



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL**

**EFICIENCIA DE LAS RIZOBACTERIAS
PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL
(RPCV) EN PLÁNTULAS DE CAÑA DE AZÚCAR
(*Saccharum* spp.)**

ANTONIO MORGADO GONZÁLEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: "EFICIENCIA DE LAS RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (RPCV) EN PLÁNTULAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum spp.*)" realizada por el alumno: **ANTONIO MORGADO GONZÁLEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA

ASESOR:



DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO

ASESOR:



DR. ROBERTO QUINTERO LIZAOLA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Septiembre de 2013

RESUMEN

EFICIENCIA DE LAS RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (RPCV) EN PLÁNTULAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* spp.)

Antonio Morgado González, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2013

Las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV) son una alternativa en la nutrición de plantas cultivadas, ya que estimulan su crecimiento y rendimiento, mejorando la absorción de nutrimentos, el aumento en su movilización, la producción de antibióticos y de reguladores de crecimiento. La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es un cultivo muy demandante de nutrimentos y de alto rendimiento en México, el uso de las RPCV es fundamental para mejorar su rentabilidad. En esta investigación, se evaluó la efectividad en producción de indoles totales por el método Salkowski, solubilización de fosfatos con medio Pikovskaya de 24 cepas bacterianas de siete especies, y su impacto en el desarrollo de vitroplantas de caña de azúcar de la variedad Mex 69-290 al ser inoculadas. Las cepas fueron previamente identificadas, en el Laboratorio de Interacción Molecular Planta-Microorganismo del Colegio de Postgraduados, las especies utilizadas fueron *Aeromonas salmonicida*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas* sp., *Shewanella putrefaciens*, *Sphingomonas paucimobilis*, y se propagaron en caldo nutritivo. Esta investigación se encuentra adscrita a la Línea Prioritaria de Investigación 5 (LPI) del Colegio de Postgraduados. La unidad experimental fue una maceta con una mezcla esterilizada con 50% de suelo agrícola y 50% de agrolita, con una plántula de caña de azúcar producida *in vitro*. Se inoculó 1.0 mL de cultivo bacteriano (1×10^7 UFC) por maceta. El experimento se desarrolló en invernadero por 90 días, en un diseño experimental completamente al azar, con 24 tratamientos, un testigo y cinco repeticiones. Se realizaron cinco muestreos destructivos quincenales para medir las variables respuesta: altura, diámetro de tallo, número de macollos, área foliar, biomasa seca de la parte aérea y de la raíz. La especie *Ochrobactrum anthropi* fue superior en producción de indoles con valores de 116.69 y 115.70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ así como *Pseudomonas luteola* con 117.35 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En relación a la solubilización de fosfatos, *Stenotrophomonas maltophilia* presentó los valores más altos: 222.43 y 216.38 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Del total de cepas inoculadas, 13 fueron superiores en diferentes variables respuesta. La altura se incrementó en 27.75% en promedio con respecto al testigo, el diámetro en 30.75%, el número de macollos en 38.5%, el área foliar en 49%, el peso de materia seca aérea y de raíz en 50.75 y 59.5% respectivamente. En cuanto al índice de área foliar (IAF), tasa de asimilación neta (TAN), tasa relativa y absoluta de crecimiento (TRC y TAC), *P. luteola*, *P. fluorescens*, *Oanthropi* y *S. maltophilia* fueron las cepas que mostraron mayores efectos positivos. Las cepas *P. luteola* (Tratamiento 1), *O. anthropi* (T5), *Aeromonas salmonicida* (T15), *Burkholderia cepacia* (T16), *P. fluorescens* (T22) y *S. maltophilia* (T24) fueron las más destacadas en diferentes variables respuesta y su constante persistencia en el tiempo, siendo potenciales para ser utilizadas como biofertilizantes en el cultivo de caña de azúcar de forma individual o en consorcios, aunque son necesarios estudios de antibiosis para conocer la compatibilidad entre los microorganismos evaluados.

PALABRAS CLAVE: Nutrición vegetal, biofertilizantes, desarrollo, fosfatos solubles, fitohormonas.

ABSTRACT

EFFICIENCY OF PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA (PGPR) ON SUGAR CANE (*Saccharum* spp.) PLANTLESS

Antonio Morgado González, M. Sc.

Colegio de Postgraduados, 2013

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) are used as an alternative for nutrition of cultivated plants, since such bacteria are able to stimulate plant growth and yield, through processes such as nutrient uptake improvement, mineral mobilization increase, biosynthesis of antibiotics and growth regulators. Sugar cane (*Saccharum* spp.) is a crop plant which demands high amount of nutrients and shows high yields in Mexico, therefore, the use of PGPR is crucial for improving its profits. In this research we evaluated the efficiency of production of total indols for Salkowski, phosphate solubility for Picovskaya method, of 24 bacterial strains belonging to seven different species, and its impact on sugar cane plantlets variety Mex 69-290 when being inoculated with such bacteria. Bacterial strains were previously characterized in the Laboratory of Plant-Microorganism Molecular Interaction from Colegio de Postgraduados, belonging to the species *Aeromonas salmonicida*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas* sp., *Shewanella putrefaciens*, *Sphingomonas paucimobilis* and *Stenotrophomonas maltophilia*. Bacterial strains were propagated in a proper breeding ground. The experimental unit was a pot containing a sterile mixture of 50% crop soil and 50% agrolite, with a sugar cane plantless propagated *in vitro*. Each plant in the pot was inoculated with 1.0 mL of bacterial culture (1×10^7 UFC). The study was carried out in greenhouse during 90 days, using a completely randomized experiment with 24 treatments, a control, and five replicates each. After inoculation, five destructive samplings were performed every 15 days in order to measure response variables plant height, shoot diameter, number of stumps, foliar area, and dry biomass of shoot and roots. The species *Ochrobactrum anthropi* produced the highest amount of indols with values of 116.69 y 115.70 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as well as *Pseudomonas luteola* with 117.35 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Concerning phosphate solubilization, *Stenotrophomonas maltophilia* showed the highest values: 222.43 y 216.38 $\mu\text{g mL}^{-1}$. From the total of bacterial strain inoculated, 13 showed superior effects on plant growth variables measured. Plant height increased 27.75% on average in comparison to the control; shoot diameter in 30.75%, number of stumps in 38.5%, foliar area in 49%, dry biomass of shoot and root 50.75 and 59.5%, respectively. In relation to foliar area index (IAF), net assimilation rate (TAN), relative and absolute growth rate (TRC and TAC), *P. luteola*, *P. fluorescens*, *O. anthropi* y *S. maltophilia* were the strains showing the strongest effects. The species *P. luteola* (Treatment 1), *O. anthropi* (T5), *Aeromonas salmonicida* (T15), *Burkholderia cepacia* (T16), *P. fluorescens* (T22) and *S. maltophilia* (T24) were the most prominent in different response variables and their permanence during the time of the experiment, and therefore can be used as biofertilizers in the sugar cane crop individually or associated, though studies on antibiosis in order to know compatibility strategies must be carried out in deep.

KEY WORDS: Plant nutrition, biofertilizers, plant development, soluble phosphates, plant growth regulators.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, por darme nuevas herramientas, nuevos conocimientos y sobre todo por enseñarme a ver la vida profesional desde otra perspectiva.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), ya que sin su apoyo económico otorgado a lo largo de mis estudios, no hubiera podido concluir esta etapa que me había planteado en la vida.

A mi consejo particular: Dr. David Espinosa Victoria, Dr. Fernando C. Gómez Merino y al Dr. Roberto Quintero Lizaola, que siempre mostraron su entera disponibilidad para la buena culminación de este trabajo de investigación.

De forma particular, agradezco al Dr. David Espinosa Victoria, ya que siempre mostró su entusiasmo, disponibilidad, confianza y nunca escatimó su experiencia y conocimientos para enriquecer este trabajo de investigación.

Al Dr. Fernando C. Gómez Merino, ya que me ha demostrado que en la vida debe existir tiempo para todo, y que nunca se deben dejar las cosas para mañana si se pueden realizar hoy. De igual forma agradezco sus aportaciones y toda la ayuda y facilidades prestadas.

Al Dr. Roberto Quintero Lizaola, por estar siempre al pendiente de mis avances, por siempre mostrarme su calidad humana, por escucharme y guiarme cuando más necesitaba un consejo, gracias por sus aportes a esta investigación.

Al área de microbiología del Colegio de Postgraduados, especialmente al Dr. Juan José Almaraz, que nunca midió sus consejos hacia mi trabajo de investigación, siempre mostró su disponibilidad y sobre todo me enseñó que no se requiere estar en un papel grabado para brindar ayuda a los demás.

A todos los catedráticos que marcaron mi vida personal y profesional con sus clases, sus consejos y su calidad humana, y que llevaré presentes a lo largo de mi vida profesional: Dra. Libia Trejo-Télez (gracias por mostrarme que la originalidad nunca va peleada con la sabiduría), Dr. Jorge Etchevers, Dra. Emma Zavaleta, Dr. Tito Roque, y todos los que no menciono por falta de espacio, gracias.

DEDICATORIA

A Dios, ya que nuevamente me demuestra que no hay límites en la vida, siempre y cuando se tenga FE en él.

A mis padres: Ma. Claudia González González y Fidencio Morgado Silva por su confianza y apoyo sin condiciones, gracias papás por regalarme esta hermosa vida.

A mis hermanos: Aurora, Florence, Gisela y José Alberto, por su cariño y demostrarme que todo en la vida se puede, siempre y cuando se luche por ello.

A mis sobrinos: Josué y Luis Ángel, por su muestra de alegría, sus energías para vivir y sobre todo por ser la luz en la familia.

A mis amigos que en esta etapa de mi postgrado estuvieron presentes, aconsejándome o mal aconsejándome, pero que siempre estuvieron ahí para compartir un poco de sus vidas conmigo: Erika, Daniela, Edwin, Rubén, Alonso, Gil, Esmeralda, Alicia, y a todos que no menciono, muchas gracias, esperando la amistad perdure a lo largo del tiempo.

A la Sra. Rosaura y Margarita por demostrarme que no se necesita tener los grandes conocimientos para brindar un consejo y tender la mano a quien lo necesita, gracias por su apoyo incondicional, espero nuestra amistad no termine aquí, suerte amigas.

A Luis Manuel Carillo López por ser una persona excepcional, lleno de virtudes que no se encuentran en cualquier persona, agradezco haberte conocido, esperando que como siempre lo he dicho, no importa que tan rápido o que tan lejos nos lleve la vida, siempre estarás presente en mi pensamiento. Animo Luis, acuérdate que la vida no termina en este mundo, échale muchas pero muchas ganas, nunca te rindas ante las adversidades que pudieran venir.

CONTENIDO

Página

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA.....	iv
CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Importancia del cultivo	3
2.2 Clasificación y características generales de la caña de azúcar	4
2.3 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	4
2.5 Biología de las RPCV.....	7
2.6 Interacción microorganismo-planta.....	8
2.7 Mecanismos de acción de las RPCV	9
2.7.1 Síntesis de auxinas.....	9
2.7.2 Solubilización de fosfatos	11
2.8 Análisis de crecimiento.....	12
2.8.1 Índices de eficiencia fisiológica.....	13
Tasa de asimilación neta (TAN)	13
Tasa de crecimiento absoluto (TCA)	14
Tasa de crecimiento relativo (TCR).....	14
III. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos	15
IV. HIPÓTESIS.....	15

V. MATERIALES Y METODOS.....	16
5.1 Fase de laboratorio.....	16
5.1.1 Material microbiológico	16
5.1.2 Caracterización del suelo agrícola experimental	16
5.1.3 Determinación de la producción de indoles totales.....	17
5.1.4 Determinación de solubilización de fosfatos	17
5.2. Fase de invernadero	18
5.2.1 Preparación del sustrato	18
5.2.2 Material vegetal	18
5.2.3 Inoculación.....	18
5.2.4 Variables evaluadas	19
5.3 Diseño experimental y análisis de datos.....	20
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
VII. CONCLUSIONES	44
VIII. BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Características físicas y químicas del suelo agrícola utilizado en la mezcla de sustrato para el crecimiento de plántulas de caña de azúcar inoculadas con RPCV.....	17
Cuadro 2. Producción de indoles totales y solubilización de fosfato de 24 cepas bacterianas inoculadas en caña de azúcar.....	22
Cuadro 3. Altura de plántulas de caña de azúcar inoculadas con 24 RPCV.....	25
Cuadro 4. Diámetro de plántulas de caña de azúcar inoculadas con 24 RPCV.....	26
Cuadro 5. Numero de macollos de plántulas de caña de azúcar inoculadas con 24 RPCV.....	30
Cuadro 6. Área foliar de plántulas de caña de azúcar inoculadas con 24 RPCV.....	31
Cuadro 7. Materia seca aérea de plántulas de caña de azúcar inoculadas con 24 RPCV.....	34
Cuadro 8. Materia seca de raíz de plántulas de caña de azúcar inoculadas con 24 RPCV.....	35
Cuadro 9. Resumen del efecto de las cepas bacterianas sobre las vitroplantas a nivel de invernadero en diferentes variables.....	38
Cuadro 10. Resumen del efecto de las cepas bacterianas sobre las vitroplantas a nivel de invernadero en diferentes variables.....	39
Cuadro 11. Índice de área foliar (IAF) de plántulas de caña de azúcar inoculadas.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cepas bacterianas de RPCV aisladas de cultivos de caña de azúcar en Córdoba, Veracruz, utilizadas para el experimento.....	16
Figura 2. Inoculación de plántulas de caña de azúcar con 24 cepas bacterianas.....	18
Figura 3. Muestreo destructivo quincenal en el que se determinó altura de plántula, diámetro, número de macollos, área foliar, peso de la materia seca de parte aérea y de raíz.....	19
Figura 4. Dinámica de la altura de plántulas de tratamientos destacados y testigo.....	24
Figura 5. Dinámica del diámetro de plántulas de tratamientos destacados y testigo.....	27
Figura 6. Dinámica del número de macollos en tratamientos destacados y el testigo.....	32
Figura 7. Dinámica del área foliar en tratamientos destacados y el testigo.....	32
Figura 8. Dinámica del peso seco aéreo en tratamientos destacados y testigo.....	33
Figura 9. Dinámica del peso seco de raíz en tratamientos destacados y testigo.....	36
Figura 10. Dinámica del Índice del Área Foliar (IAF) en tratamientos destacados y el testigo.....	40
Figura 11. Dinámica de la Tasa de Asimilación Neta (TAN) en tratamientos destacados y el testigo.....	41
Figura 12. Dinámica de la Tasa de Crecimiento Absoluto (TCA) en tratamientos destacados y el testigo.....	42
Figura 13. Dinámica de la Tasa Relativa de Crecimiento (TRC) en tratamientos destacados y el testigo.....	43

I. INTRODUCCIÓN

Las Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (RPCV) o PGPR (del inglés Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), son microorganismos capaces de promover el crecimiento de las plantas a través de diferentes mecanismos como el mejoramiento de la absorción de nutrimentos, el aumento en la movilidad de éstos (Yang *et al.*, 2009), la producción de antibióticos, fijación de nitrógeno, producción de reguladores del crecimiento, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos y control biológico (Bashan y de-Bashan, 2005).

El uso de las RPCV es una alternativa en la nutrición del cultivo de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) ya que es un cultivo de alta demanda de nutrimentos. En México, el cultivo de caña de azúcar requiere altas cantidades de nitrógeno (N) que varían de 120 a 320 kg ha⁻¹ (Caballero-Mellado *et al.*, 1993). En Brasil, el uso de los fertilizantes es menor, y puede oscilar alrededor de los 50 kg ha⁻¹, debido a que normalmente se utilizan RPCV junto con las prácticas de fertilización (Oliveira *et al.*, 2006).

Las RPCV asociadas principalmente a gramíneas son *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* y *A. amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Enterobacter agglomeran*, *E. cloacae*, *Bacillus azotofixans*, *B. polymyxa*, *Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella sp.*, *Azotobacter* y *Pseudomonas* (Loredo *et al.*, 2004).

