



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

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

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA**

**AISLAMIENTO DE RIZOBACTERIAS  
EN COMPOST Y SU EFECTO EN  
PLANTAS MICROPROPAGADAS DE  
CAÑA DE AZÚCAR**

**JUAN MANUEL COHUO COLLI**

**T E S I S**  
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO**

**2023**



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **AISLAMIENTO DE RIZOBACTERIAS EN COMPOST Y SU EFECTO EN PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CAÑA DE AZÚCAR**, realizada por el estudiante: **Juan Manuel Cohuo Colli**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORADO EN CIENCIAS  
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

  
Dr. Juan José Almaraz Suárez


ASESOR

  
Dr. Joel Velasco Velasco

ASESOR

  
Dr. Arturo Galvis Spinola

ASESOR

  
Dr. Josafhat Salinas Ruíz

ASESOR

  
Dr. Julián Delgadillo Martínez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, marzo de 2023

# AISLAMIENTO DE RIZOBACTERIAS EN COMPOST Y SU EFECTO EN PLANTAS

## MICROPROPAGADAS DE CAÑA DE AZÚCAR

Juan Manuel Cohuo Colli, D.C.  
 Colegio de Postgraduados, 2023

### RESUMEN

La micropropagación de caña de azúcar es una alternativa para obtener plantas homogéneas y libres de enfermedades; sin embargo, la fase de aclimatación es una etapa complicada, ya que las plantas son expuestas a estrés biótico y abiótico. Este problema puede resolverse con el uso de microorganismos benéficos. El objetivo de este trabajo fue aislar cepas de rizobacterias de compost, caracterizarlas y evaluar su efecto en plantas micropropagadas de caña de azúcar durante la fase de aclimatación. De muestras de compost (cachaza+gallinaza) se aislaron cepas de rizobacterias. Estas se caracterizaron por su capacidad de solubilizar fosfatos, producir auxinas, fijar nitrógeno y producir sideróforos. Las mejores cepas se identificaron a nivel molecular y se evaluaron en plántulas micropropagadas de caña de azúcar variedad Mex-690. Se establecieron dos experimentos: en el primero se evaluaron 14 cepas de bacterias y en el segundo experimento se evaluaron 20 filtrados bacterianos (10 filtrados sin triptófano y 10 filtrados con triptófano). Las plantas fueron cosechadas a los 45 días (primer experimento) y a los 55 días (segundo experimento) para determinar el efecto de las cepas en el crecimiento. Se aislaron 63 cepas, de las cuales se seleccionaron 14 que presentaron al menos un mecanismo de promoción del crecimiento. Las cepas identificadas pertenecieron a 7 géneros bacterianos: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Paenarthrobacter*, *Weizmannia* y *Staphylococcus*. Las cepas de bacterias y los filtrados bacterianos mostraron diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a los testigos. Los mejores resultados se observaron principalmente con la cepa *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56, la cual mostró efectos positivos en altura de planta, número de hojas, volumen radical, diámetro de tallo, área foliar y contenido de nitrógeno. En cuanto a los filtrados, el obtenido de la cepa CPOC56 mostró los mayores efectos positivos en altura de planta, área foliar, contenido de nitrógeno y fósforo con respecto al testigo y el filtrado de la cepa CPOC48 mostró el mayor efecto positivo en volumen radical y contenido de potasio. Estos resultados indican que la inoculación de cepas de rizobacterias y los filtrados obtenidos del cultivo de estas pueden utilizarse para la aclimatación y crecimiento de plantas micropropagadas de caña de azúcar en invernadero.

**Palabras clave:** *cultivo de tejidos, microorganismos benéficos, sobrenadantes libres de células bacterianas, plantas in-vitro.*

# ISOLATION OF RHIZOBACTERIA FROM COMPOST AND THEIR EFFECT ON MICROPROPAGATED SUGARCANE PLANTS

Juan Manuel Cohuo Colli, D.C.  
Colegio de Postgraduados, 2023

## ABSTRACT

The sugarcane micropropagation is an alternative to obtain homogeneous and free-pathogen plants however, the acclimatization phase is a complicated stage since plants are exposed to biotic and abiotic stress. This situation can be controlled using beneficial microorganisms. The objective of this work was to isolate strains of rhizobacteria from compost, characterize them and evaluate their effect on micro propagated sugarcane plants during the acclimatization phase. Strains of rhizobacteria were isolated from compost samples (sugarcane filter cake+chicken manure) and then, these were characterized by their ability to solubilize phosphates, produce auxins, fix nitrogen, and produce siderophores. The best strains were identified at molecular level and their effect was evaluated in micro propagated seedlings of sugarcane variety Mex-690. Two experiments were conducted: in the first one, 14 bacterial strains with growth-promoting attributes were evaluated and in the second experiment, 20 bacterial filtrates were evaluated (10 filtrates without tryptophan and 10 filtrates with tryptophan). Micro propagated sugarcane plants of the Mex-690 variety were used. The experiments were harvested at 45 days (first one) and at 55 days (second one) to determine the effect of strains on plant growth. A total of 63 strains were isolated, of which 14 that presented at least one mechanism of growth promotion were selected. The identified strains belonged to 7 bacterial genera: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Paenarthrobacter*, *Weizmannia*, and *Staphylococcus*. The bacterial strains and bacterial filtrates showed significant statistical differences ( $p \leq 0.05$ ) with respect to the control. The best result was mainly observed with the strain *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56, which showed positive effect on plant height, number of leaves, root volume, stem diameter, leaf area and nitrogen content. In the case of bacterial filtrates, the one obtained from the strain CPOC56 showed the higher positive effect on plant height, leaf area, nitrogen and phosphorus content, and the filtrate from the strain CPOC48 showed the higher positive effect on root volume and potassium content. These results indicate that the inoculation of rhizobacterial strain and their filtrates could be used for acclimatization and growth of micropropagated sugarcane plants in greenhouse.

**Key words:** *tissue culture, beneficial microorganisms, bacterial cell-free supernatants, in-vitro plants.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante el doctorado y así poder cumplir una meta mas para mi formación profesional.

Al Colegio de Posgraduados Campus Montecillo y programa de posgrado en Edafología por la oportunidad que me brindó para realizar y lograr mis estudios de doctorado y al Campus Córdoba por abrirme las puertas de para poder desarrollar los experimentos en sus instalaciones.

Al Dr. Juan José Almaraz Suárez por aceptarme para poder realizar esta tesis, por sus consejos para mejorar este trabajo, por su paciencia y por compartir sus conocimientos en el área de la microbiología, para mi formación académica y desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Joel Velasco Velasco por su valioso apoyo y confianza para poder realizar la investigación en el Campus Córdoba, así como sugerencias para desarrollar actividades propuestas para realizar este trabajo.

Al Dr. Josafat Salinas Ruíz por apoyarme en la parte estadística de esta investigación, del cual he aprendido mucho y por ser parte de esta investigación.

Al Dr. Arturo Galvis Spínola por sus comentarios y sugerencias, por compartir sus conocimientos para mejorar el trabajo de investigación.

Al Dr. Julián Delgadillo Martínez por su apoyo, observaciones y sugerencias para el desarrollo de la investigación.

