezama-Gutiérrez, R. 2009. Manual de técnicas para el aislamiento, identificación y caracterización de hongos y nematodos entomopatógenos. IPN. México. 37-39 p.
 22. García G.C. y Medrano R.H. 2001. Estrategias para el control de plagas de hortalizas. Estudios de identificación y control. 1° Ed. CONACyt. México. 13 p
 23. Huffaker, C.B. and DeBach P. 1971. The natural enemy component, in natural control and the theory of biological control. 16-67 p.
 24. Ibáñez-Olea, J. [en línea]: Cítricos de Tehuaxtla, Morelos. 2007 [Fecha de consulta: Abril, 2014]. Disponible en: <http://www.mexicocampo dentro.org/citrico.php>
 25. INIFAP. 2011. Programa Estratégico para el desarrollo rural Sustentable de la Región Sur- Sureste de México: Trópico Húmedo. Paquete tecnológico Vainilla. 3, 4, 10 -14 p.
 26. León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3ª Ed. IICA. Universidad Nacional de Colombia. 92 p.
 27. Lubinsky, P.S., Bory, J., Hernández, K., Seung-Chul, A. and Gómez-Pompa. 2008. Origin and Dispersal of Cultivated Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Economic Botany. 127-138 p
 28. Naturland. 2000. Agricultura orgánica en el Trópico y subtrópico, guías de 18 cultivos: Vainilla. Asociación Narurland. Alemania.

29. Nava, G., Sheirla, M., Ortíz, O.E. y Uría, G. E. 2007. Estudio anatomohistológico del sistema digestivo de *Stenomacra marginella* (Eric-Schaeffer, 1850) (Hemiptera: Heteroptera: Largidae). *Acta Zoológica Mexicana* (nueva serie). 49-57 p.
30. Ortigoza, F.J. y Ruiloba de León F.S. 2011. *Microbiología Práctica*. 12^a Ed. Academia de Microbiología General, ENCB, IPN. 39-40 p.
31. Osorio-Mosqueda, A.I. 2012. Efecto de materiales orgánicos, fertilizantes e inóculos microbiales sobre el crecimiento y nutrición de plántulas de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks). Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín Facultad de Ciencias Agropecuaria.
32. Prodesis. [en línea]: Manual de asistencia técnica para la producción de vainilla en parcela agroforestal y acahuals en Chiapas, México vainilla de la Lacandonia S.A de C.V, México. 2005. Perteneciente al proyecto desarrollado social integrado y sostenible México- Unión Europea. Universidad Nacional de Colombia. [Fecha de consulta: Marzo, 2014]. Disponible en:
http://www.sedepas.chiapas.gob.mx/docs/publicaciones_SEDEPAS/Produccion_sustentable/MANUAL%20DE%20ASISTENCIA%20TECNICA%20PAR
33. Ramírez, J. A., y Lacasaña, M. 2001. Plagucidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Barcelona. *Archivo Prevención Riesgos Laborales* 2:67-75
34. Ramos-Morales, p. [en línea]: Bases celulares de la genética: Observación de la meiosis en los testículos de *Stenomacramarginella*. Facultad de Ciencias, Colegio de Ciencias y humanidades-UNAM, México. 2014. [Fecha de consulta: Marzo, 2014]. Disponible en: http://www.cneq.unam.mx/cursos_diplomados/diplomados/medio_superior/ens3/portafolios/biología/equipo4/practica_meiosis.htm.
35. SAGARPA [en línea]: Estudio de Oportunidades de Mercado Internacional para la Vainilla Mexicana. 2013. FIRCO-SAGARPA, Puebla. [fecha de consulta: Abril 2014]. Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/VAINILLA.pdf
36. Sánchez, M.J. y Hernandez, H.J. 2011. Producción de planta de calidad de vainilla (*vainilla planifolia* Jackson). Folleto técnico No. 60. 1^o Ed. Impreso Servintegra. México, Septiembre. 7, 14, 16 p.
37. Sánchez, M.S. 1993. Manual de producción comercial de vainilla, *Vanilla planifolia* Andrew en México. Tesis de Maestría. Colegio de Posgrados, Montecillos, Texcoco, Edo. Mex., MEX. 14 p.
38. Secretaria de Hacienda y Crédito Público (SHCP). 2014. Panorama de la vainilla. Financiera Nacional de desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero
39. Silvestre. M., J. M. 2011. Contribución al conocimiento bioecológico de la chinche *Satenomacra margrnella* Herrich-Scheffer (Hemiptera:Largidae) en tres especie arbolado del Campus Iztacala, México: *Acer negundo* L.,

- Erythrina coralloides* y *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Ling. Tesis Licenciatura F.E.S Iztacala, U.N A M, México. 61 p.
40. Silva, G., A. Lagunes, J. C. Rodríguez y D. Rodríguez. 2002. Insecticidas vegetales; Una vieja-nueva alternativa en el control de plagas. Revista Manejo Integrado de Plagas (CATIE).
41. Vainilla. [en línea] Vainilla natural orgánica. 2008. [Fecha de consulta 26 de Abril, 2014]. Disponible en: <http://www.vanillamexico.com>.
42. Van Driesche, R.G., Hoddle, M.S. y Center, T.D. 2007. Uso de patógenos de artrópodos como plaguicidas. En: Control de plagas y malezas por enemigos Naturales. Sección IX. Capítulo 24. 443- 466 p.