La respuesta de las plantas a la inoculación con varios microorganismos del suelo ha sido atribuida a la habilidad del inóculo para sintetizar y excretar sustancias en la rizósfera, incluyendo diversos reguladores del crecimiento, tales como auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico (ABA) (Tilak *et al.*, 2006). Se ha encontrado que el 86% de las bacterias aisladas de la rizósfera tienen la capacidad de producir auxinas y otros reguladores de crecimiento, y esta varía grandemente entre especies y cepas de la misma especie, y también es afectada por las condiciones del cultivo, estado de crecimiento y disponibilidad de sustratos, seguido de las diferentes vías de biosíntesis de las auxinas en los microorganismos (Vestergard *et al.*, 2007).

La caña de azúcar se desarrolla en diferentes tipos de suelo, desde arcillosos hasta arenosos, y con pH ácido hasta alcalino, aunque es esta última característica es fundamental para una buena nutrición del cultivo (Blackburn, 1984). En pH extremo, el fósforo reacciona con iones como el calcio, hierro y aluminio, provocando su precipitación o fijación, lo que disminuye su disponibilidad (Fernández *et al.*, 2005).

Por otra parte, los microorganismos pueden participar en la solubilización del fosfato inorgánico y en la mineralización del fosfato orgánico, así como en su inmovilización (Pérez *et al.*, 2007). Entre los mecanismos microbianos para la solubilización del fosfato destacan la actividad de las fosfatasas, así como la síntesis de ácidos orgánicos como el cítrico, butírico, malónico, láctico, succínico, málico, glucónico, entre otros, que son producidos por diversas bacterias conocidas como Bacterias Solubilizadoras de Fosfato (BSP) que permiten la disponibilidad de fósforo para las plantas (Paredes y Espinosa, 2010), lo cual representa una alternativa para producir alimentos e insumos de manera sustentable.

Con la finalidad de implementar técnicas amigables con el ambiente, tendientes a reducir el uso de fertilizantes químicos en el cultivo de caña de azúcar, en esta investigación se evaluó el efecto de 24 cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) en una variedad comercial de caña de azúcar.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del cultivo

Con 53 ingenios azucareros en operación, una producción de más de 46 millones de toneladas y un rendimiento promedio de 65.6 t ha⁻¹ de caña de azúcar para la zafra 2011-2012, México ocupa el séptimo lugar en producción de azúcar, séptimo lugar en consumo de azúcar, quinto lugar en la producción de caña de azúcar, y entre el cuarto y quinto lugar en la producción de azúcar por hectárea. Sin embargo, ocupa el décimo tercer lugar en la relación producción de caña de azúcar por hectárea, en tanto que el primer lugar es ocupado por el Perú con 120 t ha⁻¹ (CONADESUCA, 2012).

La producción de caña de azúcar se registra en 15 estados del país y está distribuida en una superficie de 798 mil hectáreas, se benefician de forma directa 227 municipios. La agroindustria de la caña de azúcar tiene un efecto socioeconómico en 12 millones de personas y la participación de la producción de caña de azúcar en el PIB nacional es de 0.06%. Actualmente en México operan 53 ingenios azucareros, generando 440 mil empleos directos y 2.5 millones de empleos indirectos (Unión Nacional de Cañeros, 2012).

Los estados productores y el número de ingenios que tienen cada uno son: Veracruz (18), Jalisco (6), San Luis Potosí (4), Oaxaca (3), Michoacán (3), Tabasco (3), Sinaloa (3), Chiapas (2), Nayarit (2), Puebla (2), Tamaulipas (2), Morelos (2), Quintana Roo (1), Colima (1) y finalmente Campeche con un ingenio (Unión Nacional de Cañeros, 2012).

Se ha calculado que durante el primer ciclo de cultivo, la caña de azúcar extrae del suelo de 120 a 270 kg de nitrógeno por hectárea, en tanto que en el segundo ciclo esta extracción varía entre 100 a 170 kg ha⁻¹ (Urquiaga y Boddey, 1987). Por otra parte, en México se aplican entre 120 y 320 kg ha⁻¹ de N (Caballero-Mellado *et al.*, 1993). En Brasil, los niveles de fertilización nitrogenada son marcadamente menores y las dosis de fertilización usadas no son mayores de 50 kg ha⁻¹ de N, lo que es suficiente para lograr buenos rendimientos (Oliveira *et al.*, 2006).

2.2 Clasificación y características generales de la caña de azúcar

La caña de azúcar es un miembro de la Clase Liliatae, Orden Poale, Familia Poaceae, presenta las siguientes especies: *Saccharum officinarum* L., *Saccharum robustum* Jesw., *Saccharum spontaneum* L., y *Saccharum barberi* Jesw. (Martín *et al.*, 1987).

La temperatura óptima para la el brote o germinación de las yemas es de 32 a 38°C; el crecimiento óptimo se logra con temperaturas medias diurnas entre 26 y 30°C; la temperatura mínima para un crecimiento vigoroso es aproximadamente de 21°C, aunque para la maduración es conveniente temperaturas relativamente bajas, del orden de 10 a 20°C, ya que esto influye de forma directa en la reducción del ritmo de crecimiento vegetativo y el enriquecimiento de sacarosa en los tallos (Doorenbus *et al.*, 1986).

La duración normal del período vegetativo es generalmente de 15 a 16 meses. El cultivo procede de forma primaria de plantaciones, posteriormente de dos a cuatro cultivos de rebrotes (soca y resoca) y en ciertos casos, llega hasta un máximo de ocho cultivos, tardando cada uno de ellos alrededor de un año en madurar (Salgado, 1994).

Dos de los factores más limitantes para lograr rendimientos máximos en caña de azúcar son las precipitaciones escasas y la baja fertilidad del suelo. Una de las formas para contrarrestar la baja fertilidad es el uso de fertilizantes químicos, aunque para lograr una agricultura sustentable es necesario considerar su impacto en el medio y el alto costo que implica su aplicación en campo, por lo que se hace necesario buscar otras alternativas de fertilización.

2.3 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

Loredo *et al.*, (2004) mencionan que en las últimas décadas, se ha investigado el papel de las bacterias de la rizósfera o rizobacterias de diversas gramíneas como caña de azúcar. Muchas bacterias asociativas son consideradas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV), debido a su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas, a través de diversos mecanismos, como el aporte de nitrógeno por el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico, producción de sustancias reguladoras del crecimiento, solubilización de minerales y

nutrimentos, incremento en el volumen de la raíz, inducción de resistencia sistémica a patógenos, inhibición del crecimiento de organismos antagónicos e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo. Las principales especies bacterianas asociadas con gramíneas son *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* y *A. amazonense*, *Herbaspirillum eropedicae*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Enterobacter agglomerans*, *E. cloacae*, *Bacillus azotofixans*, *B. polymyxa*, *Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella* sp., *Azotobacter* y *Pseudomonas*.

La fijación biológica de nitrógeno es la reacción biológica que compensa la pérdida de éste nutriente de los suelos en los agroecosistemas, la cual es una reducción enzimática del nitrógeno atmosférico (N₂) a amonio, catalizado por la nitrogenasa, siendo este proceso realizado únicamente por bacterias y arqueas. Algunas bacterias que fijan nitrógeno son benéficas para las plantas, ya que poseen otros mecanismos como son la producción de reguladores del crecimiento, solubilización de fosfatos, entre otros, procesos que acarrearán múltiples ventajas a las plantas silvestres o cultivadas. Estas son llamadas Rizobacterias Promotoras del Crecimiento en las Plantas (RPCV), conocidas también PGPR por sus siglas en inglés, las cuales son descritas como de vida libre en el suelo, presentes en la rizósfera, o bien en el rizoplasma, endofíticas o en la filósfera de las plantas, que bajo ciertas condiciones estimulan el crecimiento y desarrollo vegetal (Bashan y de Bashan, 2005).

Los géneros bacterianos aislados en diversas investigaciones y de diversas partes de la planta de caña de azúcar son: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Citrobacter*, *Comamonas*, *Curtobacterium*, *Delftia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Kocuria*, *Lactococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pannonibacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Rhizobium*, *Saccharibacillus*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* y *Zymomonas* (Mehnaz, 2011).

Algunos de los factores que afectan el desempeño de las RPCV son el contenido de nitrógeno en el suelo, el tipo de suelo, la edad o etapa de la planta hospedera y la variedad. En suelos cañeros fertilizados con altas cantidades de fertilizante nitrogenado en forma de amonio, se redujo la colonización de *G. diazotrophicus* y *H.*

seropedicae, observaron un drástico decremento en las poblaciones de *G. diazotrophicus* con la edad de la planta y el genotipo. En algunas variedades de caña se ha reportado cierta persistencia en tiempo y en poblaciones de bacterias endófitas (Reis *et al.*, 2000; Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003).

Diversos estudios demuestran que la fijación simbiótica de nitrógeno es una forma importante de incorporar N atmosférico al tejido vegetal, lo que repercute en una mayor capacidad fotosintética y mejora la producción de los cultivos, y a la fecha se han descubierto otros mecanismos detonados por microorganismos que son benéficos para la planta. Sevilla *et al.* (2001) sugieren que las bacterias fijadoras de nitrógeno, además de contribuir a incorporar este nutrimento de la atmósfera a la planta, también contribuyen a la síntesis de promotores del crecimiento tales como los indoles. De la misma forma, Mehnaz *et al.* (2009) reportaron que la inoculación de plántulas de caña de azúcar propagadas *invitro* con cepas de *Pseudomonas fluorescence* y *P. putida* (bacterias que promueven la síntesis de ácido indolacético), incrementó la producción de biomasa en estas plántulas.

Las RPCV suelen usarse en la inoculación de cultivos de forma individual o en forma de consorcios. Govindarajan *et al.* (2008) utilizaron un consorcio de aislados bacterianos, los cuales inocularon en caña de azúcar, obteniendo como resultado un sinergismo en cuanto a crecimiento y desarrollo del cultivo. Sin embargo, Govindarajan *et al.* (2006) utilizaron un consorcio de *G. diazotrophicus* LMG7603, *A. amazonense* y *Burkholderia* sp., obteniendo un menor rendimiento, comparado con el resultado encontrado en la inoculación individual de *B. vietnamiensis* MG43 y *G. diazotrophicus* LMG7603, lo que pone de manifiesto que es necesario probar de manera individual tanto inoculaciones de cepas simples como de consorcios, pues cada uno tiene respuestas diferentes.

2.5 Biología de las RPCV

La rizósfera influye de forma directa en la biomasa microbiana y determina la biodiversidad mediante los cambios físicos, químicos o biológicos que ocurren en la misma, debido a las secreciones orgánicas y restos de las raíces de las plantas (Badalucco y Kuikman, 2001). La activación de ciertos genes en las plantas juega un papel determinante en la interacción simbiótica o asimbiótica con los microorganismos, ya que afecta la colonización de las raíces por las bacterias introducidas, así como el tamaño total de las poblaciones microbianas en la planta y su composición de las mismas (Smith y Goodman, 1999).

La fauna del suelo tiene una función importante en los procesos microbianos de la rizósfera y por tanto el efecto en el crecimiento de la planta (Bonkowski *et al.*, 2000). Los protozoarios son componentes esenciales del ecosistema del suelo y consumen en general más del 50% de la producción bacteriana, mejorando los ciclos de los nutrientes y el flujo de energía en beneficio de los microorganismos, plantas y animales (Foissner, 1999). Existen alrededor de 1600 especies conocidas de protozoarios que viven en el medio terrestre y representan alrededor del 20 a 30% del total de especies presentes, pero hasta el momento no han sido descritas en su totalidad (Ronn *et al.*, 2002).

Las propiedades físicas y química del suelo (pH, humedad, disponibilidad de agua, temperatura, potencial oxido-reducción, salinidad, textura, estabilidad de agregados, fertilidad y contenido de materia orgánica), la presencia o ausencia de pesticidas, sustancias xenobióticas, y de otros factores abióticos, afectan de forma directa o indirecta el crecimiento de las plantas y su interacción con la microflora y fauna del suelo. Los factores abióticos pueden influir de forma directa con la actividad de las RPCV y la dinámica de las comunidades microbianas de la raíz (Duffy y Défago, 1999).

Algunas RPCV que se encuentran bajo condiciones de estrés, como sequía o ausencia de nutrientes, forman estructuras de resistencia, tales como esporas (*Bacillus*) y quistes (*Azotobacter*, *Derxia* y *Azomonas*). En *Azospirillum* se ha encontrado la formación de una estructura similar a un quiste, que permite que esta bacteria se encapsule y sobreviva en condiciones de sequías y de altas temperaturas (Elmerich *et al.*, 1992).

Redondo-Nieto *et al.* (2011) encontraron en el genoma de una cepa de *Pseudomonas fluorescens*, diversas islas génicas y genes que podrían contribuir a la adaptación de esta bacteria al ambiente de la rizósfera. Se encontraron genes necesarios para la desnitrificación, que permiten crecer a la bacteria de forma anaerobia, utilizando nitrato y nitrito como aceptor final de los electrones; además dos sistemas de secreción tipo III, uno de ellos con homología con patógenos de animales; también dos sistemas de secreción tipo VI, similares a los presentes en bacterias patógenas y un segundo aparato flagelar, que parece ser importante en la colonización.

Es necesaria una comprensión profunda de los mecanismos de acción de las RPCV, ya que es fundamental para la manipulación de la rizósfera, con el fin de maximizar el proceso dentro del sistema que influye en gran medida a la productividad de las plantas en diferentes agroecosistemas, mecanismos que pueden ser directos e indirectos.

2.6 Interacción microorganismo-planta

La interacción microorganismo-planta depende del establecimiento de una exitosa colonización radical, la cual es un requisito previo indispensable para que el microorganismo tenga algún efecto en el hospedante. La interacción involucra los siguientes pasos: a) la bacteria detecta las raíces y se moviliza a la rizósfera debido al fenómeno quimiotáxico, es decir, hacia productos excretados por las raíces (Fedi *et al.*, 1992); b) la bacteria se adhiere a las raíces, ya que en estas existen receptores, como manosa y fructosa, azúcares a los que ciertas RPCV muestran afinidad (Korhonen *et al.*, 1986); c) la bacteria invade los espacios intercelulares o en el interior de las células donde son capaces de utilizar algún exudado de la planta. Mediante esta interacción se puede prever el establecimiento de algún microorganismo, cuyo efecto posterior en la planta estaría dado por la excreción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos (Michiels *et al.*, 1989), o por algún otro mecanismo como la antibiosis, en el cual una o más especies resultan dañadas debido a la secreción de sustancias que inhiben su crecimiento. La antibiosis puede entenderse como un mecanismo para eliminar la competencia por los nutrimentos con otras especies. Este fenómeno es bastante común en la naturaleza,

donde muchas especies han desarrollado la capacidad para producir antibióticos (Bradshaw, 1976).

Diversos estudios han demostrado la presencia de sustancias biológicamente activas en medio de cultivo puro, pero no en el suelo. La respuesta de las plantas a la inoculación con varios microorganismos del suelo ha sido atribuida a la habilidad del inóculo para excretar sustancias orgánicas en la rizósfera. Durante las pasadas dos décadas, el término de reguladores de crecimiento de las plantas fue usado para abarcar algunas sustancias activas.

2.7 Mecanismos de acción de las RPCV

2.7.1 Síntesis de auxinas

La síntesis de reguladores del crecimiento es una de las principales formas en las que una bacteria interacciona sobre las plantas, ya que estimulan el crecimiento, desarrollo y productividad de las mismas (Narula *et al.*, 2006). Los reguladores del crecimiento de las plantas, son sustancias orgánicas, que influyen en sus procesos fisiológicos y se encuentran a muy bajas concentraciones (por lo general en intervalos de 10^{-6} a 10^{-8} mol L⁻¹). Los microorganismos del suelo producen diversas sustancias que actúan como reguladores de crecimiento en las plantas, tales como auxinas, giberelinas, citocininas, etileno y ácido abscísico (ABA) (Saraf *et al.*, 2011).

Las auxinas fueron de las primeras fitohormonas reconocidas y detectadas químicamente. Se han reportado diversos compuestos indólicos y derivados fenilacéticos con actividad auxínica, entre ellos se tiene el ácido indol-3-acético (AIA), considerado como la auxina fisiológicamente más activa en las plantas, ya que están involucradas en una gran variedad de respuestas en el desarrollo y crecimiento de éstas. Actualmente diversas auxinas sintéticas son usadas en aplicaciones comerciales (Frankenberg y Arshad, 1995).