Al Dr. Jerico Bello Bello y a su equipo de trabajo del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales por apoyarme con los materiales vegetativos, así como los insumos necesarios para poder desarrollar esta investigación.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas y a Eduardo por compartir sus conocimientos y su apoyo para la extracción de DNA de mis cepas bacterianas.

A mis amigos(a) y compañeros(a) dentro y fuera del Colegio, por apoyarme y brindarme su amistad durante mi estadía en el doctorado, principalmente a Vivian, Rosita, Yuri, Orlando, Taña, Rosa Villafuerte, Eliud, Hugo, Josael, Rodrigo, Ana.

Al personal de laboratorio de microbiología, a doña Mary, Carlos por su apoyo durante el tiempo de trabajo en laboratorio.

A todas aquellas personas que en algún momento de mi vida estuvieron apoyándome y guiándome para poder lograr esta meta.

## DEDICATORIA

A Dios, por la vida, por darme la fortaleza de seguir adelante, a pesar de momentos difíciles.

A mis padres, muchas gracias por todo el apoyo incondicional, por sus consejos en todo momento, por estar en cada etapa de mi vida apoyándome y aceptarme, por comprenderme en los momentos mas difíciles, por su paciencia y por el amor que siempre me han brindado.

A mis cuatro hermanas, Erica, Liliana, Rossana, Angeles por su apoyo en todo momento, por su cariño y comprensión, a pesar de la distancia, alentarme y ayudarme en cada momento.

A mis sobrinas (os), Aliz, Amaya, Mechi, Lua, Emanuel, Miguel, por darme momentos de alegría y la fortuna de ser tío.

A mis abuelitos por su cariño y sus consejos de seguir adelante y su apoyo incondicional.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>v</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE CUADROS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xiv</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....</b>	<b>3</b>
<b>Objetivo general .....</b>	<b>3</b>
<b>Objetivos particulares .....</b>	<b>3</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>3</b>
<b>REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
<b>Cultivo de caña de azúcar en México.....</b>	<b>4</b>
<b>Crecimiento y manejo del cultivo de caña de azúcar .....</b>	<b>4</b>
<b>Producción de caña de azúcar en México .....</b>	<b>6</b>
<b>La fertilización de la caña de azúcar .....</b>	<b>7</b>
<b>Impactos en el rendimiento de caña de azúcar por la fertilización.....</b>	<b>8</b>
<b>Impactos ambientales por la fertilización en la caña de azúcar.....</b>	<b>9</b>
<b>Impactos de la fertilización en los parámetros agroindustriales en la caña de azúcar .....</b>	<b>10</b>
<b>Producción de plantas micropropagadas de caña de azúcar.....</b>	<b>10</b>



<b>Cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar.....</b>	<b>11</b>
<b>Importancia y funciones de las rizobacterias promotoras de crecimiento</b>	
<b>vegetal.....</b>	<b>13</b>
<b>Fijación de nitrógeno atmosférico .....</b>	<b>14</b>
<b>Solubilización de fosfato.....</b>	<b>16</b>
<b>Producción de sideróforos .....</b>	<b>17</b>
<b>Producción de fitohormonas .....</b>	<b>17</b>
<b>Giberelinas .....</b>	<b>18</b>
<b>Citoquininas.....</b>	<b>18</b>
<b>Ácido abscísico .....</b>	<b>19</b>
<b>Etileno .....</b>	<b>19</b>
<b>Auxinas.....</b>	<b>20</b>
<b>Diversidad de bacterias promotoras de crecimiento asociadas a caña de</b>	
<b>azúcar.....</b>	<b>21</b>
<b>Efectos de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal</b>	
<b>en el cultivo de caña de azúcar .....</b>	<b>23</b>
<b>CAPITULO I. BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO AISLADAS DE</b>	
<b>COMPOST Y SU EFECTO EN PLÁNTULAS MICROPROPAGADAS DE CAÑA</b>	
<b>DE AZÚCAR .....</b>	<b>29</b>
<b>1.1 RESUMEN .....</b>	<b>29</b>
<b>1.2 ABSTRACT .....</b>	<b>31</b>
<b>1.3 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>1.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>

1.4.1 Origen y descripción del compost utilizado.....	35
1.4.2 Caracterización cualitativa de cepas bacterianas por atributos promotores de crecimiento vegetal .....	36
1.4.3 Cuantificación de AIA y fosfato soluble.....	38
1.4.4 Identificación molecular.....	39
1.4.5 Efecto de cepas de bacterias inoculadas en plantas micropropagadas de caña de azúcar durante la fase de aclimatización en invernadero .....	40
1.4.6 Diseño experimental y análisis estadístico.....	42
1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	43
1.5.1 Características químicas de los compost .....	43
1.5.2 Poblaciones microbianas en compost .....	44
1.5.3 Aislamiento y caracterización cualitativa de cepas bacterianas.....	47
1.5.4 Cuantificación de AIA y solubilización de fosfato .....	49
1.5.5 Identificación molecular.....	51
1.5.6 Efecto de cepas de bacterias inoculadas en plantas micropropagadas de caña de azúcar durante la fase de aclimatación.....	53
1.5.5.1 Variables de crecimiento .....	53
1.5.5.2 Biomasa seca .....	57
1.5.5.3 Contenido nutrimental .....	59
1.6 CONCLUSIONES .....	62
<b>CAPITULO II. FILTRADOS BACTERIANOS EN LA ACLIMATACIÓN DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CAÑA DE AZÚCAR .....</b>	<b>64</b>

<b>2.1 RESUMEN .....</b>	<b>64</b>
<b>2.2 ABSTRACT .....</b>	<b>66</b>
<b>2.3 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>68</b>
<b>2.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>
<b>2.4.1 Cepas bacterianas utilizadas.....</b>	<b>70</b>
<b>2.4.2 Cinética de crecimiento y cuantificación de ácido indolacético (AIA) .....</b>	<b>71</b>
<b>2.4.3 Filtrados bacterianos para el experimento de aclimatación.....</b>	<b>72</b>
<b>2.4.4 Inoculación de filtrados bacterianos en plantas micropropagadas de caña de azúcar en la fase de aclimatización en invernadero .....</b>	<b>73</b>
<b>2.4.5 Diseño experimental y análisis estadístico .....</b>	<b>75</b>
<b>2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>76</b>
<b>2.5.1Cinética de crecimiento y cuantificación de ácido indolacético (AIA) .....</b>	<b>76</b>
<b>2.5.2 Inoculación de filtrados bacterianos en plantas micropropagadas de caña de azúcar en la fase de aclimatización en invernadero .....</b>	<b>81</b>
<b>2.5.2.1 Variables de crecimiento .....</b>	<b>81</b>
<b>2.5.2.2 Peso seco aéreo y de raíz.....</b>	<b>86</b>
<b>2.5.2.3 Contenido de nutrientes .....</b>	<b>88</b>
<b>2.6 CONCLUSIONES .....</b>	<b>90</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>92</b>
<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>93</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Extracción de nutrientes del suelo por el cultivo de caña de azúcar (Velasco, 2014) .....	7
Cuadro 1.1. Análisis químico de compost de cachaza de caña de azúcar mezclada con gallinaza en cuatro diferentes proporciones.....	43
Cuadro 1.2. Unidades formadoras de colonias (UFC) en compost de cachaza de caña de azúcar mezclada con gallinaza en cuatro proporciones diferentes. ....	44
Cuadro 1.3. Cepas bacterianas seleccionadas con algún mecanismo de promoción del crecimiento vegetal.....	48
Cuadro 1.4. Producción de ácido indolacético a las 24 y 48 h y fosfato soluble a los 7 días, de bacterias aisladas de compost.....	50
Cuadro 1.5. Especies de bacterias aisladas de compost de cachaza de caña de azúcar con gallinaza.....	51
Cuadro 1.6. Variables evaluadas de plántulas in vitro de caña de azúcar inoculadas con rizobacterias en la fase de aclimatización en invernadero. ....	55
Cuadro 1.7. Peso seco de parte aérea y raíz de plántulas in vitro de caña de azúcar, inoculadas con rizobacterias durante la fase de aclimatización en invernadero. ....	58
Cuadro 1.8. Contenido de N, P y K en plantas de caña de azúcar micropropagadas, inoculadas con rizobacterias. ....	59

Cuadro 2.1. Cepas bacterianas aisladas de composta de cachaza de caña de azúcar con gallinaza.....	71
Cuadro 2.2. Cepas bacterianas sembradas en caldo nutritivo y caldo nutritivo adicionado con triptófano .....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción de caña de azúcar en millones de toneladas de los principales estados productores en el cierre agrícola 2021 (SIAP, 2021). .....	6
Figura 2.1. Cinética de crecimiento de 9 cepas bacterianas a una densidad óptica de 600 nm A) sin presencia de triptófano B) con presencias de triptófano. *S/B= sin bacteria.....	76
Figura 2.2. Producción de ácido indolacético de 9 cepas bacterianas en un periodo de 0-96 h. A) Sin la presencia de triptófano; B) Con presencia de triptófano. *S/B= sin bacteria.....	78
Figura 2.3. Variables evaluadas en plantas micropropagadas de caña de azúcar, inoculadas con filtrados bacterianos en la fase de aclimatización en invernadero. A) Altura de planta; B) Volumen de raíz; C) Área foliar. *Promedios con diferente letra mostraron diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ). .....	82
Figura 2.4. Variables evaluadas en plantas micropropagadas de caña de azúcar, inoculadas con filtrados bacterianos en la fase de aclimatización en invernadero. A) Numero de hojas; B) Volumen de raíz; B) Diámetro de tallo. *Promedios con diferente letra mostraron diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ). .....	83
Figura 2.5. C) Peso seco aéreo y D) Peso seco de raíz en plantas micropropagadas de caña de azúcar, inoculadas con filtrados bacterianos en la fase de aclimatización en invernadero.....	86

Figura 2.6. Contenido de A) Nitrógeno, B) Fósforo y C) potasio en plantas micropropagadas de caña de azúcar micropropagadas e inoculadas con filtrados bacterianos. \*Promedios con diferente letra mostraron diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ). ..... 89

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Actualmente la caña de azúcar es un cultivo económicamente importante en el mundo y particularmente en regiones tropicales y subtropicales, es la principal fuente de azúcar con un consumo anual per cápita global de 22 kg (OCDE-FAO, 2021), en México el consumo alcanza hasta 37.5 kg per cápita (SIAP, 2021). Aun cuando el cultivo de caña de azúcar es ampliamente sembrado en muchos países del mundo para abastecer la demanda de azúcar, este enfrenta una serie de problemas relacionados con su propagación y manejo.

El manejo convencional y la siembra con esquejes, es un problema que enfrenta el cultivo de caña de azúcar, ya que hay una tasa de propagación muy baja, no hay un control de la calidad genética y las enfermedades causadas por patógenos es recurrente, afectando así la producción y los rendimientos (Miranda *et al.*, 2018).

La micropropagación de plantas, mediante el cultivo de tejidos es una alternativa para hacer frente a los problemas de reproducción de material vegetal, ya que asegura material vegetal disponible todo el año, producción de individuos uniformes y libres de patógenos, además contribuye al saneamiento de variedades comerciales (Lal, 2021). Una vez que se obtienen plantas por micropropagación estas tienen que adaptarse a su entorno, por lo que la aclimatación es una de las etapas más importantes en la propagación ya que es un proceso de adaptación y sobrevivencia de las plantas para seguir su crecimiento (Irsyadi, 2021). En esta fase los microorganismos benéficos podrían ayudar a la adaptación y al crecimiento de las plántulas (Panicker *et al.*, 2007; Bogino *et al.*, 2013).



El uso de microorganismos benéficos en la agricultura como las rizobacterias ha sido considerado como una alternativa para reducir dosis excesivas de fertilizantes químicos, dado que se ha observado que promueven el crecimiento de las plantas en diferentes cultivos ya se ha evaluado la inoculación de cepas bacterianas (Mahanty *et al.*, 2017). Las funciones de las rizobacterias como la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, producción de fitohormonas, sideróforos, degradación de compuestos celulolíticos, entre muchas otras, ayudan a promover el crecimiento de las plantas (Feng *et al.*, 2006; Madhi *et al.*, 2010). Además, las rizobacterias son capaces de producir antibióticos e incrementar resistencia a patógenos actuando como controladores biológicos (Olowe *et al.*, 2020). Por lo que el uso de rizobacterias benéficas en el cultivo de caña de azúcar puede ayudar a la aclimatización de plantas producidas *in-vitro* y reducir dosis de fertilizantes químicos una vez que las plantas inoculadas se vayan a campo ya que contribuyen al crecimiento de la planta mediante la producción de hormonas vegetales y la captación de nutrientes del suelo (Khan *et al.*, 2007). No obstante, en México los estudios realizados en cuanto al uso de rizobacterias promotoras de crecimiento en caña de azúcar son escasos, particularmente en la aclimatación de plántulas obtenidas por micropropagación, por lo que es un gran desafío estudiar, desarrollar y aplicar productos a base de rizobacterias que promuevan el crecimiento de las plántulas y que sean adaptables a condiciones locales de clima y suelo.

## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **Objetivo general**

Aislar y caracterizar cepas de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) de composta de cachaza de caña de azúcar con gallinaza y evaluar su efecto en plántulas micropropagadas de caña de azúcar.

### **Objetivos particulares**

- Aislar cepas de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal de composta de cachaza de caña de azúcar mezclada con gallinaza.
- Caracterizar y seleccionar cepas de rizobacterias con algún mecanismo de promoción de crecimiento vegetal.
- Evaluar el efecto de cepas bacterianas inoculadas en plantas micropropagadas de caña de azúcar, en la fase de aclimatización en invernadero.
- Evaluar el efecto de filtrados bacterianos inoculados en plantas micropropagadas de caña de azúcar, en la fase de aclimatización en invernadero.