Diversos microorganismos del suelo son capaces de producir auxinas fisiológicamente activas, que pueden o no tener efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los microorganismos liberan auxinas como metabolitos secundarios a causa del suministro rico en nutrientes liberados por la raíz (Brown, 1972). Se ha encontrado que el 86% de las bacterias aisladas de la rizósfera de diferentes plantas, producen auxinas y otros reguladores de crecimiento, y esto

varía grandemente entre especies y cepas de la misma especie, y también es influenciado por las condiciones del cultivo, estado de crecimiento y disponibilidad de sustratos. En condiciones *in vitro*, se ha observado que algunos cultivos microbianos pueden producir pequeñas cantidades de AIA en ausencia de un precursor fisiológico. Sin embargo, en presencia de triptófano como precursor, la microbiota muchas veces libera grandes cantidades de AIA y otros derivados indólicos (Barea *et al.*, 1976).

Se considera que existen varias rutas de síntesis de auxinas a partir del triptófano, como son la vía del indol-3-pirúvico (AIP), la vía indol-3-acetamida (AIM), y la vía de la triptamina (Tam) (Jankiewicz y Acosta-Zamudio, 2003) y por medio de la enzima triptofanasa que hidroliza y desamina al triptófano para convertirlo en indol, ácido pirúvico y amonio (Watanabe y Snell, 1972), siendo las formas más conocidas de síntesis. Sin embargo, éstas no son las únicas formas ya que se conocen algunos géneros de bacterias que aun en ausencia total del triptófano siguen sintetizando estos metabolitos debido a que el amonio actúa como precursor directo para la síntesis (Merzaeva y Shirokikh, 2010).

Las fitohormonas (síntesis endógena) o reguladores del crecimiento (síntesis exógena), son sustancias que promueven el crecimiento, desarrollo y estimulan el potencial genético de los cultivos. Sin embargo, la concentración de estos compuestos es crucial para causar dichos beneficios o bien para causar efectos adversos y se ha demostrado que bajas concentraciones de fitohormonas son capaces de estimular el desarrollo vegetal pero a concentraciones altas inhiben y reducen la zona de alargamiento radicular (Yahalomet *et al.*, 1991). En algunos otros casos se ha reportado que altas concentraciones deforman la raíz, provocando un efecto negativo en el crecimiento (Felici *et al.*, 2008).

Se han encontrado diversas bacterias capaces de sintetizar AIA en diversas partes de las plantas, y pueden ser benéficas o patógenas. Dentro de las benéficas se encuentran los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Acetobacter*, *Xhantomonas* y dentro de las patógenas, se tiene a *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas syringae* y *P. savastanoi* (Jha *et al.*, 2009; Patten y Glick, 1996).

2.7.2 Solubilización de fosfatos

El fósforo es un nutriente del suelo, esencial para las plantas ya que es necesario para completar su ciclo de vida y expresar su potencial genético. De la misma manera en los microorganismos del suelo, este elemento tiene como principal función la de participar en la liberación y acumulación de energía en el metabolismo celular (Coyne, 2000). Sin embargo la forma soluble de fósforo (forma aprovechable de las plantas) se encuentra muy limitada (0.1 a 1 kg ha⁻¹) en la mayoría de los ecosistemas agrícolas (Thompson *et al.*, 1993). Los bajos índices de este nutriente, se deben a que el fósforo soluble reacciona con iones como el calcio, hierro y aluminio, provocando su precipitación o fijación, disminuyendo así su disponibilidad (Fernández *et al.*, 2005).

En el suelo, el fósforo se encuentra en forma orgánica e inorgánica. La primera forma proviene de la degradación microbiana de restos vegetales y animales, formando compuestos como fosfatos de inositol y ácidos nucleicos, por lo que del fósforo total, el orgánico varía entre el 3 y 85% (Arzuaga *et al.*, 2005). En lo que respecta al fósforo inorgánico, éste se encuentra en la parte mineral en forma de ortofosfatos derivados del ácido fosfórico (H₃PO₄), Ca⁺⁺ y Al⁺⁺, los cuales se pueden encontrar en forma de sales en solución, sales cristalinas o sales absorbidas por los coloides del suelo (Tsai y Rosseto, 1992). La mineralización (conversión microbiana de fósforo orgánico a inorgánico) es fundamental para la disposición del mineral para las plantas (Picone y Zamuner, 2002).

Los microorganismos participan en la solubilización del fosfato inorgánico y en la mineralización del fosfato orgánico, así como en su inmovilización (Richardson, 1994).

La fitasa y fosfatasa son enzimas muy estudiadas y producidas por diversas bacterias conocidas como Bacterias Solubilizadoras de Fosfato (BSP), las cuales hidrolizan los enlaces orgánicos fosfatados liberando aniones fosfato a la solución del suelo (Jha *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2007).

La producción de ácidos orgánicos es otra forma típica de solubilización de fosfatos por parte de las BSP, y los más conocidos son los ácidos glucónico, cítrico, láctico y succínico (Hariprasad y Niranjana, 2009). Otros no tan conocidos son el malónico,

oxalacético, acético, fórmico, isovalérico, fumárico, glicólico, adíptico, indolacético, butírico, e isobtírico (Paredes-Mendoza y Espinoza-Victoria, 2010), los cuales liberan a los fosfatos de cationes como el Ca^{++} , Fe^{++} y Al^{++} (Hariprasad y Niranjana, 2009).

Existen diversos géneros bacterianos benéficos y patógenos a los cultivos, con capacidad de solubilizar fosfatos, por medio de producción de ácidos orgánicos, tales como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Flavobacterium*, y *Erwinia* (Díaz *et al.*, 2001; Trivedi y Sat, 2008).

2.8 Análisis de crecimiento

Para determinar el crecimiento de una planta de forma cuantitativa, es necesario medir de periódicamente una serie de variables, que en su conjunto se conoce como “Análisis de Crecimiento” (Hunt, 1982). El estudio detallado del crecimiento de las plantas permite cuantificar los diferentes aspectos del mismo; la duración del ciclo, definición de etapas de desarrollo, distribución de fotoasimilados y biomasa por órgano y por cultivo. Los análisis de crecimiento son básicos para comprender los procesos fisiológicos que determinan la producción vegetal (Escalante y Kohashi, 1993).

El área foliar es la medida usual del aparato fotosintético de una planta; su tamaño y duración está relacionado de forma directa con el rendimiento ya que a mayor crecimiento del dosel vegetal asegura una mayor intercepción de luz, por lo que se incrementa la fotosíntesis y por ende la producción de biomasa (Escalante-Estrada, 1999). La acumulación de materia por planta principalmente depende de tres factores que son el índice del área foliar (IAF), duración del área foliar (DAF) y la tasa de asimilación neta (TAN) (Escalante y Kohashi, 1982). Para estimar los índices de eficiencia en el crecimiento de las plantas, es necesario obtener el peso seco de las plantas de la parte aérea y el área foliar en intervalos de tiempo durante el desarrollo del vegetal (Hunt, 1981; Beadle, 1988).

El área foliar se describe como la suma de las superficies de todas las hojas de la planta, ya que las hojas y en especial la lámina foliar son la parte fundamental del aparato fotosintético más importante, ya que del tamaño y su duración de éste, dependen el crecimiento y el rendimiento de las plantas (Plenet *et al.*, 2000). El área foliar es utilizada para denotar la magnitud de la maquinaria fotosintética, la cual se considera como la principal fuente de órganos vegetativos y reproductivos en crecimiento (Navarro, 1996). A mayor crecimiento de dosel se garantiza una mayor interceptación de luz, lo que incrementará la fotosíntesis y producción de biomasa (Escalante-Estrada, 1999).

2.8.1 Índices de eficiencia fisiológica

El crecimiento en las plantas también puede ser analizado por índices de eficiencia fisiológica del crecimiento, y puede realizarse en plantas individuales y en comunidades vegetales (Hunt, 1978).

Tasa de asimilación neta (TAN)

La Tasa de Asimilación Neta se define como la tasa de incremento en el peso de la planta por unidad de área foliar (se expresa en $\text{g m}^{-2} \text{ día}^{-1}$) (Poorter y Remkes, 1990); es decir, es la tasa de acumulación de materia seca por unidad de área foliar por unidad de tiempo. La TAN es alta cuando las plantas son pequeñas y la mayoría de las hojas están expuestas a la luz solar directa. A medida que el cultivo crece y el índice de área foliar se incrementa, más y más hojas comienzan a sombrearse, causando una disminución de la TAN a medida que la estación de crecimiento progresa.

Tasa de crecimiento absoluto (TCA)

Se refiere al incremento en peso seco de la planta por unidad de tiempo (expresado en g dia^{-1}). La variación continua del peso durante cierto periodo de tiempo, es una condición fundamental para utilizar este concepto (Escalante y Kohashi, 1993). Este índice está en función de la cantidad de material en crecimiento presente y de la tasa de crecimiento *per se*. Al inicio del desarrollo existe un periodo en el que este índice es cada vez mayor, y posteriormente se mantiene casi constante y luego comienza a disminuir, de tal forma que al final el índice se vuelve negativo porque la muerte de las hojas es superior al crecimiento nuevo (Milthorpe y Moorby, 1982).

Tasa de crecimiento relativo (TCR)

Este índice expresa la eficiencia de la planta para producir nuevo material en un periodo determinado de tiempo, es decir, el incremento de materia seca por unidad de materia seca presente por unidad de tiempo y se expresa comúnmente en $\text{g g}^{-1} \text{dia}^{-1}$ y se debe calcular para un intervalo de tiempo (Escalante y Kohashi, 1993).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la inoculación de 24 cepas rizobacterianas promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) en la variedad comercial Mex 69-290 de caña de azúcar.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la producción de indoles totales y la solubilización de fosfatos en los aislamientos bacterianos.
- Evaluar la producción de biomasa inducida por las bacterias inoculadas.
- Realizar un análisis de crecimiento de plántulas de caña de azúcar a los dos meses de la inoculación.

IV. HIPÓTESIS

- ▶ El crecimiento de las plántulas de caña de azúcar, está relacionado directamente con la producción de indoles de las 24 cepas bacterianas y su capacidad para solubilizar fosfato.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Fase de laboratorio

5.1.1 Material microbiológico

Esta investigación se encuentra adscrita a la Línea Prioritaria de Investigación 5 (LPI-5), Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal, para este experimento, se utilizaron 24 cepas de rizobacterias aisladas de caña de azúcar, que pertenecen a la Colección Microbiana del Laboratorio de Interacción Molecular Planta-Microorganismo del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. Las cepas fueron previamente identificadas y pertenecen a las especies: *Aeromonas salmonicida*, *Burkholderia cepacia*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas* sp., *Shewanella putrefaciens*, *Sphingomonas paucimobilis* y *Stenotrophomonas maltophilia*. La colección se muestra en la Figura 1.

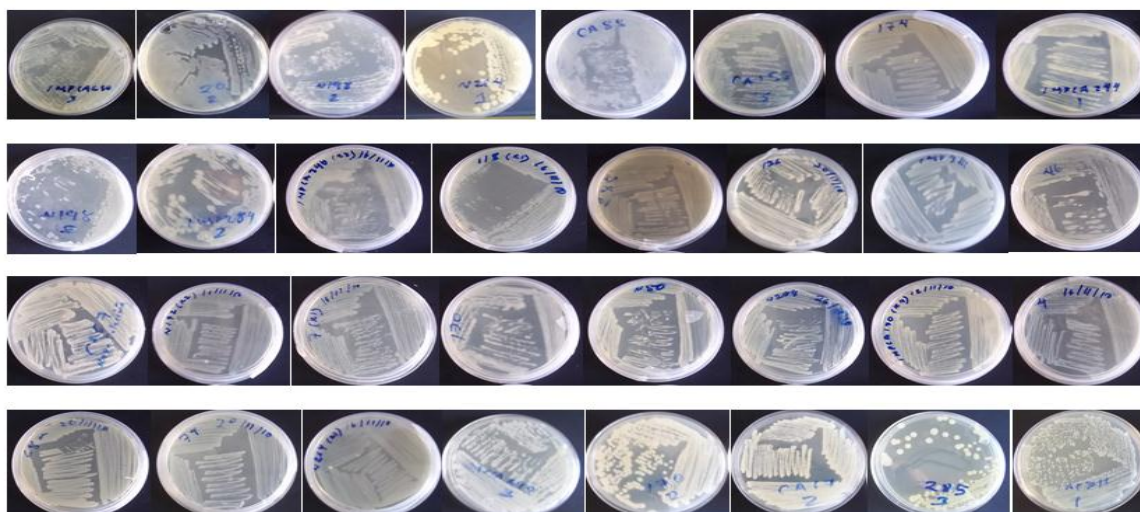


Figura 1. Cepas bacterianas de RPCV aisladas de cultivos de caña de azúcar en Córdoba, Veracruz, utilizadas para el experimento.

5.1.2 Caracterización del suelo agrícola experimental

Para probar el efecto de las rizobacterias en el crecimiento vegetal se utilizó un suelo agrícola proveniente de la misma región productora de caña de azúcar donde fueron aisladas las bacterias originalmente. Este suelo fue caracterizado en el Laboratorio de Nutrición Vegetal “Salvador Alcalde Blanco” del Colegio de Postgraduados. Las características encontradas se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Características físicas y químicas del suelo agrícola utilizado en la mezcla de sustrato para el crecimiento de plántulas de caña de azúcar inoculadas con RPCV.

Muestra	Textura	MO (%)	pH	Nt (%)	Pe ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ki ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Suelo agrícola	Arcilloso	0.41	5.8	0.042	107.82	123.04

MO: Materia Orgánica; pH: Potencial Hidrogeno; Nt: Nitrógeno total; Pe: Fósforo extractable; Ki: Potasio intercambiable.

5.1.3 Determinación de la producción de indoles totales

La producción de indoles totales en las cepas bacterianas fue estimada a partir de la inoculación de una suspensión (10% v/v) en medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB) suplementado con triptófano (0.1 g L^{-1}). Los cultivos fueron incubados a 28°C por 48 h y después fueron centrifugados a 5000 revoluciones por min (rpm) por 10 min. La concentración de indoles totales fue estimada del sobrenadante del medio de cultivo, usando como revelador el reactivo Salkowski (600 mL de H_2SO_4 18 M, 4.5 g de FeCl_3 anhidro aforado a 1 L con agua destilada), en una relación 1:1. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 min, luego se leyó la absorbancia a 530 nm en un espectrofotómetro (Genesys 20-Thermospectronic, Madison, WI, EEUU).

5.1.4 Determinación de solubilización de fosfatos

Las cepas bacterianas fueron cultivadas en 50 mL del medio Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) e incubados a 28°C en agitación (160 rpm) por 5 días. Pasado este tiempo, los medios fueron centrifugados por 15 min a 5000 rpm, se tomó 1 mL del sobrenadante, y se le adicionaron 3 mL de agua destilada y 1 mL del reactivo nitrovanadato-molibdato (complejo amarillo). Después de 20 min de incubación se leyó la absorbancia a 470 nm. La solubilización de fosfatos, en término de la concentración de fosfatos solubles en el medio fue determinada usando una curva estándar de KH_2PO_4 .

5.2. Fase de invernadero

5.2.1 Preparación del sustrato

Para este ensayo de inoculación de plántulas de caña de azúcar con las cepas bacterianas seleccionadas, se utilizó como sustrato suelo agrícola combinado con agrolita en la proporción 1:1. El suelo se colectó en las parcelas agrícolas del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Veracruz. El suelo se secó a temperatura ambiente y a la sombra, posteriormente fue tamizado con malla 2.0 mm para ser esterilizado en autoclave (3 veces a 15 atmósferas, durante 15 minutos cada vez), posteriormente se llenaron macetas de poliestireno extendido con 250 mL de suelo estéril en combinación con 250 mL de agrolita estéril.

5.2.2 Material vegetal

Para el bioensayo se utilizaron plántulas de caña de azúcar de la variedad Mex 69-290 producidas *invitro*, las cuales tenían una edad de 25 días. Las plántulas se obtuvieron del Laboratorio de Biotecnología del Ingenio Motzorongo en el estado de Veracruz.

5.2.3 Inoculación

Las 24 cepas fueron incubadas por separado en caldo nutritivo a 32°C en agitación (220 rpm) por 24 h. Se utilizaron diluciones seriadas con base en 10, se diluyó 1 mL del cultivo bacteriano en 9 mL de agua estéril, hasta alcanzar una concentración de 1×10^7 UFC.