### **Hipótesis**

Las cepas bacterianas aisladas de compost de cachaza de caña de azúcar con gallinaza presentan mecanismos promotores de crecimiento vegetal y la inoculación de éstas favorece la aclimatización y el crecimiento de plántulas micropropagadas de caña de azúcar en invernadero.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### **Cultivo de caña de azúcar en México**

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es una planta que se desarrolla en climas tropicales y subtropicales, pertenece a la familia Poaceae (Gramíneas), alcanza alturas de 2 a 5 m y tallos de hasta 6 cm de diámetro, divididos en nudos y entre nudos, alargados y sin ramificaciones (SAGARPA, 2017). El tallo de la caña de azúcar es la parte más importante de la planta, contiene alrededor de 75 % de agua y es la principal fuente de azúcar (Fischer *et al.*, 2012). También es la principal fuente de materia prima para la producción de biocombustible (Cardona *et al.*, 2010). Después de la extracción, los residuos pueden ser utilizados como materia prima para la producción de abonos orgánicos, alimento animal y alcohol, entre otros (SAGARPA, 2017).

### **Crecimiento y manejo del cultivo de caña de azúcar**

En México, las variedades de caña de azúcar CP 72-2086 y MEX 69-290 son las más cultivadas en el país y son propagadas convencionalmente mediante esquejes, provenientes de plantaciones anteriores (Miranda *et al.*, 2018). Para la siembra tradicional del cultivo, es necesario que los tallos cuenten con dos o tres entrenudos y se utilizan de 12 a 18 t ha<sup>-1</sup> de esquejes. El cultivo tiene un periodo que dura hasta 12 meses y puede prolongarse hasta los 14 o 17 meses y desde el momento de siembra hasta la cosecha, de acuerdo con Ortiz *et al.* (2016) se distinguen cinco etapas principales.

*Germinación y crecimiento:* Esta etapa inicia entre los 7 y 10 días después de la siembra. El crecimiento inicial puede prolongarse hasta los 35 días y es necesario un rango de temperatura de 24° a 37°C para que se pueda dar la brotación (Ortiz *et al.*, 2016).

*Amacollamiento y ahijamiento:* En esta fase se lleva a cabo el brote de varios tallos a partir de las articulaciones nodales que se encuentra en la base de los tallos primarios. Se da a partir de los 35-40 días después de la siembra. Durante esta fase es importante la fertilización con nitrógeno, ya que es esencial para el desarrollo vegetativo (Ortiz *et al.*, 2016).

*Rápido crecimiento:* Para esta etapa la caña de azúcar tiene una rápida elongación y se observa mayor acumulación de materia seca, alcanzado un máximo de área foliar. Comienza aproximadamente a los 120 días después de la siembra y la población de tallos queda definida a los 180 días. Esta fase depende de la temperatura, la humedad y la variedad. Finalmente, solo el 40 o 50% de los retoños sobreviven (Ortiz *et al.*, 2016).

*Maduración:* En esta fase se da el proceso de síntesis y acumulación de sacarosa en los tallos de caña de azúcar, el cual dura aproximadamente entre 2 a 3 meses. Algunos factores que favorecen la acumulación de sacarosa son; días calurosos y frescos, temperaturas de aproximadamente de 18°C por las noches, las aplicaciones elevadas o extemporáneas de nitrógeno retardan la maduración (Ortiz *et al.*, 2016).

*Soca:* La soca es otra fase del cultivo de caña de azúcar; es una serie de cultivos sucesivos que crece a partir del mismo tallo, luego de la cosecha del primer cultivo.

Esta etapa tiene una duración de 11 a 13 meses y consta de tres etapas: brotación, Amacollamiento, rápido crecimiento y maduración (Ortiz *et al.*, 2016).

### Producción de caña de azúcar en México

En México, la caña de azúcar es cultivada actualmente en 16 estados de la república (Figura 1), con un rendimiento promedio de 68.26 t ha<sup>-1</sup>, siendo Veracruz con la mayor producción (21,279,112.42 t) (SIAP, 2021). Tan solo en el 2021, en promedio se sembraron 852,750.87 ha, de las cuales fueron cosechadas 806,316.75 ha, obteniendo un valor de la producción de 46 mil 929 millones de pesos. Por lo tanto, la caña de azúcar considerado como un cultivo básico por la Ley de Desarrollo Rural Sustentable, debido a que se encuentra dentro de los 10 cultivos más consumidos por las familias mexicanas, con un consumo anual del endulzante per cápita promedio de 37.5 kg (SAGARPA, 2017; SIAP, 2021).

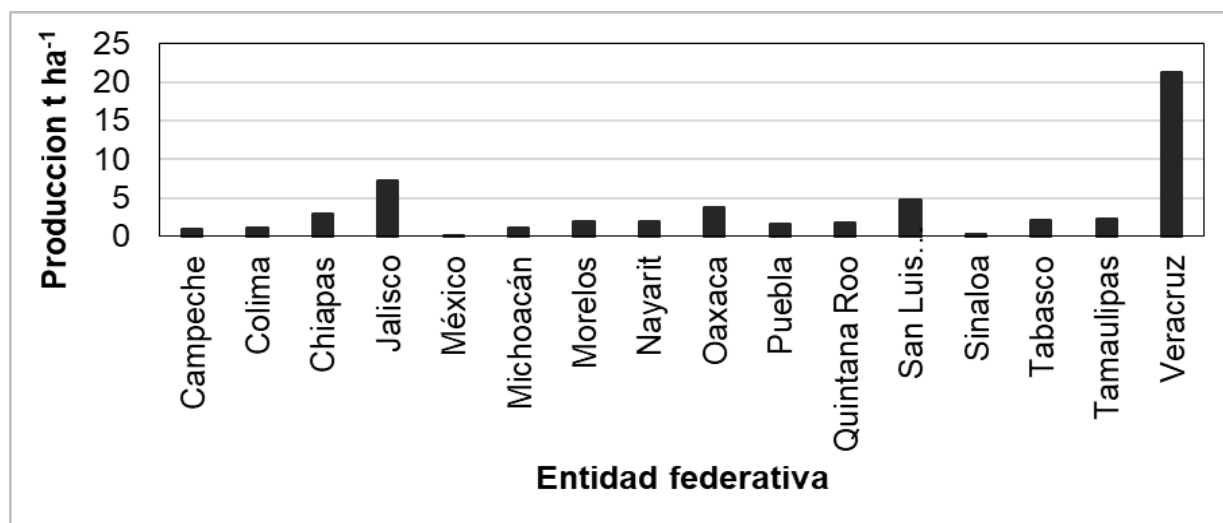


Figura 1. Producción de caña de azúcar en millones de toneladas de los principales estados productores en el cierre agrícola 2021 (SIAP, 2021).

## La fertilización de la caña de azúcar

La caña de azúcar es considerada como un cultivo altamente extractor de nutrientes del suelo, requiere considerables dosis de fertilización de macro y micronutrientes para su desarrollo, debido a su alta capacidad de producción de biomasa como: tallos, follaje, y raíces, en algunas zonas productoras, la caña de azúcar puede alcanzar hasta 100 t ha<sup>-1</sup> de peso fresco y en materia seca de entre 20 y 35 t ha<sup>-1</sup> en incluso cantidades mayores. Los principales nutrientes extraídos por la planta son: potasio y silicio, seguidos por nitrógeno y fósforo (Cuadro 1). Uno de los principales requerimientos de la planta es el nitrógeno por lo que la fertilización nitrogenada es importante para el cultivo; además, algunos suelos pueden requerir aportes de fósforo y, en casos especiales, de potasio (Velasco, 2014). Algunos autores recomiendan para caña de azúcar dosis de fertilizantes integradas de 130 unidades de nitrógeno (N), 39 de fósforo P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (P), 280 de potasio KO<sub>2</sub> (K), 47 de calcio (Ca), 47 de magnesio (Mg) y 60 de azufre (S) (Hernández *et al.*, 2008).

**Cuadro 1. Extracción de nutrientes del suelo por el cultivo de caña de azúcar (Velasco, 2014)**

Nutrientes	Cantidad extraída (kg ha <sup>-1</sup> por año)
Potasio	300-350
Silicio	200-300
Nitrógeno	130-200
Fosforo	80-100
Calcio	55-60
Magnesio	35-45
Azufre	20-30

## **Impactos en el rendimiento de caña de azúcar por la fertilización**

La aplicación de fertilizantes químicos, tienen un alto costo económico y ambiental, debido a que su fabricación implica el uso de una gran cantidad de energía. La dosis de fertilización nitrogenada aplicada al cultivo de caña de azúcar ha ido aumentando con el paso de los años. En los últimos 15 años, la dosis de fertilizantes nitrogenados aplicados al cultivo de caña ha aumentado hasta en un 60 %, con dosis que se incrementaron de 100 kg ha<sup>1</sup> hasta 254 kg ha<sup>-1</sup> (Moreno *et al.*, 2016).

En México el rendimiento de caña de azúcar a nivel nacional es bajo, en comparación con países como Brasil o India. En el cierre del año 2019 el rendimiento promedio nacional de caña de azúcar fue de 75.35 t de caña ha<sup>-1</sup>, mientras que en el 2021 fue de 68.26 t de caña ha<sup>-1</sup>, lo cual muestra una disminución del rendimiento de un 9.4 % en los últimos dos años, debido principalmente a la pandemia (SIAP, 2022). En relación con la dosis de fertilizante, la aplicación excesiva de estos afecta el rendimiento. Se ha observado que aplicar una dosis de fertilizante nitrogenado de 224 kg ha<sup>-1</sup> se obtiene un rendimiento de 103.1 t ha<sup>-1</sup>, mientras que, cuando se emplean dosis más altas hay una pérdida económica considerable dado que el rendimiento de la caña de azúcar tiende a mantenerse e incluso reducirse (Moreno *et al.*, 2016).

Además, no solo la fertilización influye en el rendimiento de la caña de azúcar, otros factores como el tipo de suelo, la variedad de la planta, el clima, así como el tipo de riego, también juegan un papel importante en el rendimiento (Uribe *et al.*, 2013). Pérez y Rodríguez (2015) mencionan que, para realizar un uso y aprovechamiento eficiente de los fertilizantes, es importante un análisis del suelo para determinar los nutrientes

disponibles y determinar la dosis adecuada de fertilizante que debe utilizarse para alcanzar los mejores rendimientos.

### **Impactos ambientales por la fertilización en la caña de azúcar**

Actualmente el uso excesivo de fertilizantes en la producción de caña de azúcar está afectando de manera negativa los ecosistemas naturales, provocando la lixiviación de algunos nutrientes solubles hacia las capas más profundas del suelo, variaciones en el pH, salinidad y disminución de la fertilidad de los suelos cañeros (Stamford, 2014).

La emisión de gases de efecto invernadero como el óxido nitroso, es otro efecto que tiene la aplicación de fertilizantes en exceso en el cultivo de caña de azúcar. Filoso *et al.* (2015) mencionan que los valores del factor de emisión para N<sub>2</sub>O oscilan entre 0.20 a 14.9 %, el cual es un valor representativo que relaciona la cantidad de contaminante emitido a la atmósfera con una actividad asociada a la emisión de dicho contaminante, estos valores están influenciados por el tipo de suelo, el ciclo del cultivo y el tipo fertilizante aplicado.

La aplicación de 100 kg ha<sup>-1</sup> de nitrato de amonio tiene un factor de emisión menor (0.21 %) comparado con la aplicación de 60 kg ha<sup>-1</sup> de urea, alcanzando un factor de emisión de 1.11 % (Do Carmo *et al.*, 2013). La combinación de los fertilizantes con residuos de la industria azucarera como la vinaza, residuo de la destilación, tiende a aumentar los factores de emisión de gases de efecto invernadero como el óxido nitroso (Pitombo *et al.*, 2015).



## **Impactos de la fertilización en los parámetros agroindustriales en la caña de azúcar**

Los fertilizantes nitrogenados en exceso también afectan la pureza del jugo de caña de azúcar, un importante indicador de calidad de la caña de azúcar. La pureza del jugo de caña de azúcar disminuye en un 11 % cuando el cultivo es fertilizado con 525 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno, comparado con una fertilización con 300 kg ha<sup>-1</sup> de nitrógeno (Yang *et al.*, 2013), esta disminución en la pureza se puede observar desde el primer ciclo de cultivo cuando la aplicación del fertilizante nitrogenado es excesiva (Wiedenfeld, 1995; Dao *et al.*, 2011). Asimismo, la aplicación de fertilizantes nitrogenados a dosis mayores de 268 kg ha<sup>-1</sup>, disminuye la concentración de azúcar en los tallos (Muchow *et al.*, 1996; Franco *et al.*, 2011).

## **Producción de plantas micropropagadas de caña de azúcar**

Otro de los desafíos, que enfrenta actualmente el cultivo de caña de azúcar es la reproducción de plantas de forma masiva. Esto debido a que la planta es la materia prima para la producción de etanol y edulcorante (Bordonal *et al.*, 2018). Como se ha mencionado, la caña de azúcar es sembrada convencionalmente como esquejes, sin embargo, la tasa de propagación es muy baja, la calidad genética no se controla y la transmisión de patógenos a la planta es muy frecuente, por lo que la producción y los rendimientos agroindustriales se ven afectados (Miranda *et al.*, 2018). Por lo tanto, una alternativa es la micropropagación de plantas mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales (Sime, 2013). En México se ha introducido la reproducción *in vitro* de caña de azúcar en la última década con el objetivo de obtener plantas genéticamente

homogéneas, más vigorosas y libre de patógenos (Bello y Flores, 2016). Las principales investigaciones en cultivo *in vitro* de caña de azúcar están encaminadas a protocolos de multiplicación, tolerancia a factores abióticos, anoxia, variabilidad genética y bancos de germoplasma (Bello *et al.*, 2014; Castañeda *et al.*, 2014a; Rodríguez y Romero, 2014).

### **Cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar**

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* es una forma de reproducción asexual, que se basa en la totipotencia celular y tiene la finalidad de la regeneración y multiplicación de material vegetal a partir de un explante aséptico; el cual puede ser el ápice, una hoja, tallo, meristemo, embrión, nudo o semilla en un medio controlado y bajo condiciones de asepsia (Kumar y Singh, 2009). Los explantes son sembrados en un medio de cultivo estéril, siendo el medio Murashige y skoog el más utilizado. Este contiene todos los nutrimentos y vitaminas necesarios para el desarrollo de los explantes, así como hormonas y reguladores de crecimiento como las auxinas, que son agregados al medio para conseguir la micropropagación de una planta (Castañeda *et al.*, 2009).