Se inoculó 1.0 mL de cultivo bacteriano (1×10^7 UFC) por maceta (Okon y Labyera, 1994). Las macetas fueron ubicadas en los invernaderos del Programa de Edafología del Colegio de Postgraduados, como se muestra en la Figura 2.

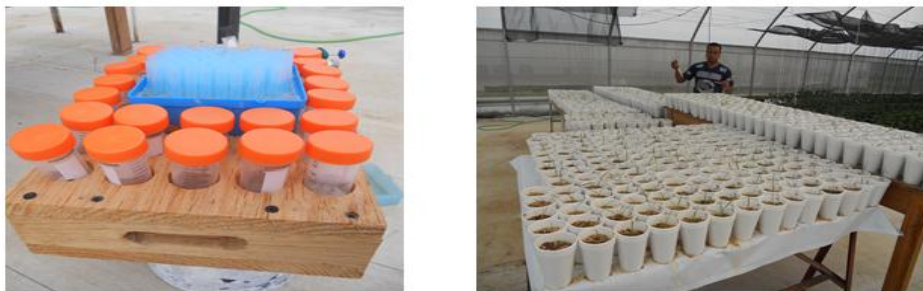


Figura 2. Inoculación de plántulas de caña de azúcar con 24 cepas bacterianas.

5.2.4 Variables evaluadas

La toma de datos de las diferentes variables en las plántulas de caña de azúcar se realizó a los 15, 30, 45, 60 y 75 días después de la inoculación (DDI). Los muestreos fueron destructivos (Figura 3); para ello se tomaron cinco plantas de cada repetición, para medir altura, diámetro de tallo, número de macollos, área foliar, materia seca de la parte aérea y radical estas dos últimas en un integrador de área y una estufa de aire circulante a 70 °C por 72 h, respectivamente.



Figura 3. Muestreo destructivo quincenal en el que se determinó altura de plántula, diámetro, número de macollos, área foliar, peso de la materia seca de parte aérea y de raíz.

Para evaluar la eficiencia fisiológica de las plántulas, con los datos de cada muestreo se estimó la tasa de asimilación neta (TAN), tasa de crecimiento relativo (TCR), tasa de crecimiento absoluto (TCA) e índice de área foliar (IAF).

5.3 Diseño experimental y análisis de datos

El estudio se realizó bajo un diseño experimental completamente al azar, con 24 tratamientos, un testigo no inoculado y 5 repeticiones en cada tratamiento.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza y a una prueba de comparación de medias del tipo LSD ($P \leq 0.05$), utilizando el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System, 2007) para todas las variables. Para el caso de estimaciones en el análisis de crecimiento, se hicieron transformaciones logarítmicas para hacer las respectivas pruebas de comparación de medias.

El índice de área foliar (IAF) se obtuvo a partir de la siguiente relación: $IAF = (AF/NP) * DP / 10000 \text{ m}^2$, donde AF es el área foliar (cm^2), NP es el número de plantas muestreadas y DP es el número de plantas por m^2 . También se calculó la tasa de asimilación neta (TAN), la tasa relativa de crecimiento (TRC) y la tasa absoluta de crecimiento (TAC) mediante las siguientes ecuaciones: $TAN = [(PS_2 - PS_1) / (AF_2 - AF_1)] / [(\ln AF_2 - \ln AF_1) / (T_2 - T_1)]$, $TRC = (\ln PS_2 - \ln PS_1) / (T_2 - T_1)$ y $TAC = (PS_2 - PS_1) / (T_2 - T_1)$; donde PS_2 y PS_1 son el peso de la materia seca de la planta en los tiempos 2 y 1 (T_2 y T_1), $\ln AF_2$ y $\ln AF_1$ son el logaritmo natural del área foliar en dos tiempos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 2 se muestra la producción de indoles totales de las 24 cepas bacterianas empleadas. Los valores van desde el 0 hasta $117 \mu\text{g mL}^{-1}$ de indoles totales, que correspondieron a las especies (tratamiento) *Stenotrophomonas maltophilia* (T9) y *Pseudomonas luteola* (T1), respectivamente. Los valores más altos son indicadores importantes que sobrepasan los valores de producción de indoles totales reportados en otras investigaciones (Anuj *et al.*, 2011 y Carcaño *et al.*, 2006). Las bacterias *Pseudomonas luteola* (T1), *Ochrobactrum anthropi* (T5) y *Ochrobactrum anthropi* (T19) son las que presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) con respecto a las 21 cepas restantes.

En cuanto a la solubilización de fosfatos, expresada como fosfatos solubles, dentro de las 24 cepas se encontraron valores que van desde 0.13 hasta $222.43 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Cuadro 2) que correspondieron a las bacterias *Pseudomonas fluorescens* (T10) y *Stenotrophomonas maltophilia* (T11), respectivamente. Las bacterias *Stenotrophomonas maltophilia* (T11) y *Stenotrophomonas maltophilia* (T24) son las que presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) con respecto a las 22 cepas restantes, con las medias más altas.

Cuadro 2. Producción de indoles totales y solubilización de fosfato de 24 cepas bacterianas inoculadas en caña de azúcar.

T	Especie bacteriana	[Indoles totales] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Fosfato soluble ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	<i>Pseudomonas luteola</i>	117.34 a	0.37 d
2	<i>Shewanella putrefaciens group</i>	19.82 ef	1.35 d
3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	8.79 ghij	0.13 d
4	<i>Shewanella putrefaciens group</i>	7.44 ghijk	8.21 cd
5	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	115.70 a	24.75 cd
6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	6.34 hijk	5.67 cd
7	<i>Pseudomonas luteola</i>	10.19 ghi	16.33 cd
8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	30.96 d	12.53 cd
9	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.11 k	0.43 d
10	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5.19 ijk	0.13 d
11	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	15.13 fg	222.43 a
12	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1.45 jk	30.68 bc
13	<i>Burkholderia cepacia</i>	13.53 fgh	1.57 d
14	<i>Shewanella putrefaciens group</i>	111.15 ab	0.48 d
15	<i>Aeromonas salmonicida</i>	30.26 d	14.83 cd
16	<i>Burkholderia cepacia</i>	11.39 ghi	1.69 d
17	<i>Pseudomonas luteola</i>	9.09 ghij	5.38 cd
18	<i>Shewanella putrefaciens group</i>	74.95 c	1.75 d
19	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	116.69 a	16.28 cd
20	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	12.63 fghi	1.69 d
21	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	32.66 d	0.48 d
22	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	106.11 b	56.79 b
23	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	27.36 de	1.18 d
24	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	11.98 fghi	216.38 a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (LSD; $P \leq 0.05$).
T: tratamiento.

El cultivo de caña de azúcar se encuentra distribuido en su mayor parte de superficie en suelos donde predomina el pH ácido, por lo que es común observar serias limitaciones de abastecimiento de fósforo disponible para el cultivo y de ahí la importancia de las bacterias capaces de solubilizar formas insolubles de P,

presentes en suelos con pH menor a 5.8. Respecto a indoles totales, éstas son fitohormonas determinantes en el cultivo de la caña de azúcar dado que promueve el crecimiento y el desarrollo de las plantas, razón por lo que las RPCV son fundamentales para lograr resultados óptimos.

Diversos microorganismos llevan a cabo síntesis *invitro* de indoles y otros reguladores del crecimiento fisiológicamente activos, derivados del triptófano (Glickmann y Dessaux, 1995). La producción de indoles totales por parte de un microorganismo depende de diversos factores como cepa bacteriana, planta hospedera, condiciones de cultivo del hospedero, etapas de desarrollo del cultivo y concentración de sustrato que tenga el microorganismo para dicha síntesis (Barea *et al.*, 1976).

De los reguladores de crecimiento producidos por bacterias, el ácido indol acético (forma parte de los indoles totales) es de los más importantes ya que es el más ampliamente distribuido en los cultivos, regula diversos procesos en el desarrollo, causando cambios morfológicos en la raíz y se le relaciona directamente con la absorción de minerales (Dobbelaere *et al.*, 2002).

En el Cuadro 3 se observa que las plántulas inoculadas con *Pseudomonas luteola* (T17), *Aeromonas salmonicida* (T15), *Stenotrophomonas maltophilia* (T3) y *Stenotrophomonas maltophilia* (T24), presentaron diferencias estadísticamente significativas y superiores en cuanto altura, con respecto a los demás tratamientos para las fechas de muestreo 2, 3, 4 y 5, es decir a los 30, 45, 60 y 75 DDI, respectivamente. Estas especies presentaron una producción de indoles totales de 9.093, 30.265, 8.793 y 11.989 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Para el caso de solubilización de fosfatos, presentaron valores de 5.38, 14.83, 0.13 y 216.38 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de fosfato soluble, para cada una de las cuatro cepas citadas con anterioridad, respectivamente. Se puede observar que la altura no está relacionada de forma directa con la cantidad de indoles y fosfatos solubles sintetizados y producidos por parte de las cepas, aunque se observa que las que causaron efectos en mayor altura, fueron las cepas que sintetizaron indoles totales por debajo de 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

En diversos estudios realizados en caña de azúcar con nutrimentos limitados, se ha logrado evitar la caída del rendimiento e incluso se ha incrementado. Por ejemplo, Boddey *et al.* (1995) inocularon plantas de caña de azúcar con organismos

benéficos fijadores de nitrógeno y suministraron todos los nutrientes a excepción de nitrógeno, con lo que obtuvieron un incremento de 170 a 230 t ha⁻¹ en el primer año y el incremento se mantuvo en los tres años siguientes. Con esta investigación se corroboró que el 60 a 80% de nitrógeno acumulado, fue resultado de la fijación biológica de nitrógeno.

En cuanto a diámetro del tallo (Cuadro 4), a los 30 y 45 DDI, las especies *Pseudomonas luteola* (T17) y *Stenotrophomonas maltophilia* (T24) fueron las que presentaron medias superiores estadísticamente diferentes, con respecto al resto de tratamientos. A los 60 y 75 DDI, las especies *Sphingomonas paucimobilis* (T23) y *Stenotrophomonas maltophilia* (T20) ocasionaron los mayores valores de diámetro con respecto a las otras cepas, sintetizando 27.369 y 12.638 µg mL⁻¹ de indoles totales, respectivamente. Con respecto al fosfato soluble, las mismas especies presentaron valores de 1.18 y 1.69 µg mL⁻¹. Nuevamente se observa que no necesariamente las bacterias que presentaron los valores más altos de síntesis de indoles totales y solubilización de fosfatos, son los que inducen un mayor diámetro de tallo en las plantas.

En la Figura 4, se muestran los tratamientos que causaron efectos significativos superiores en diversas fechas evaluadas, comparadas con el T25 (testigo) donde se observa que en las primeras fechas el testigo no se diferencia en gran medida a los tratamientos.

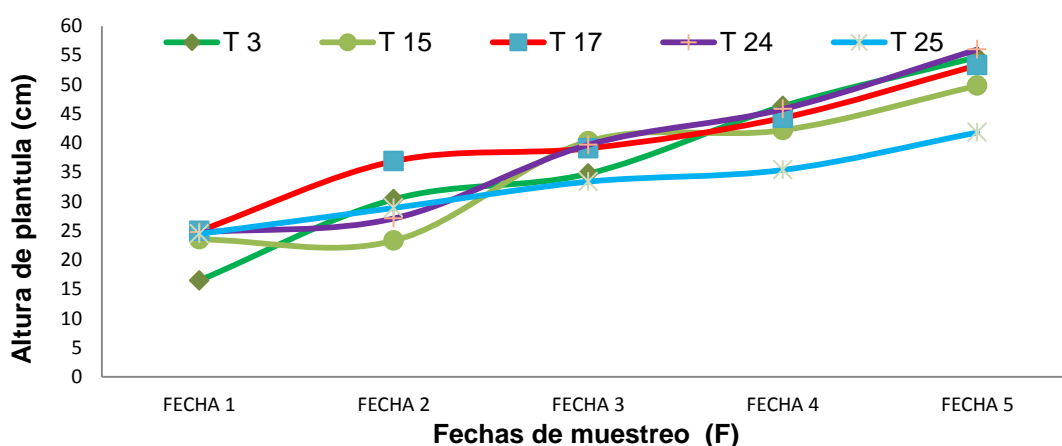


Figura 4. Dinámica de la altura de plántulas de tratamientos destacados y testigo. Fecha 1: 15 DDI; Fecha 2: 30 DDI; Fecha 3: 45DDI; Fecha 4: 60 DDI; Fecha 5: 75 DDI.

Sin embargo, con el paso del tiempo, el T25 (testigo sin inoculante) se vuelve inferior con respecto a las plantas inoculadas.

Cuadro 3. Altura de plántulas de caña de azúcar inoculadas con 24 RPCV.

Altura (cm)					
T	F1 (*)	F2 (*)	F3 (*)	F4 (*)	F5 (*)
T1	23.9abc	33.2b	34.5defg	44.7abcd	52.0bcde
T2	19.1bc	31.5bcde	31.7g	42.9bcdefgh	51.6bcde
T3	16.5c	30.4cdef	34.8def	46.3a	54.7ab
T4	22.9abc	24.3kl	38.8abc	40.8fgh	50.8cde
T5	17.9bc	29.3efghi	39.1ab	43.4abcdefg	50.5cde
T6	17.9bc	25.9jk	33.7fg	40.7gh	49.9cde
T7	21.8abc	28.9fghi	34.6defg	44.3abcde	53.7abc
T8	22.2abc	28.2fghij	37.4abcd	41.5efgh	49.5e
T9	22.3abc	30.6cdef	37.2bcde	42.3cdefgh	51.9bcde
T10	25.1ab	31.4bcde	37.4abcd	42.6cdefgh	52.1bcde
T11	22.1abc	29.9cdefg	33.5fg	44.1abcde	51.4bcde
T12	24.0abc	32.1bc	33.8fg	43.7abcdefg	50.7cde
T13	23.6abc	33.6b	38.6abc	42.0defgh	51.2bcde
T14	23.1abc	28.3fghij	35.9cdef	42.9bcdefgh	53.0abcde
T15	23.5abc	23.3l	40.3a	42.2defgh	49.8de
T16	29.5a	33.2b	33.7fg	41.7defgh	51.5bcde
T17	25.0ab	36.9a	39.1ab	44.3abcde	53.3abcd
T18	24.1abc	29.4defgh	33.7fg	42.2defgh	52.5abcde
T19	21.0bc	31.8bcd	33.0fg	40.2h	49.5e
T20	22.4abc	28.7fghi	34.8def	41.3efgh	52.6abcde
T21	24.4abc	27.7ghij	37.0bcde	45.3abc	51.3bcde
T22	24.7ab	30.2cdef	38.4abc	44.0abcde	54.9ab
T23	25.1ab	26.9ij	34.3efg	43.8abcdef	52.8abcde
T24	24.7ab	27.1hij	39.7ab	45.8ab	56.0a
T25	24.5abc	28.9fghi	33.4fg	35.4i	41.8f

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (LSD; $P \leq 0.05$). F1, F2, F3, F4 y F5, son las diferentes fechas de muestreo, el muestreo fue quincenal NS y (*), son diferencias estadísticas No Significativas y Significativas entre tratamientos de las diferentes fechas, respectivamente. T25: Control (sin inoculación).

Cuadro 4. Diámetro de plántulas de caña de azúcar inoculadas con 24 RPCV.