Según Lal (2021), algunas ventajas observadas de la micropropagación de plantas en caña de azúcar son: tasa de propagación más rápida, material vegetal disponible en todas las estaciones del año, producción de individuos uniformes, evita la aparición de patógenos o eliminación de estas antes de la siembra, saneamiento de variedades comerciales afectadas por enfermedades, entre otras.

Para la micropropagación de caña de azúcar se utiliza principalmente el meristemo apical ya que éste tiene la capacidad de diferenciarse a células especializadas y reproducirse para generar una nueva plántula (Henz y Mee, 1969; Rangel *et al.*, 2016). Los pasos para el cultivo *in vitro* de caña de azúcar son principalmente: a) establecimiento del cultivo aséptico, b) inducción y multiplicación de brotes, c) alargamiento y enraizamiento de plantas y d) aclimatación a condiciones *ex vitro* (Lal y Krishna, 1994; Rangel *et al.*, 2016).

La aclimatación, es quizá una de las etapas más importantes en el cultivo de tejidos vegetales ya que de esta etapa depende el éxito de la técnica, la eficiencia y la calidad de las plantas obtenidas *in vitro* (Irsyadi, 2021). Este es un proceso de supervivencia y adaptación de las plantas para seguir su desarrollo y reducir su mortalidad (Scortecci *et al.*, 2012), ya que durante el proceso de cultivo *in vitro* se eliminan microorganismos patógenos, así como microorganismos benéficos para poder ayudar a la planta en su crecimiento, desarrollo y a tolerar el estrés abiótico al que son sometidas (Panicker *et al.*, 2007; Bogino *et al.*, 2013).

Los problemas relacionados con el uso de dosis excesivas de fertilizantes químicos y los retos que enfrenta la reproducción de plantas de caña de azúcar han propiciado la búsqueda de alternativas de producción enfocadas a una agricultura sustentable, mediante el uso de microorganismos benéficos como las bacterias promotoras de crecimiento vegetal que contribuyan a la reducción de dosis sin afectar el rendimiento y la propagación de plantas (Leite *et al.*, 2018).

## **Importancia y funciones de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal**

Los microorganismos tienen gran importancia, debido a que participan en los procesos biogeoquímicos que ocurren en el suelo, por lo que mantener la vida de estos es vital para el desarrollo de las plantas (Andreote y Silva, 2017). Las plantas son colonizadas por una gran variedad de microorganismos del suelo, principalmente bacterias. Estas pueden agruparse en simbióticas, endófitas y de vida libre. Las rizobacterias son capaces de colonizar y desarrollar parte de su vida dentro de los tejidos de la planta, donde ambos obtienen un mutuo beneficio, la planta ofrece refugio y compuestos carbonados a la bacteria para sobrevivir, mientras que ésta puede estimular el crecimiento de la planta mediante la producción de fitohormonas, por lo que su uso en los cultivos ha sido muy valioso (Hardoim *et al.*, 2015).

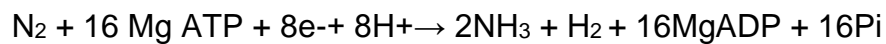
La importancia que han tenido estas bacterias en las últimas décadas es debido a la capacidad que tienen de contribuir a mejorar la fertilidad de los suelos, al hacer disponible y aportar uno de los macronutrientes más importantes para el desarrollo de las plantas como el nitrógeno (Alam *et al.*, 2018); un elemento necesario para todas las formas de vida existentes en el mundo, ya que juega un papel dentro de los compuestos químicos como las proteínas, ácidos nucleicos y muchos otros (Berger *et al.*, 2013). Sin embargo, la función de las bacterias va más allá de aportar nitrógeno a la planta, también tienen la función de descomponer la materia orgánica y liberar nutrientes al suelo (Madhi *et al.*, 2010), producir fitohormonas y sideróforos, solubilizar fosfato del suelo y degradar compuestos contaminantes, lo que ayuda a promover el crecimiento de las plantas (Feng *et al.*, 2006).

Además, estos microorganismos son capaces de producir antibióticos e incrementar resistencia a patógenos actuando como controladores biológicos (Olowe *et al.*, 2020). Las bacterias tienen dos formas de promover el crecimiento vegetal, mediante mecanismos directos o mecanismo indirectos (Mahanty *et al.*, 2017). Los mecanismos directos son los más conocidos e importantes ya que facilitan la adquisición de nutrientes mediante la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato y quelación de hierro por medio de los sideróforos, haciéndolo disponible para las plantas.

### **Fijación de nitrógeno atmosférico**

Para que las plantas puedan utilizar y asimilar fácilmente el nitrógeno (N), es importante transformar el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) mediante un proceso de fijación biológica. La fijación biológica de nitrógeno es el proceso en el cual el  $N_2$  es transformado en amoníaco ( $NH_3$ ), mediante un complejo enzimático llamado nitrogenasa (Vitousek *et al.*, 2002; Tairo y Ndakidermi, 2013). Según Smercina *et al.* (2019), se pueden distinguir dos procesos de fijación biológica; a) Fijación de nitrógeno en simbiosis, la cual sucede mediante la simbiosis entre bacterias específicas y plantas, principalmente leguminosas, en donde se observa la formación de nódulos en las raíces y b) fijación de vida libre, que ocurre sin una simbiosis formal, llevada a cabo por diferentes especies de bacterias de la rizosfera, sin formar estructuras en la raíz. Entre los microorganismos fijadores de nitrógeno, se pueden observar diferencias en su morfología y fisiología, aun cuando, el proceso de fijación y el sistema enzimático es semejante entre todos los organismos (Fernández *et al.*, 2002).

El complejo de proteína nitrogenasa es el que lleva a cabo la fijación del nitrógeno atmosférico y está comprendido por dos metaloproteínas: Mo-Fe proteína (Dinitrogenasa) y Fe-proteína (Dinitrogenasa reductasa). La dinitrogenasa reductasa proporciona electrones a la dinitrogenasa (en donde sucede la verdadera reducción de nitrógeno) y se necesitan dos Mg ATP por cada electrón (e-) usado en el proceso de reducción del nitrógeno, por lo que en total se utilizan 16 Mg ATP, además se necesitan 8 moléculas de hidrógeno para que la dinitrogenasa pueda reducir el N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub>, representado por la siguiente ecuación (Halblieb *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2002; Franche *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2013):



Para el caso de fijación de nitrógeno de vida libre, el amoniaco (NH<sub>3</sub>) producido por la nitrogenasa, es convertido rápidamente en amonio (NH<sup>4+</sup>), este producto se une al ácido glutámico en presencia de la enzima glutamina sintasa y ATP, posteriormente mediante la enzima glutamina-2-oxoglutarato-amino-transferasa, el ácido glutámico puede convertirse de nuevo en glutamato (Dixon y Kahn, 2004). Finalmente, parte de la glutamina formada, se considera como un compuesto neto de la fijación, lo cual puede ser transferida a aminoácidos (Fernández *et al.*, 2002). Tchan (1988) menciona que los fijadores de vida libre pueden incorporar el nitrógeno en su propia biomasa y después hacerlo disponible a la planta de manera indirecta mediante la mineralización.