Diámetro de tallo (mm)					
T	F1 (*)	F2 (*)	F3 (*)	F4 (*)	F5 (*)
T1	3.3ab	3.3bcde	4.0def	4.0h	4.9lm
T2	2.4bcdef	3.0hij	3.6ghijk	4.3gh	4.7m
T3	1.7f	3.2bcdefg	3.5ijkl	5.1abcd	5.8defg
T4	2.9abcd	2.9ij	3.9efg	4.7def	5.8defgh
T5	1.8ef	2.9ijk	4.0bcde	4.5efg	5.4ghijk
T6	2.3cdef	2.9ijk	3.5hijkl	4.5efg	5.3ijkl
T7	2.6abcdef	2.8jkl	3.4kl	5.1abcd	6.1abcde
T8	2.5abcdef	3.2defgh	4.4ab	4.5fg	5.3ijkl
T9	2.2def	2.8jkl	4.1bcde	4.3gh	5.2ijkl
T10	2.3cdef	3.2bcdefg	4.0cde	5.3abc	6.3abc
T11	2.4bcdef	3.0ghi	3.6hijkl	5.3abc	6.2abcd
T12	2.3cdef	3.0hij	3.8efghi	5.2abc	6.1abcde
T13	2.5abcdef	3.4bcd	4.0cdef	5.3abc	6.2abcd
T14	2.5abcdef	3.5ab	3.8efgh	4.8def	5.9bcdef
T15	2.7abcd	2.7kl	3.8efghi	4.8def	5.6fghij
T16	3.2abc	3.3bcdef	3.5jkl	4.9cde	5.9cdef
T17	2.7abcde	3.7a	4.3abc	5.0bcd	6.2abcd
T18	2.6abcdef	3.2cdefg	3.6hijkl	4.8def	5.7efghi
T19	2.4bcdef	2.9hij	3.8efghij	4.2gh	5.2jkl
T20	2.2def	2.6l	3.9efg	5.3ab	6.5a
T21	2.6abcdef	2.6l	4.3bcd	4.4fg	5.3ijkl
T22	3.4a	3.4abc	3.8efgh	4.4fg	5.4hijk
T23	3.0abcd	3.0ghj	3.7fghijk	5.4a	6.4ab
T24	3.1abc	3.1fghi	4.6a	5.1abcd	6.1bcdef
T25	2.9abcd	3.1efghi	3.3l	4.2gh	5.1klm

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (LSD; $P \leq 0.05$). F1, F2, F3, F4 y F5, son las diferentes fechas de muestreo, el muestreo fue quincenal NS y (*), son diferencias estadísticas No Significativas y Significativas entre tratamientos de las diferentes fechas, respectivamente. T25: Control (sin inoculación).

En la Figura 5, se grafican los tratamientos que causaron efectos significativos superiores en diversas fechas evaluadas para la variable diámetro de plántula, comparadas con el T25 (testigo), donde se observa que en las primeras fechas el testigo no es diferente a los tratamientos, salvo el T20 que siempre tiende a ser superior de forma constante, a diferencia de T23 y T24, los cuales se muestran medias inferiores en las primeras fechas y muy superiores para las últimas fechas de evaluación.

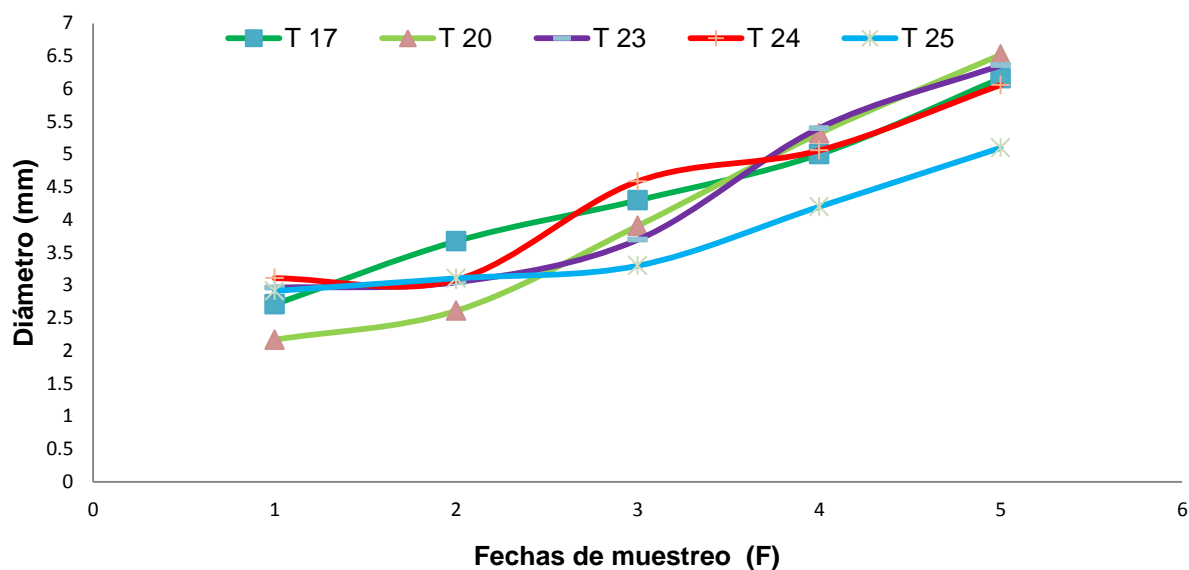


Figura 5. Dinámica del diámetro de plántulas de tratamientos destacados y testigo. Fecha 1: 15 DDI; Fecha 2: 30 DDI; Fecha 3: 45DDI; Fecha 4: 60 DDI; Fecha 5: 75 DDI.

El número de macollos en las plántulas de caña de azúcar (Cuadro 5), es una variable importante, ya que en campo este dato es fundamental en las proyecciones de rendimiento para el cultivo, siendo la especie *Aeromonas salmonicida* (T15) la que promovió el mayor valor de esta variable para los 30 y 45 DDI, con valores de producción de indoles totales y solubilización de fosfatos de 30.625 y 14.83 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente; para los 60 y 75 DDI, fueron las especies *Burkholderia cepacia* (T16) y *Ochrobactrum anthropi* (T5), respectivamente, las que destacaron respecto a los demás tratamientos, con valores de 11.39 y 115.701 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en producción de indoles totales, en cuanto a solubilización de fosfatos, estas cepas presentan valores de 1.69 y 24.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

En las fechas donde no se detectan diferencias estadísticamente significativas, puede deberse a diferentes factores. Muthukumarasamy *et al.* (2002) mencionan

que el contenido de nitrógeno (altos contenidos de amonio) en el suelo afecta de forma directa el rendimiento y la colonización de las RPCV, así como el tipo de suelo, la edad de la planta hospedera y la variedad de la misma. Lima *et al.* (1987) reportaron diferente persistencia de bacterias endófitas a lo largo de un tiempo prolongado en diferentes variedades de caña de azúcar. Los factores externos como el estrés hídrico por sequías prolongadas y los cambios del tiempo por las estaciones del año provocan la variación del número de bacterias diazotróficas (Reis *et al.*, 2000). Oliveira *et al.* (2006) inocularon consorcios de bacterias en diferentes tipos de suelo con diferentes niveles de fertilidad, aunados de distintas variedades de caña de azúcar, obteniendo como resultado incrementos y decrementos en la productividad con respecto a las interacciones de los diferentes factores de variación. Las RPCV presentaron mayor eficiencia en la promoción del crecimiento cuando se inocularon en suelos con niveles medios y bajos de fertilidad y sin fertilizante nitrogenado.

En la Figura 6, se grafican los tratamientos que causaron efectos significativos superiores en diversas fechas evaluadas para la variable número de macollos, comparadas con el T25 (testigo) donde se observa que el testigo siempre fue inferior para esta variable, aunque en las últimas fechas se incrementa el número de macollos sin alcanzar a los tratamientos 5, 15 y 16. La superioridad de los tratamientos 15 y 16 fue alcanzada desde las primeras fechas y permaneció sin mayores cambios, a diferencia del tratamiento 5 el cual en las primeras etapas se mostró incluso inferior que el testigo, presentando un aumento exponencial durante el tiempo hasta alcanzar a ser superior.

El área foliar es un parámetro importante (Cuadro 6), ya que el tamaño del aparato fotosintético determinará el rendimiento del cultivo. En este caso, fue la especie *Ochrobactrum anthropi* (T19) a los 15 DDI, la que promovió la mayor área foliar, con respecto a los demás tratamientos, con valores de 116.699 y 16.28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de síntesis de indoles totales y solubilización de fosfatos respectivamente; para los 45, 60 y 75 DDI, fue la cepa *Pseudomonas fluorescens* (T22) la que promovió la mayor área foliar, con valores de 106.114 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de síntesis de indoles totales y 56.79 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de solubilización de fosfatos, siendo esta cepa la que presenta la mayor estabilidad en cuanto a valores superiores en área foliar, respecto a los

demás tratamientos. Cabe mencionar que esta cepa presenta un valor alto en síntesis de indoles totales y valor medio en la solubilización de fosfatos.

En la Figura 7 se presentan los tratamientos que causaron efectos significativos superiores en diversas fechas evaluadas para la variable área foliar, comparadas con el T25 (testigo) donde se observa que el aumento de esta variable es constante. Sin embargo, el T22 en primeras fechas es inferior a las plántulas no inoculadas, y con el paso del tiempo se incrementa de tal forma que permanece constante y superior con respecto a todos los tratamientos, incluyendo al testigo.

Mehnaz *et al.* (2009), inocularon plántulas de caña de azúcar provenientes de cultivo *invitro* con *Pseudomonas fluorescence* y *P. putida*, las cuales fueron evaluadas como cepas productoras de ácido indolacético, por lo que se incrementó la biomasa de las plántulas de 2 a 5 tallos, en comparación con las plántulas no inoculadas.

Cuadro 5. Numero de macollos de plántulas de caña de azúcar inoculadas con 24 RPCV.

Número de macollos					
T	F1 (*)	F2 (*)	F3 (*)	F4 (*)	F5 (*)
T1	5.3abcd	7.2abc	7.6ab	7.6bcd	7.6cde
T2	3.8cd	5.2fgh	7.0bcde	7.4cd	7.6cde
T3	4.3bcd	5.4efg	5.6gh	5.6g	6.8fgh
T4	4.8abcd	5.4efg	6.6def	6.6ef	6.8fgh
T5	3.0d	4.6hi	6.4ef	7.6bcd	8.6a
T6	3.8cd	4.2i	6.8cdef	7.4cd	7.6cde
T7	4.3bcd	4.6hi	6.6def	7.4cd	8.4ab
T8	5.0abcd	5.6ef	5.6gh	6.4ef	6.6gh
T9	4.0cd	4.6hi	6.4ef	6.4ef	6.6gh
T10	5.8abcd	6.0de	6.4ef	6.4ef	6.4h
T11	4.3bcd	4.6hi	4.6i	6.4ef	6.4h
T12	5.5abcd	6.2de	6.4ef	6.6ef	6.8fgh
T13	5.5abcd	6.0de	6.4ef	6.4ef	7.8bcde
T14	6.5abc	7.0bc	7.2abcd	7.4cd	7.6cde
T15	5.8abcd	7.8a	7.8a	8.0abc	8.0abcd
T16	7.5a	7.6ab	7.6ab	8.4a	8.4ab
T17	7.3ab	7.4ab	7.6ab	7.6bcd	8.2abc
T18	4.5abcd	5.2fgh	6.4ef	6.4ef	7.2efg
T19	5.3abcd	5.4efg	7.0bcde	8.2ab	8.2abc
T20	5.8abcd	6.0de	6.4ef	7.4cd	7.4def
T21	5.3abcd	6.0de	6.2fg	6.4ef	7.8bcde
T22	4.0cd	4.8ghi	5.6gh	7.0de	7.6cde
T23	6.3abc	6.6cd	6.6def	7.0de	7.6cde
T24	4.8abcd	5.4efg	7.4abc	8.2ab	8.2abc
T25	5.3abcd	5.4efg	5.4h	5.6g	7.4def

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (LSD; $P \leq 0.05$). F1, F2, F3, F4 y F5, son las diferentes fechas de muestreo, el muestreo fue quincenal NS y (*), son diferencias estadísticas No Significativas y Significativas entre tratamientos de las diferentes fechas, respectivamente. T25: Control (sin inoculación).

Cuadro 6. Área foliar de plántulas de caña de azúcar inoculadas con 24 RPCV.

Área foliar (cm ²)					
T	F1 (*)	F2 (*)	F3 (*)	F4 (*)	F5 (*)
T1	17.6h	42.5fgh	76.5ij	114.4hij	137.4hi
T2	21.1efgh	45.9def	88.0ef	111.7hij	140.3gh
T3	20.4efgh	56.4c	90.9de	108.8ijk	137.6hi
T4	34.1abcde	37.2ij	97.0bcd	97.9lm	115.4jk
T5	19.3gh	39.0ij	80.7ghi	88.2m	107.9k
T6	20.3efgh	39.9hi	76.4ij	98.8klm	125.2ij
T7	19.9fgh	36.2ijk	78.6hij	129.6def	156.0ef
T8	30.2abcdefg	32.3kl	91.5cde	99.6kl	125.0ij
T9	22.5defgh	31.3l	85.3efgh	98.0lm	131.5hi
T10	26.8bcdefgh	31.5l	72.1jk	126.9efg	158.2de
T11	27.1bcdefgh	35.3jkl	77.4ij	126.5efg	172.8bc
T12	29.6abcdefg	43.1fgh	67.8kl	141.7bc	177.3ab
T13	33.3abcdef	43.2fgh	64.8lm	121.2fgh	141.7fgh
T14	33.4abcdef	41.5gh	59.0m	142.9ab	166.8bcde
T15	28.9abcdefg	42.4fgh	66.0kl	125.7efg	159.0cde
T16	42.4a	66.5b	91.3de	131.6cdef	158.1de
T17	37.2abc	49.9d	86.1efg	135.1bcde	189.2a
T18	21.7defgh	63.6b	98.2bc	110.4ij	138.9ghi
T19	27.5bcdefgh	76.4a	101.4b	122.0fgh	152.6efg
T20	31.0abcdefg	48.4de	103.2b	121.0fgh	138.1ghi
T21	24.5cdefgh	34.8jkl	101.9b	115.0hij	136.3hi
T22	30.3abcdefg	32.5kl	115.8a	152.7a	188.1a
T23	38.7ab	46.3def	78.9hi	117.2ghi	157.0de
T24	32.4abcdefg	44.3efg	118.2a	138.7bcd	170.7bcd
T25	35.4abcd	45.8def	82.2fghi	104.8jkl	133.2hi

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (LSD; $P \leq 0.05$). F1, F2, F3, F4 y F5, son las diferentes fechas de muestreo, el muestreo fue quincenal NS y (*), son diferencias estadísticas No Significativas y Significativas entre tratamientos de las diferentes fechas, respectivamente. T25: Control (sin inoculación).

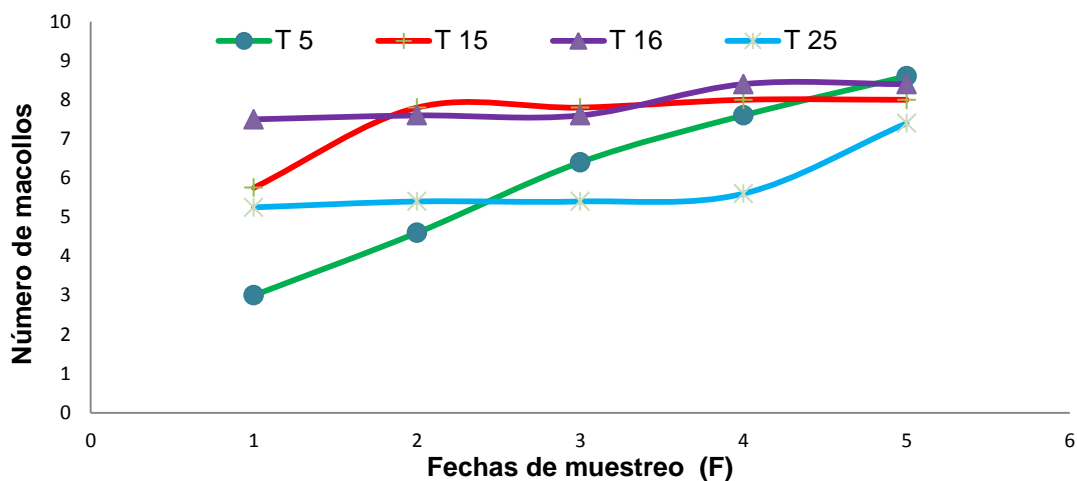


Figura 6. Dinámica del número de macollos en tratamientos destacados y el testigo. Fecha 1: 15 DDI; Fecha 2: 30 DDI; Fecha 3: 45DDI; Fecha 4: 60 DDI; Fecha 5: 75 DDI.

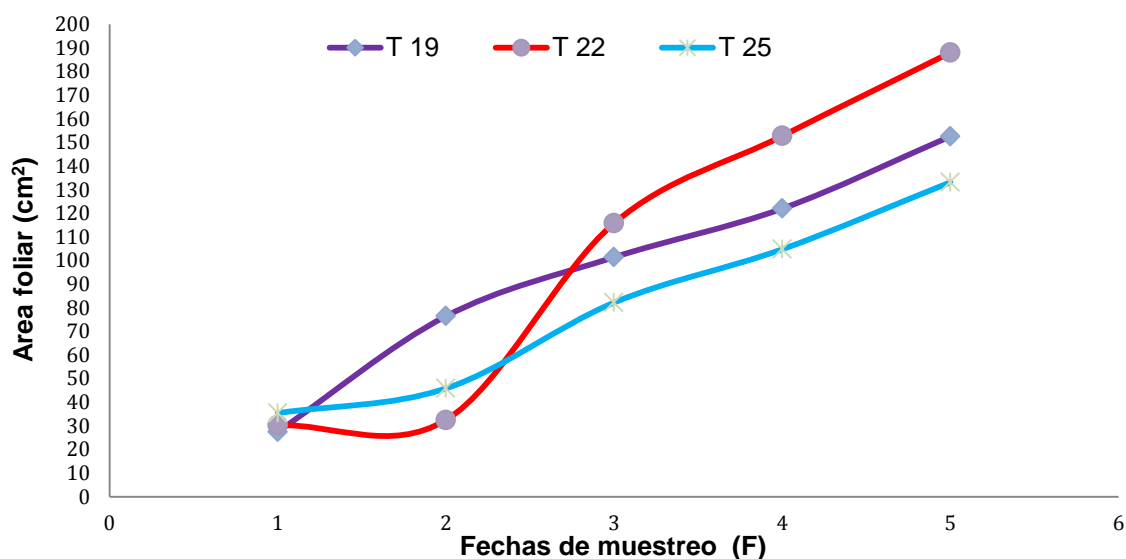


Figura 7. Dinámica del área foliar en tratamientos destacados y testigo. Fecha 1: 15 DDI; Fecha 2: 30 DDI; Fecha 3: 45DDI; Fecha 4: 60 DDI; Fecha 5: 75 DDI.

En el Cuadro 7 se observa que a los 30 DDI, la cepa que presentó los valores más altos de materia seca aérea fue *Shewanella putrefaciens* (T18), con valores de síntesis de indoles totales de $74.955 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $1.75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de fosfatos solubles. A los 45 DDI, la cepa estadísticamente superior fue *Stenotrophomonas maltophilia* (T24) con valores de indoles totales y fosfatos solubles de 11.989 y $216.38 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Finalmente, en los 60 y 75 DDI la especie que presentó mayor

estabilidad en su efecto sobre las plántulas inoculadas fue *Pseudomonas luteola* (T1) con valores de 117.349 y 0.37 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de síntesis de indoles totales y presencia de fosfatos solubles, respectivamente.

En la Figura 8, se presentan los tratamientos que causaron efectos significativos superiores en diversas fechas evaluadas para la variable peso de la materia seca aérea, comparadas con el T25 (testigo) donde se observa que T1 y T24 son los que destacan su superioridad y con mayor estabilidad al pasar el tiempo.

Muñoz y Caballero (2003) mostraron que la inoculación de bacterias originarias de la rizósfera de plantas de caña de azúcar como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum ruribulbicans* y *H. seropedicae*, pueden incrementar hasta un 26% el peso de la materia seca de las plantas que fueron cultivadas *invitro*. En campo se observó un incremento en 13 a 16% del rendimiento (Govindarajan *et al.*, 2006) y se demostró que la inoculación con *Burkholderia* en caña de azúcar a campo abierto, incrementa el rendimiento de manera más eficiente en comparación con el uso de fertilizantes de síntesis artificial, teniendo un ahorro de 140 kg N ha^{-1} .

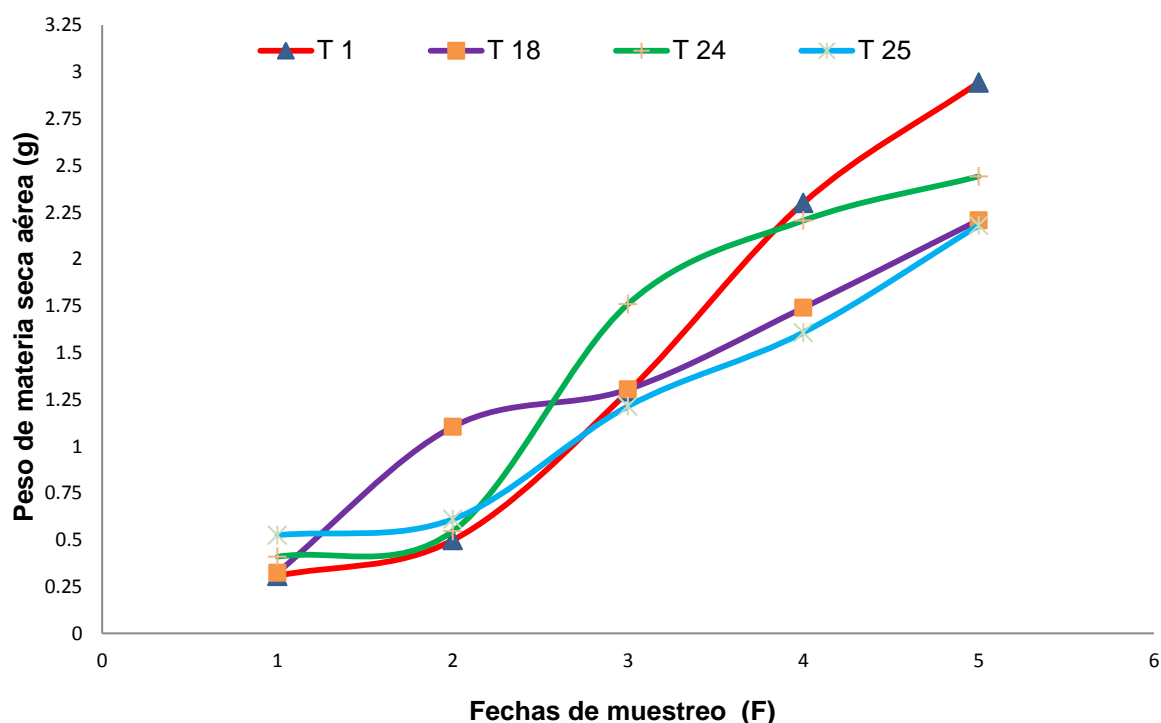


Figura 8. Dinámica del peso seco aéreo en tratamientos destacados y testigo. Fecha 1: 15 DDI; Fecha 2: 30 DDI; Fecha 3: 45DDI; Fecha 4: 60 DDI; Fecha 5: 75 DDI.

Cuadro 7. Materia seca aérea de plántulas de caña de azúcar inoculadas con 24 RPCV.

Materia seca aérea (g)					
T	F1 (*)	F2 (*)	F3 (*)	F4 (*)	F5 (*)
T1	0.31bc	0.50jkl	1.29mno	2.30a	2.94a
T2	0.28c	0.89c	1.55bcdefg	1.82ij	2.22ghijk
T3	0.25c	0.90c	1.23no	1.80ij	2.50cdef
T4	0.45abc	0.46kl	1.56bcdef	1.62kl	1.92lm
T5	0.26c	0.82cd	1.58bcd	2.01efgh	2.21hijk
T6	0.25c	0.74def	1.38ijklm	1.60kl	2.39efghi
T7	0.29bc	0.99b	1.49defghij	1.91ghi	2.31fghij
T8	0.34bc	0.77d	1.64abc	1.89hij	2.39efghi
T9	0.28c	0.68efg	1.52cdefgh	1.91ghij	2.34fghij
T10	0.57ab	0.89c	1.55bcdefg	1.93ghi	2.71bc
T11	0.52abc	0.53ijk	1.36jklmn	2.11bcde	2.47def
T12	0.45abc	0.67fg	1.07p	2.10bcdef	2.48def
T13	0.38abc	0.76de	1.33klmno	1.88hij	2.36fghi
T14	0.41abc	0.63gh	1.49defghi	1.93fghi	2.46def
T15	0.46abc	0.45lm	1.44fghijk	2.01efgh	2.64bcd
T16	0.64a	0.65g	1.40hijklm	2.07cdefg	2.63bcd
T17	0.47abc	0.79d	1.57bcde	2.04defgh	2.59bcde
T18	0.33bc	1.10a	1.30lmno	1.74jk	2.21hijk
T19	0.28c	0.89c	1.45efghijk	1.63kl	2.12jkl
T20	0.36bc	0.37mn	1.38ijklm	1.95efghi	2.43defgh
T21	0.37abc	0.37n	1.43ghijkl	1.55l	1.77m
T22	0.40abc	0.80d	1.65ab	2.26ab	2.80ab
T23	0.45abc	0.45kl	1.05p	1.89 hij	2.50cdef
T24	0.41abc	0.55hij	1.76a	2.21abcd	2.44defg
T25	0.53abc	0.61ghi	1.21o	1.61kl	2.18ijk

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (LSD; $P \leq 0.05$). F1, F2, F3, F4 y F5, son las diferentes fechas de muestreo, el muestreo fue quincenal NS y (*), son diferencias estadísticas No Significativas y Significativas entre tratamientos de las diferentes fechas, respectivamente. T25: Control (sin inoculación).

Cuadro 8. Materia seca de raíz de plántulas de caña de azúcar inoculadas con 24 RPCV.

Materia seca de raíz (g)					
T	F1 (*)	F2 (*)	F3 (*)	F4 (*)	F5 (*)
T1	0.41abc	0.46n	1.19klm	2.59a	3.39a
T2	0.32abc	0.68def	1.30ijk	2.09bcd	2.87bc
T3	0.26c	0.62fghij	1.27jkl	1.98defgh	2.73cd
T4	0.48abc	0.56jkl	1.45fgh	1.48m	1.82l
T5	0.37abc	0.53klm	1.71a	1.83ghij	2.21hijk
T6	0.28c	0.58hijkl	1.49defg	1.99defg	2.48efg
T7	0.28c	0.60ghijk	1.56cdef	1.99defg	2.02k
T8	0.44abc	0.66efg	1.37ghij	1.66kl	2.10jk
T9	0.29bc	0.52lmn	1.29ijk	1.87efghi	2.16ijk
T10	0.63ab	0.66efg	1.35hij	1.85ghij	2.20ijk
T11	0.58abc	0.64fgh	1.48defg	2.03cde	2.56def
T12	0.43abc	0.75c	1.48defg	1.80ijk	2.35ghi
T13	0.31bc	1.26a	1.58bcde	2.02cdef	2.67cde
T14	0.33abc	0.57ijkl	1.40ghi	1.96defghi	2.55def
T15	0.41abc	0.46n	1.56cdef	2.16bc	2.67cde
T16	0.65a	0.74cd	1.46efgh	2.46a	3.06b
T17	0.41abc	0.63fghi	1.64abc	1.90efghi	2.40fgh
T18	0.33abc	0.68def	1.25jkl	2.03cde	2.60de
T19	0.28c	0.92b	1.60abcd	1.70jk	2.27hij
T20	0.41abc	0.48mn	1.45fgh	1.82hijk	2.15ijk
T21	0.39abc	0.39o	1.49defg	1.50lm	1.79l
T22	0.35abc	0.38o	1.71ab	2.23b	2.62de
T23	0.39abc	0.64fgh	1.11m	2.04cde	2.72cd
T24	0.44abc	0.56jkl	1.56cdef	1.86fghij	2.29ghij
T25	0.43abc	0.71cde	1.15lm	1.66kl	2.17ijk

Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas (LSD; $P \leq 0.05$). F1, F2, F3, F4 y F5, son las diferentes fechas de muestreo, el muestreo fue quincenal NS y (*), son diferencias estadísticas No Significativas y Significativas entre tratamientos de las diferentes fechas, respectivamente. T25: Control (sin inoculación).

Govindarajan *et al.* (2008) mencionan que las bacterias han mostrado efectos benéficos de forma individual o en forma de consorcios, aunque se han hecho pocas investigaciones sobre antibiosis en diferentes consorcios y se ha reportado el efecto sinérgico (positivo o negativo) sobre el crecimiento de las plantas. En un experimento en el que se inocularon juntas las especies *G. diazotrophicus*, *A. amazonense* y *Burkholderia* sp., en caña de azúcar, se encontraron con un bajo rendimiento en comparación con las inoculaciones individuales. En caso contrario, Oliveira *et al.* (2002), inocularon en caña de azúcar producida *invitro* las especies fijadoras de nitrógeno *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* y *Burkholderia* sp., originalmente aisladas de caña de azúcar, y posterior a la inoculación, fueron traspasadas a contenedores con cantidades de N¹⁵ con el fin de detectar la asimilación de nitrógeno, concluyendo que se mejoró en 39% el contenido total de biomasa.

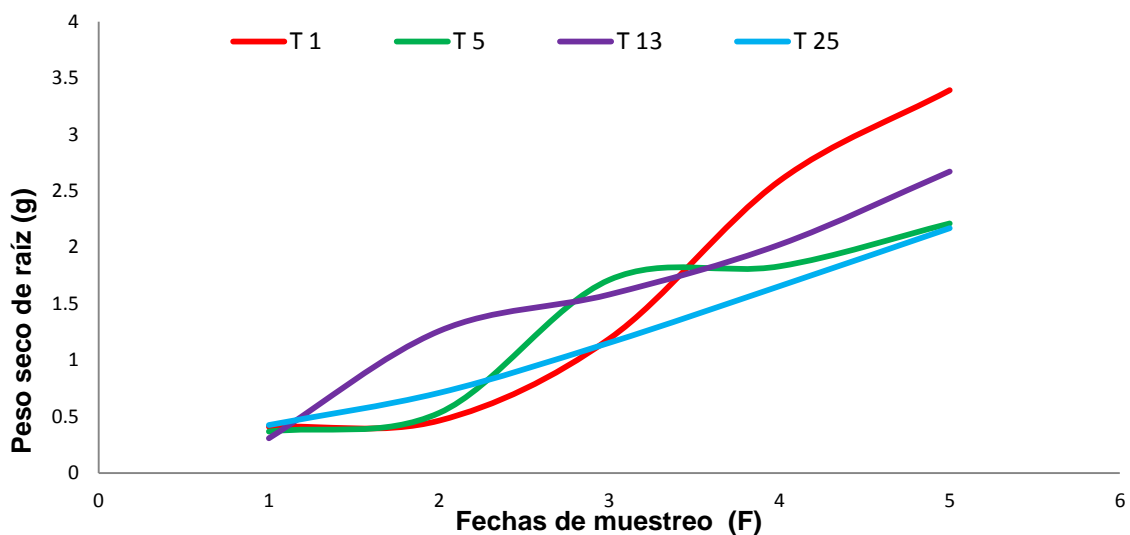


Figura 9. Dinámica del peso seco de raíz en tratamientos destacados y testigo. Fecha 1: 15 DDI; Fecha 2: 30 DDI; Fecha 3: 45DDI; Fecha 4: 60 DDI; Fecha 5: 75 DDI.

El peso de la materia seca de la raíz es un indicador importante, ya que refleja la cantidad de raíz efectiva para la absorción de nutrimentos y agua en las plantas, por lo que los indoles y los fosfatos solubles son de vital importancia para el desarrollo. En el Cuadro 4 se observa que a los 30 DDI, la bacteria *Burkholderia cepacia* (T13) presentó un mayor efecto en la raíz de las plántulas, y mostró valores de indoles totales y fosfatos solubles de 13.537 y 1.57 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A los 45 DDI, *Ochrobactrum anthropi* mostró resultados superiores en peso seco de raíz, con valores de síntesis de indoles totales y fosfatos solubles de 115.701 y 24.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Finalmente, a los 60 y 75 DDI, la cepa *Pseudomonas luteola* (T1), presentó datos superiores a las demás cepas.

Las auxinas dentro de la planta se encuentran a concentraciones de 10^{-7} ppm, cantidad a la que promueven la división celular, principalmente en las zonas meristemáticas, en tanto que a concentraciones menores no son funcionales y a mayores inhiben la división celular o alteran la morfología radical (Salisbury y Ross, 2000).