Por otra parte, la fijación de nitrógeno en simbiosis a diferencia de la fijación de nitrógeno de vida libre se realiza en estructuras morfológicamente definidas, llamadas nódulos, se da principalmente entre bacterias conocidas colectivamente como rizobios

y leguminosas. Este proceso consta de 4 etapas bien conocidas: reconocimiento, infección, desarrollo del nódulo y finalmente la fijación de nitrógeno (Franche *et al.*, 2009). Las reacciones de reducción del nitrógeno (fijación) tanto en rizobios como en los fijadores de vida libre son las mismas, no obstante, en los rizobios, que viven en los nódulos, los productos finales son exportados a través del xilema de las plantas hacia la parte aérea, en donde el nitrógeno reducido es utilizado para la síntesis de aminoácidos, proteínas y otros compuestos (Fernández *et al.*, 2002). En el caso de los rizobios, el oxígeno puede inhibir la actividad del complejo enzimático, pero la presencia de la proteína leghemoglobina dentro de los nódulos regula la concentración de oxígeno protegiendo a la nitrogenasa (Smith *et al.*, 2013).

### **Solubilización de fosfato**

En el suelo se encuentra una gran cantidad de fósforo, sin embargo, la mayoría es insoluble y no está disponible para que las plantas puedan aprovecharlas, por lo que la presencia de bacterias solubilizadoras de fosfato es de gran importancia (Mahdi *et al.*, 2012).

La solubilización de fosfatos en el suelo se debe a la acción de los ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el ácido glucónico y el ácido cítrico que producen las bacterias. Los grupos hidroxilo (OH) y carboxilo (COOH) de estos ácidos quelan los cationes unidos al fosfato y lo convierten en una forma inorgánica soluble. Otra vía que utilizan las bacterias para hacer disponible el fosfato es la mineralización que se da por la acción de las fosfatasas bacterianas sobre los complejos de fosfatos orgánicos, las cuales catalizan el proceso de hidrólisis que conduce a la liberación de los fosfatos.

Cuando las plantas incorporan estas moléculas de fósforo solubilizadas o mineralizadas, aumentan gradualmente su crecimiento y aumenta el rendimiento del cultivo (Glick *et al.*, 2012).

### **Producción de sideróforos**

El hierro es otro de los nutrientes importantes para el desarrollo de plantas y animales y para casi todas las formas de vidas presentes. Por su predominancia como  $\text{Fe}^{3+}$ , existe una alta probabilidad que se encuentre insoluble al formar hidróxidos y oxihidróxidos, por lo que su disponibilidad para las plantas es nula; sin embargo, las bacterias pueden adquirir el hierro mediante la secreción de sideróforos, compuestos quelantes que tienen una gran afinidad por dicho elemento y son capaces de reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (Rajkumar *et al.*, 2010). Los sideróforos son péptidos o moléculas de bajo peso molecular, que tienen la habilidad de secuestrar el hierro en su forma insoluble ( $\text{Fe}^{3+}$ ), convertirlo en un modo soluble ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y absorbible para las plantas, además se ha observado que estos compuestos secretados por las bacterias poseen un gran potencial para el control biológico de hongos y bacterias fitopatógenas (Beneduzi *et al.*, 2012).

### **Producción de fitohormonas**

Las hormonas vegetales son compuestos orgánicos naturales que intervienen en los procesos fisiológicos y morfológicos para el desarrollo y crecimiento de las plantas (Parewa *et al.*, 2018). Estas son activas en concentraciones muy bajas, con una estricta regulación de síntesis y respuesta, muchas hormonas vegetales tienen funciones clave en las interacciones entre las plantas y los microorganismos benéficos



(Mekonnen y Kibret, 2021). Las bacterias al entrar en contacto con la raíz son capaces de producir algunas hormonas vegetales, de las cuales destacan las auxinas, las giberelinas, las citoquininas, el ácido abscísico y el etileno (Egamberdieva *et al.*, 2017).

### **Giberelinas**

Las giberelinas son hormonas vegetales producida por plantas superiores, hongos y bacterias (Patel y Minocheherhomji, 2018). La función principal de las giberelinas es la elongación del tallo, pero también juegan un papel importante en la germinación de semillas, desarrollo de flores y frutos, así como en el crecimiento de hojas (Egamberdieva *et al.*, 2017). Dentro de la gran variedad de géneros bacterias promotores de crecimiento que se han destacado por producir esta hormona vegetal son: *Acetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum lipoferum*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, entre otras (Vaikuntapu *et al.*, 2014).

### **Citoquininas**

Las citoquininas son fitohormonas que tienen las funciones de promover la división celular, alargamiento celular y la expansión de tejidos en diferentes estructuras de las plantas (Nasir, 2016). Algunas bacterias que tienen la habilidad de producir estas hormonas vegetales pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Klebsellia*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Agrobacterium* y *Arthorbacter* (Premachandra *et al.*, 2016; Lamia *et al.*, 2017). También se ha observado que la aplicación exógena de citoquininas en plantas tiene efectos positivos en la germinación de semillas, el crecimiento de brotes, expansión y

desarrollo de la hoja, además, retarda la senescencia de las plantas (Patel y Minocheherhomji, 2018).

### **Ácido abscísico**

El ácido abscísico es otra fitohormona clave en la regulación del crecimiento de las plantas, regula y mantiene la dormancia de las semillas y estimula la maduración de estas, también juega un papel importante en la adaptación y respuesta al estrés abiótico (Wilkinson *et al.*, 2012). Aunque el ácido abscísico en pequeñas cantidades tiene un efecto positivo en el crecimiento de las plantas, se ha observado que el incremento de esta fitohormona, por estrés salino, inhibe el desarrollo de especies vegetales como *Brassica napus*, *Zea mays* y *Phaseolus vulgaris*, no obstante, las bacterias halotolerantes son capaces de reducir la biosíntesis de la hormona vegetal, mitigando su efecto negativo (Khan *et al.*, 2021).

### **Etileno**

El etileno es una fitohormona de suma importancia, tiene diferentes funciones biológicas en el desarrollo y crecimiento de las plantas, dentro de las cuales resaltan: induce el enraizamiento, reduce la marchitez de las plantas, influye en la maduración de los frutos, estimula la germinación de semillas y también funciona como activador de otras fitohormonas (Ahmed *et al.*, 2017). Cambios en la concentración de etileno puede causar efectos negativos en las plantas como la inhibición del crecimiento y elongación de la raíz (Vaseva *et al.*, 2018), por lo que la presencia de la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa (ACC desaminasa), producida por las bacterias, es importante para regular los niveles de etileno (Singh *et al.*, 2019). Algunos

géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Agrobacterium* se han destacado por tener la capacidad de sintetizar la ACC desaminasa (Ahmed *et al.*, 2017).

## **Auxinas**

Las auxinas tienen la capacidad de dirigir e intervenir en los procesos de división, elongación y diferenciación celular; dentro de este grupo de auxinas se encuentra el ácido indol-butírico (IBA), el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido  $\alpha$ -naftalenacético (NAA) y el ácido 3-indol-acético (AIA), siendo esta última la principal auxina producida de manera natural y también secretada por bacterias (Garay *et al.*, 2014).