En el Cuadro 9 y 10, se muestra un resumen del efecto de las cepas bacterianas sobre las vitroplantas a nivel de invernadero, que fueron superiores estadísticamente en diferentes variables y en diferentes fechas de muestreo. De las 24 cepas inoculadas, 13 causaron efectos significativos superiores. Los tratamientos 3, 13, 18, 19, 20 y 23, que corresponden a las cepas bacterianas *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Shewanella putrefaciens*, *Ochrobactrum anthropi*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Sphingomonas paucimobilis*, solo causaron efecto superior en 1 variable y una sola fecha. Los tratamientos 5 y 16 de las cepas *Ochrobactrum anthropi* y *Burkholderia cepacia*, propiciaron un efecto superior en dos variables respuesta y en dos fechas. El tratamiento 22 de la cepa *Pseudomonas fluorescens*, es destacada por causar efecto superior en tres fechas consecutivas para la variable respuesta área foliar, teniendo valores altos de producción de indoles totales (106.11 $\mu\text{g mL}^{-1}$). El tratamiento 15 de la cepa *Aeromonas salmonicida* se distingue de los demás por tener efectos superiores en dos variables respuesta y en tres fechas de muestreo, es decir mostró su persistencia y superioridad en el tiempo, con valores de 30.26 y 14.83 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de producción de indoles totales y solubilización de fosfatos respectivamente.

Los tratamientos 1 y 24 (*Pseudomonas luteola* y *Stenotrophomonas maltophilia*) son los que mostraron mayor estabilidad en las diferentes variables respuesta y su persistencia a través del tiempo; el tratamiento 1 mostró efectos superiores para dos variables respuesta (materia seca aérea y de raíz) y para dos fechas consecutivas de cada variable, con valores de producción de indoles totales y solubilización de fosfatos de 117.34 y 0.37 $\mu\text{g mL}^{-1}$; el tratamiento 24 causó efectos superiores en altura de plántula, diámetro y materia seca aérea en tres fechas de muestreo con una producción de indoles totales de 11.98 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y una alta solubilización de fosfatos (216.38 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Cuadro 9. Resumen del efecto de las cepas bacterianas sobre las vitroplantas a nivel de invernadero en diferentes variables.

T/DDI	Altura (cm)				Diámetro (cm)				Macollos (No.)			
	30	45	60	75	30	45	60	75	30	45	60	75
T1												
T3			*									
T5												*
T13												
T15		*							*	*		
T16											*	
T17	*				*							
T18												
T19												
T20								*				
T22												
T23							*					
T24				*		*						

T= Tratamiento
DDI= días después de la inoculación

Se considera a los tratamientos 1, 5, 15, 16, 22 y 24 son los más destacados por su efecto superior en diferentes variables respuesta y su persistencia en diferentes fechas de muestreo.

Cuadro 10. Resumen del efecto de las cepas bacterianas sobre las vitroplantas a nivel de invernadero en diferentes variables.

T/DDI	Área Foliar (cm ²)				Materia seca aérea (g)				Materia seca raíz (g)			
	30	45	60	75	30	45	60	75	30	45	60	75
T1							*	*			*	*
T3												
T5										*		
T13									*			
T15												
T16											*	
T17				*								
T18					*							
T19	*											
T20												
T22		*	*	*								
T23												
T24						*						

T= Tratamiento
DDI= días después de la inoculación

Crecimiento del cultivo

En la Figura 10 se muestra el desarrollo del índice de área foliar (IAF), para lo que corresponden a las especies *Pseudomonas luteola* (T1 y T17), *Ochrobactrum anthropi* (T19), *Pseudomonas fluorescens* (T22) y *Stenotrophomonas maltophilia* (T24), los cuales son los tratamientos que presentaron diferencias estadísticamente significativas y superiores en las variables Área Foliar y Peso de Materia Seca Aérea (variables base para calcular los indicadores de crecimiento) en las diferentes fechas; también se consideró graficar el testigo sin inoculación (T25).

El IAF mostró cambios significativos en las diferentes fechas de muestreo (Cuadro 6); también mostró un incremento permanente, aunque se observa que los tratamientos inoculados con RPCV tienen un incremento de forma variable en las distintas fechas, en comparación con el T25 que muestra un incremento constante y sin grandes variaciones.

Las Unidades Calor (UC) son la integración de la curva de temperatura ambiental entre la temperatura crítica máxima y crítica mínima de crecimiento, las cuales definen el rango de temperatura donde el cultivo se desarrolla adecuadamente; fuera de ese rango, el cultivo detiene su crecimiento o muere (Taiz y Zaiger, 2006). En el caso de caña de azúcar, la temperatura óptima de desarrollo se encuentra entre los 26 y 32°C, a temperaturas menores de 21°C se reduce el amacollamiento, a temperaturas menores de 10°C el crecimiento activo se detiene (Biswas, 1986), a temperaturas mayores a 35°C se incrementa la fotorrespiración (Chu y Kong, 1971) y por encima de los 38°C reducen la fotosíntesis y por lo tanto el crecimiento en general (Kortschack *et al.*, 1965). En la zona de Texcoco (donde se llevó a cabo el experimento) la temperatura media de los meses de agosto, septiembre y octubre (periodo del experimento) es de 16.2, 16.0 y 15.2°C respectivamente, las temperaturas máximas son de 23.3°C para agosto-septiembre y 23.5°C en octubre (CNA-SMN, 2012). Las alteraciones que se presentan en las dinámicas de crecimiento de las plántulas de caña de azúcar, pudieran deberse a alteraciones del ambiente en el que se desarrollaron.

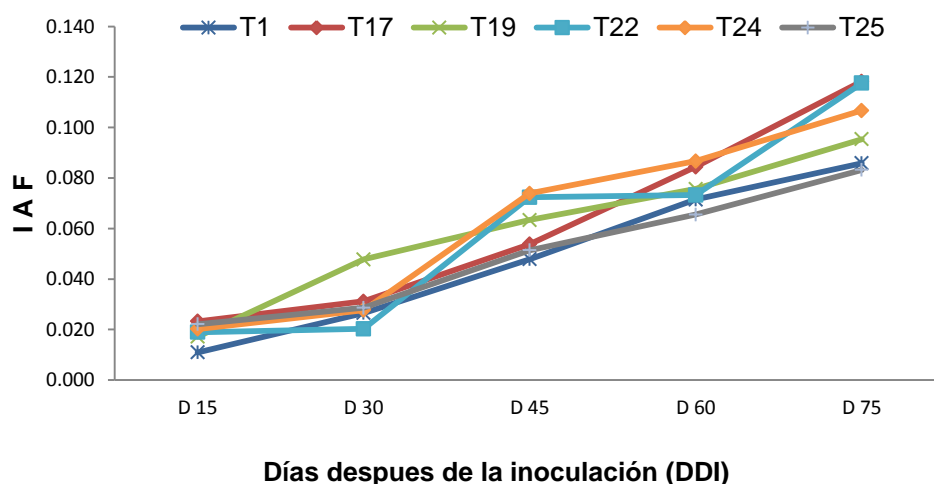


Figura 10. Dinámica del Índice del Área Foliar (IAF) en tratamientos destacados y el testigo. Fecha 1: 15 DDI; Fecha 2: 30 DDI; Fecha 3: 45DDI; Fecha 4: 60 DDI; Fecha 5: 75 DDI.

Cuadro 11. Índice de área foliar (IAF) de plántulas de caña de azúcar inoculadas.

T/DDI	IAF				
	15	30	45	60	75
T1	0.011b	0.027c	0.048d	0.071bc	0.086d
T17	0.023a	0.031b	0.054c	0.084a	0.118a
T19	0.017ab	0.048a	0.063b	0.076b	0.095c
T22	0.019a	0.020d	0.072a	0.073bc	0.118a
T24	0.020a	0.028c	0.074a	0.087a	0.107b
T25	0.022a	0.029bc	0.051cd	0.066c	0.083d

Tasa de asimilación neta (TAN)

En la Figura 11 se presenta la dinámica de la TAN, y se observa que las tasas más altas para la mayoría de tratamientos (1, 22, 24 y 25) se presentaron de los 15 a los 30 días después de la inoculación y en los tratamientos 17 y 19 fue a los 0 a los 15 días. Todas las tasas tienden a disminuir conforme avanza el ciclo del desarrollo del cultivo hasta que llegue a madurez fisiológica. La TAN más alta y la más baja se presentan a los 30 DDI, la más alta es el T24 con $0.00107 \text{ g m}^{-2} \text{ día}^{-1}$, las más baja es el T17 con $0.00020 \text{ g m}^{-2} \text{ día}^{-1}$.

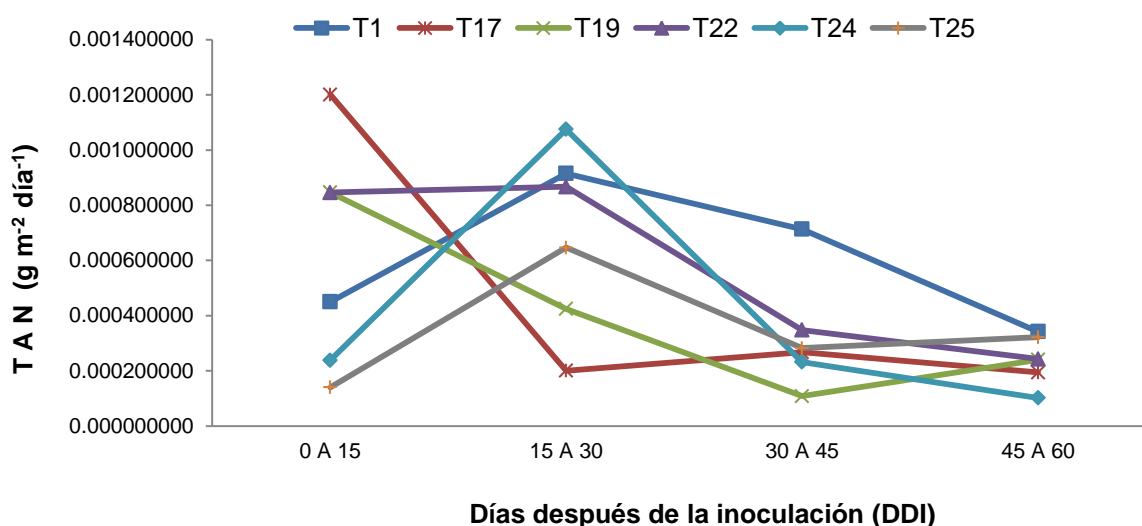


Figura 11. Dinámica de la Tasa de Asimilación Neta (TAN) en tratamientos destacados y el testigo.

Tasa de crecimiento absoluto (TCA)

En la Figura 12 se presenta la dinámica de la TCA en la que se observa que la mayor acumulación de materia seca por día para los tratamientos 19 y 17 se presentó de los 0 a los 15 días después de la inoculación; para los tratamientos 22, 24 y 25 de los 15 a 30 días, finalmente el tratamiento 1 alcanzó su máxima acumulación de materia seca de los 30 a 45 días después de la inoculación. La mayor tasa fue la del T24 (0.081 g día^{-1}) y la menor del T19 (0.012 g día^{-1}) en la segunda y tercera fecha de muestreo, respectivamente. En cuanto al testigo (T25) mostró una TCA constante y de valores medios con respecto a los tratamientos comparados.

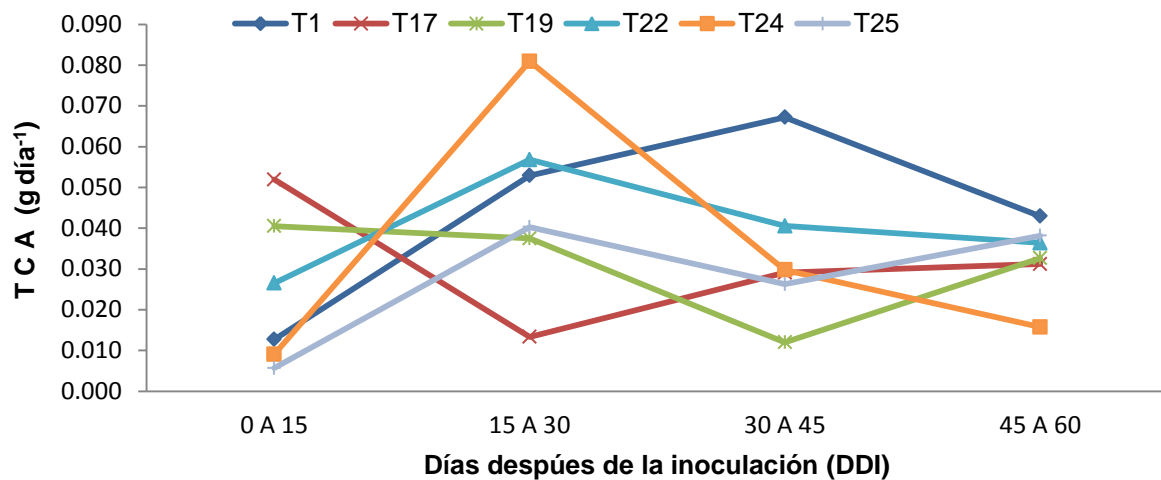


Figura 12. Dinámica de la Tasa de Crecimiento Absoluto (TCA) en tratamientos destacados y el testigo.

Tasa relativa de crecimiento (TRC)

La dinámica de la TRC muestra similitudes con la TAN, observando que las mayores tasas de crecimiento para la mayoría de tratamientos (1, 22, 24 y 25) se presentan de los 15 a 30 días después de la inoculación y para los T17 y T19 la mayor tasa fue en los primeros 15 días después de la inoculación. Se observa que el T1 y T24 tienden a ser superiores con respecto a los demás tratamientos. Conforme avanzan los días, la TCR tiende a disminuir en todos los tratamientos.

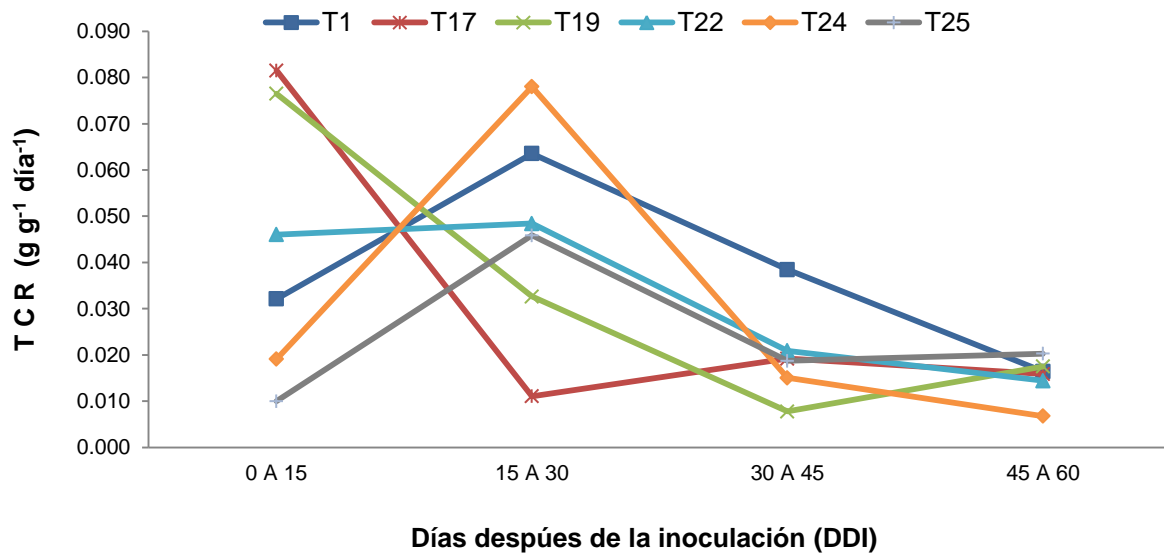


Figura 43. Dinámica de la Tasa Relativa de Crecimiento (TRC) en tratamientos destacados y el testigo.

VII. CONCLUSIONES

Las especies *Ochrobactrum anthropi* y *Pseudomonas luteola* son las que presentaron diferencias estadísticas superiores en producción de indoles totales. La especie *Stenotrophomonas maltophilia* fue la especie que presentó los valores más altos de solubilización de fosfatos.

Las cepas *Pseudomonas luteola* (Tratamiento 1), *Ochrobactrum anthropi* (T5), *Aeromonas salmonicida* (T15), *Burkholderia cepacia* (T16), *Pseudomonas fluorescens* (T22) y *Stenotrophomonas maltophilia* (T24) son las más destacadas por su efecto superior en diferentes variables respuesta y su persistencia en diferentes fechas de muestreo.

Las cepas que produjeron el índice de área foliar y las tasas más altas de crecimiento pertenecieron a las especies *Pseudomonas luteola*, *P. fluorescens*, *Ochrobactrum anthropi* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Se requieren estudios de antibiosis entre las 13 cepas bacterianas más destacadas, con la finalidad de saber la factibilidad de emplearlas de forma individual o en consorcios en la elaboración de biofertilizantes para el cultivo de caña de azúcar.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Anuj**, R., Baljeet, S., Monica, J., Radha, P., Kanika, K. y Lata, N. 2011. Identification of multi-trait PGPR isolates y evaluating their potential as inoculants for wheat. *Ann Microbiol.* 61:893–900.
- Arzuaga**, S., Fernández, C., Dalurzo, H., Vázquez, S. 2005. Fósforo total, fósforo orgánico y fosfatasa acida en Entisoles, Alfisoles y Vertisoles de corrientes con diferentes usos agrícolas. *Comunicaciones científicas y tecnológicas.* Resumen A-066.
- ASERCA**. 2004. Claridades Agropecuarias: La Caña de Azúcar. *Revista mensual*, No. 127, México.
- Badalucco**, L., Kuikman, P. J. 2001. Mineralization y immobilization in the rhizosphere, in: *The Rhizosphere. Biochemistry y Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, Pinton, R., Varanini, Z. y Nannipieri, P., eds., Marcel Dekker, Inc. N.Y.pp.159-196.
- Barea**, J., Navarro, M. y Montoya, E. 1976. Production of plant growth regulators by rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria. *J.Appl. Bacteriol.* 40: 129-134.
- Bashan**, Y. y de-Bashan, L. E. 2005. Bacteria-plant growth-promotion. In: Hillel D (ed) *Encyclopedia of soils in the environment*. Elsevier, Oxford. pp. 103-115.
- Blackburn**, F. 1984. *Sugar-cane* .Longman, New York, United States.414 p.
- Beadle**, C. F. 1988. Análisis de crecimiento vegetal. *In*: Coombs J., D. O. Hall., S.P. Long y J. M. Scurlock (Eds.). *Técnicas de fotosíntesis y bioproductividad*. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Biswas**, A. 1986. Screening of sugar cane varieties against red rot disease in West Bangal. *Bharatiya sugar* 11: 15-16.
- Boddey**, R.M., de Oliveira, O.C., Urquiaga. S., Reis V.M., Olivares, F.L., Baldani, V.L.D. y Dobereiner, J. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane y rice: contributions y prospects for improvement. *Plant Soil* 174:195–209
- Bonkowski**, M., Cheng, W, Griffiths, B. S., Alpei, J., y Scheu, S. 2000. Microbial-fauna interactions in the rhizosphere y effects on plant growth. *Eur. J. Soil Biol.* 36:135-147.
- Bradshaw**, L.J. 1976. *Microbiología de Laboratorio*. Ed. El Manual Moderno, S.A. México, D.F.
- Brown**, M. E. 1972. Plant growth substances produced by microorganisms of soil y rhizosphere. *J. Appl. Bacteriol.* 40:341-348.

- Caballero-Mellado**, L.E. Fuentes-Ramírez y Esperanza-Martínez. 1993. Perspectivas de sustitución de fertilizantes en la caña de azúcar mediante el uso de bacterias fijadoras de nitrógeno y productoras de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal. Simposio Nacional. La capacitación y desarrollo tecnológico en el campo cañero mexicano. Xalapa, Veracruz, México.
- Carcaño**, M. M. 2003. Aislamiento, selección e inoculación de las bacterias diazótrofes promotoras del crecimiento. *Azospirillum* spp. y *Klebsiella* spp. en maíz (*Zeamays* L.). Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. México. Pp. 105.
- CNA-SMN**. 2012. Normales climatológicas del servicio meteorológico nacional – Comisión Nacional del Agua. México.
- CONADESUCA**. 2012. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.conadesuca.gob.mx/>
- Coyne**, M. 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Paraninfo D. L. Madrid, España.
- Díaz**, V. P., R. Ferrera-Serrato, J. J. Almaraz-Suarez y G. Alcántar G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. Terra 19:327-335.
- Dobbelaere**, S., Anja, C., Amber, T., David, P.Y., Okon, J. Vyerleyden. 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* y *A. irakense* strains on development y nitrogen uptake of spring wheat y grain maize. Biol. Fert. Soils 36:284–297.
- Doorembus**, J., Kassam, A. H., Bentuelsen, C. L. M., Branscheidplusje, J. M. G. A., Smith, M., Vittenbogaard, G. O. y H. K. Van Der Val. 1986. Efectos del agua sobre el rendimiento de los cultivos. Estudio FAO riego y drenaje 33. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.
- Duffy**, B. K., y Défago, G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic y siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains, Appl. Environ. Microbiol. 65:2429-2438.
- Elmerich**, C., W. Zimmer y C. Vieille. 1992. Associative nitrogen fixing bacteria. In: Stacey, G., R.H. Burris y H.J. Evans (eds.). Biological nitrogen fixation. Chapman and Hall. New York.
- Escalante**, E. J. A., J. Kohashi, S. 1982. Efecto del sombreado artificial sobre algunos parámetros del crecimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Agrociencias. 48: 29-38.
- Escalante**, E. J. A., J. Kohashi, S. 1993. El rendimiento y crecimiento de frijol. Manual para la toma de datos. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.

- Escalante-Estrada**, J.A. 1999. Área foliar, senescencia y rendimiento del girasol de humedad residual en función del nitrógeno. *Terra* 17: 149-157.
- Fedi**, S., P. Montaini y F. Faulli. 1992. Chemotactic response of *Azospirillum* toward root exudates of C3 y C4 plants. *Symbiosis* 13:102-105
- Felici**, C., L. Vettori, E. Giraldi, L. M. C. Forino, A. Toffanin, A. M. Tagliasacchi y M. Nutri. 2008. Single y co-inoculation of *Bacillus subtilis* y *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth y rhizosphere microbial community. *Appl. Soil Ecol.* 40:260-270.
- Fernández**, C., Zalba, P., Gómez, M. 2005. Bacterias solubilizadoras de fosfato inorgánico aisladas de suelos de la región sojera. *Cienc. Suelo* 23: 31-37.
- Foissner**, W. 1999. Soil protozoa as bioindicators: pros y cons, methods, diversity, representative examples. *Agric. Ecosyst. Environ.* 74: 95-112.
- Frankenberg**, Jr. W. T. y M. Arshad. 1995. Phytohormones in soils: microbial production y function. Marcel Dekker. Inc., New York.
- Glickman**, E. y Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 793-796.
- Govindarajan**, M., Balyreau, J., Muthukumarasamy, R., Kwon, S.W., Weon, H.Y., Lakshminarasimhan, C. 2008. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamiensis* related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microbiol. Ecol.* 55:21–37.
- Govindarajan**, M., Balyreau, J., Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Lakshminarasimhan, C. 2006. Improved yield of micropropagate sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant Soil* 280:239–252
- Hariprasad**, P. y S. R. Niranjana. 2009. Isolation y characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato. *Plant Soil*. 316:13-24.
- Hunt**, R. 1978. *Plant Growth Curves*. The Institute of Biol. Studies in Biology Nº 96. Edward Arnold. London.
- Hunt**, R. 1981. *Plant growth analysis*. Edward Arnold Ed. The Institute of biology's studies in biology No. 96. London.
- Hunt**, R. 1982. *Plant Growth Curves*. The Functional Approach to Plant Growth. Analysis. Edward Arnold Ed. London.
- Jankiewicz**, L. S. y C. Acosta-Zamudio. 2003. Auxinas. In Jankiewicz, L. S. (Ed.) *Reguladores de crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas*. Ediciones Mundi Prensa.

- Jha**, B. K., M. G. Pragash, J. Cletus, G. Raman y N. Sakthivel. 2009. Simoltaneous phosphate solubilization potential y antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonasaureoginosa*, *P. plecoglossidayP. moselii*. World. J. Microbiol. Biotech. 25:573-581.
- Korhonen**, T.K., E. Nurmiaho-Lassila, T. Laakso y K. Haahtela. 1986. Adhesion of fimbriated nitrogen-fixing enteric bacteria to roots of grasses y cereals. Plant Soil 90: 59-69.
- Kortschak**, H.P., Harrt, C.E., Burr, G.O. 1965. Carbon dioxide fixation in sugarcane leaves. Plant Physiol. 40: 209-213.
- Lima**, E., Boddey, R.M., Dobereiner, J. 1987. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided nitrogen balance. Soil Biol. Biochem. 19:165–170.
- Loredo**, O.C., López, R.L. y Espinosa-Victoria, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: una revisión crítica. Terra Latin. 22: 225-239
- Martín**, O, J. R., Gálvez, R. G., Armas, U. R., Espinosa, O. R., Vigoa, H. R. y A. León Méndez. 1987. La caña de azúcar en Cuba. Editorial Científico-Técnica. La Habana. Cuba.
- Merzaeva**, O.V.y Shirokikh, I.G. 2010. Production of auxins by the endophytic bacteria of winter rye. Prikl Biokhim Mikrobiol. 46:51-57.
- Mehnaz**, S., Weselowski, B. Mufti, F.A., Zahid, S., Lazarovits, G., Iqbal, J. 2009. Isolation, characterization y effect of fluorescent pseudomonads on micropropagated sugarcane. Can. J. Microbiol. 55:1007–1011.
- Mehnaz**, S. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) associated with sugarcane. *In: Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*, (Ed.) D.K. Maheshwari, Springer, Heidelberg, Germany.
- Michiels**, K., J. Varderleyden, y A. Van, Gol. 1989. *Azospirillum*-Plant root associations: A review. Biol. Fertil. Soils.8:356-368.
- Milthorpe**, F. L., y Moorby. 1982. An Introduction to Crop Physiology. Cambridge, University Press. Oxford
- Muñoz-Rojas**, J., Caballero-Mellado, J. 2003. Population dynamics of *Gluconacetobacterdiazotrophicus* in sugarcane cultivars y its effect on plant growth. Microb. Ecol. 46:454–464.
- Muthukumarasamy**, R., Revathi, G., y Loganathan, P. 2002. Effect of inorganic N on the population, *in vitro* colonization y morphology of *Acetobacterdiazotrophicus* y *Gluconacetobacterdiazotrophicus*. Plant Soil. 243:91–102.
- Narula**, N., Deubel, A., Gans, W., Behl, R.K., Merbach, W. 2006. Paranodules y colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. Plant Soil Environ. 52:119–129.

- Okon**, Y. y Labyera–González, C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 year's worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26:1591–1601.
- Oliveira**, A. L. M., Canuto E. L., Urquiaga S., Reis V. M. and Baldani J.I. 2006 Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant Soil* 284: 23–32.
- Oliveira**, A. L. M., Urquiaga S., Dobereiner J., Baldani J. I. 2002. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil* 241: 205-215.
- Paredes-Mendoza**, M. y D. Espinosa-Victoria. 2010. Ácidos orgánicos producidos por rizobacterias que solubilizan fosfato: Una revisión crítica. *Terra Latin.* 28: 61-70.
- Patten**, Ch. L. y B. R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
- Pérez**, E. M., Sulbarán, M. M. Ball y L. A. Yarzabal. 2007. Isolation y characterization on mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biol. Biochem.* 39:2905-2914.
- Picone**, L.I. y Zamuner, E. 2002. Fósforoorgánico y fertilidad fosfórica. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur* 16:11-15.
- Plenet**, D., A. Mollier., y S. Pellerin. 2000. Growth analysis of maize field crops under phosphorus deficiency. II. Radiation-use efficiency, biomass accumulation y yield components. *Plant. Soil.* 224:259-272.
- Poorter**, H., y C. Remkes. 1990. Leaf area ratio y net assimilation rate of 24 wild species differing in relative growth rate. *Oecol* 83: 553-559.
- Redondo-Nieto**, J. Morrissey, M. Barret, D. Dowling, F. O'Gara, E. Barahona, A. Navazo, F. Martínez-Granero, M. Sánchez-Contreras, M. Martín y R. Rivilla. 2011. El genoma de *Pseudomonas fluorescens* F113 revela inesperadas adaptaciones al ambiente rizosférico. Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España.
- Reis**, F. B. D. Jr., da Silva, L. G., Reis, V. M., Dobereiner, J. 2000. Ocorência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesq. Agropec. Bras* 35: 985-994.
- Richardson**, A. E. 1994. Soil microorganisms y phosphorus availability. pp. 50–62. In: C. E. Pankhurst, B. M. Doube, W. S. R. Gupta, y P. R. Grace (eds). *Soil biota: management in sustainable farming systems*. Commonwealth Scientific Institute Research Organization. Melbourne, Australia.
- Ronn**, R., McGraig, A. E., Griffiths, B. S., y Prosser, J. I. 2002. Impact of protozoan grazing on the bacterial community structure in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:6094-6105.

- Salgado**, G. S. 1994. El CEICADES logra incrementar 25% el rendimiento de caña de azúcar en Tabasco. Agroproductividad. Colegio de Postgraduados. Cárdenas, Tabasco..
- Salisbury**, F.B., Ross, C.W. 2000. Fisiología de las Plantas. Tomo 3. Desarrollo de las Plantas y Fisiología Ambiental. Ed. Thomson-Paraninfo.
- Saraf**, M., Rajkumar S., y Saha, T. 2011. Perspectives of PGPR in Agri-Ecosystems. In: D. K. Maheshwari (Ed.). Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems Springer. Berlin, Germany.
- Sevilla**, M., Burris, R. H., Gunapala, N., Kennedy, C. 2001. Comparison of benefit to sugarcane plant growth y 15N2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type y mutant strains. Mol. Plant Microb. Interact. 14: 358-366.
- Smith**, K. P., y Goodman, R. M. 1999. Host variation for interactions with beneficial plant associated microbes. Annu. Rev. Phytopathol. 37: 473-491.
- Taiz**, L., Zeiger, E. 2006. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc. Sunderly, MA. USA.
- Thompson**, C. J., H. Marschner., y V. Römheld. 1993. Effect of nitrogen fertilizer form on pH of the bulk soil y rhizosphere, y on the growth, phosphorus, y micronutrient uptake of soybean. J. Plant Nutr. 16: 493-506..
- Tilak**, K., R. Anganayakin., M. Anoharacharic. 2006. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria y *Rhizobium* on nodulation y nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanuscajan*). Eur. J. Soil Sci. 57: 67-71.
- Trivedi**, P. y T. Sat. 2008. *Pseudomonas corrugata* (NRRL B-30409) mutants increased phosphate solubilization, organic acid production, y plan growth at lower temperatures. Curr. Microbiol 56:140-144.
- Tsai**, S., Y. Rosseto, R. 1992. Transformacoes microbianas do fósforo. In: Microbiologia do Solo. Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo. Campinas Brasil.
- Unión Nacional de Cañeros**, A.C. (CNPR). 2012. InfoZafra, Boletín Técnico. Año 10, N° 33. México.
- Urquiaga**, S., y Boddey, R. M. 1987. Teorical considerations in the comparison of total nitrogen difference y N isotope dilution estimates of contribution of nitrogen fixation to plant nutrition. Plant Soil 102: 291-294.
- Vestergard**, M., L. Bjornlund, F. Henry y R. Roon. 2007. Decreasing prevalence of rhizosphere IAA producing y seedling root growth promoting bacteria with barley development irrespective of protozoan grazing regime. Plant Soil 295: 115-125.

- Watanabe, T.** y E. E. Snell.1972.Reversibility of the tryptophanase Reaction: Synthesis of tryptphan from indole, pyruvate and ammonia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69: 1086-1090.
- Yahalom, E.,** Dovrat, A., Okon, Y.,y Czosnek, H. 1991.Effect of inoculation with *Azospirillum* brasilense strain Cd y*Rhizobium* on the morphology of burr medic (*Medicagopolymorpha*L.). Isr. J. Bot. 40: 155- 164.
- Yang, J.,** J. W. Kloepper.y C. Ryu. 2009. Rhizosphere bacterial help plants tolerate abiotic stress. Trends Plant Science 14: 1-4.