El ácido indolacético (AIA) es una auxina natural que se encuentra en la mayoría de las plantas, tienen la función de regular diversos procesos de desarrollo vegetal, tales como mejorar los procesos de germinación de semillas, desarrollo de raíces y nutrición de las plantas (Castillo *et al.*, 2005). Además, estimula el desarrollo y cambios morfológicos en la raíz, incrementando la ramificación y producción de pelos radicales (da Silva *et al.*, 2022). El AIA es producto del metabolismo del triptófano, ya que las bacterias productoras de esta auxina toman este compuesto como precursor. Se ha comprobado que el 80 % de las bacterias que han sido identificadas como promotoras de crecimiento vegetal tienen la capacidad producir ácido indolacético a través del triptófano, de las cuales destacan algunos géneros como: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, entre otros (Patten y Glick, 1996; Spaepen *et al.*, 2007; Aeron *et al.*, 2021).

## **Diversidad de bacterias promotoras de crecimiento asociadas a caña de azúcar**

Muchas bacterias promotoras de crecimiento vegetal asociadas al cultivo de caña han sido aisladas principalmente de la rizosfera, el cual es la parte del suelo próxima a las raíces, donde existe una gran actividad microbiana (Lugtenberg, 2015); también han sido aisladas de hojas, tallos, raíces y compost (Chin *et al.*, 2017; Muthukumarasamy *et al.*, 2017). Dentro de este grupo destacan las bacterias que tienen la capacidad de colonizar las raíces y otros tejidos vegetales al igual que la habilidad de fijar de nitrógeno, solubilizar fosfatos y producir ácido indolacético (Antoun, 2013).

Los principales estudios realizados en caña de azúcar son sobre su asociación con las bacterias endófitas, que colonizan el tejido interno de las raíces, una de ellas es *Gluconacetobacter diazotrophicus*, la cual es altamente específica para cultivos ricos en azúcar y también se puede hallar en la rizósfera, en raíces, tallo y hojas (Reis *et al.*, 1994) e incluso en el jugo de caña de azúcar (Muthukumarasamy *et al.*, 1994). Esta bacteria además de fijar nitrógeno y producir sustancias que promueven el crecimiento de la planta, puede tolerar ambientes ácidos (Boddey *et al.*, 2003). Alam *et al.* (2018) mediante una caracterización molecular identificaron otras bacterias asociadas a la caña de azúcar, pertenecientes a los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Kosakonia*, y *Pantoea*, las cuales tienen también la capacidad de fijar nitrógeno, producir ácido indolacético y sideróforos. Asimismo, géneros como *Burkholderia*, *Pantoea* y *Herbaspirillum* han sido aislados en cultivos de caña de azúcar y se ha observado que tienen el potencial de ser utilizados como biofertilizantes (Olivares *et al.*, 1996; Loiret *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2004). *Bradyrhizobium sacchari* es otra especie de bacteria relativamente nueva, tiene una asociación con el cultivo de caña de azúcar, fue aislada

de raíces; miembros del género son comúnmente conocidos por establecer simbiosis con leguminosas e inducir la formación de nódulos (Feitosa *et al.*, 2017). Patel *et al.* (2019) mencionan que 26 cepas de bacterias pertenecientes a los phyla proteobacteria, firmicutes y bacteroidetes, fueron aisladas de la rizosfera de varios cultivares caña de azúcar, mostrando la habilidad de solubilizar trifosfato de calcio, producir sideróforos, crecer en medio libre de nitrógeno y producir ácido indolacético.

Pirhadi *et al.* (2017) observaron una alta diversidad de bacterias aisladas de raíces, vástagos y hojas de caña de azúcar, que pueden crecer bajo condiciones salinas, en el cual destaca el género *Enterobacter* por ser un productor de auxinas; *Pseudomonas* demostró ser el mayor solubilizador de fosfato y *Paenibacillus* y *Enterobacter* como los principales fijadores de nitrógeno atmosférico. Por otra parte, algunas bacterias aisladas de raíces y tallos de caña de azúcar como *Burkholderia gladioli* puede sobrevivir a diferentes niveles de salinidad y a pH entre 5.5-7.3 sin afectar la capacidad de solubilizar fosfato (Leite *et al.*, 2018). Otras bacterias aisladas de caña de azúcar y que han mostrado la habilidad de solubilizar fosfato pertenecen a los géneros: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus* y *Azotobacter* (Rodríguez y Fraga, 1999; Wahla y Shukla, 2017). El compost también representa una fuente de una gran diversidad de bacterias promotoras de crecimiento vegetal. Chin *et al.* (2017) aislaron 100 cepas bacterianas en compost, que pertenecían a los géneros o *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, y *Kosakonia*, varias de las cuales tenían capacidad promotora de crecimiento vegetal; además *Bacillus licheniformis*, aislado del compost, tiene la capacidad de degradar celulosa y tolerar altas temperaturas durante el proceso de compostaje (Zainudin *et al.*, 2022).

## **Efectos de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el cultivo de caña de azúcar**

Varias investigaciones han evaluado la respuesta del cultivo de caña de azúcar a la inoculación de cepas bacterianas (Mahanty *et al.*, 2017). También, se han encontrado buenos resultados en el crecimiento de cultivos como maíz, trigo y arroz con la inoculación de bacterias endófitas como *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Enterobacter*, aisladas de caña de azúcar.

De las diferentes funciones que las bacterias realizan, una de las más importantes es la fijación de nitrógeno, ya que, a través de este proceso, las plantas pueden adquirir parte del nutriente que necesitan para su desarrollo. Un estudio sobre el balance de nitrógeno para el cultivo de caña de azúcar indicó que el 71 % del nitrógeno acumulado en la planta proviene de la fijación biológica, mientras que el 29 % es adquirido del suelo y de la aplicación de fertilizantes (Lima *et al.*, 1987). En algunas variedades de caña, se encontró que anualmente, al menos 40 kg N ha<sup>-1</sup> contenido en las estructuras de las plantas proviene de la fijación biológica llevada cabo por las bacterias endofíticas (Urquiaga *et al.*, 2012).

Por su parte, Bhor *et al.* (2006) mencionan que arriba del 40% de nitrógeno en plantas inoculadas es debido a la fijación de nitrógeno realizada por *Gluconacetobacter diazotrophicus*, lo cual incrementó los rendimientos entre 10 a 25 %. En plantas micropropagadas de caña de azúcar cultivadas en macetas con suelo e inoculadas con *G. diazotrophicus* y *Herbaspirillum spp.* se observó que la fijación de nitrógeno fue muy baja (9% y 15%, respectivamente) después de un crecimiento de 12 meses, pero la

inoculación de consorcios bacterianos integrada por *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum spp.*, *Azospirillum amazonense* y *Burkholderia sp.* resultó en una mayor aportación de nitrógeno fijado con el 29% (Oliveira *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2012).

Similarmente, Walsh *et al.* (2006), encontraron resultados similares cuando se inocularon cultivares de caña de azúcar australianos con *G. diazotrophicus*, lo cual resultó en una baja fijación de nitrógeno en las plantas, esto probablemente se deba a la infección y la colonización de la planta por parte de la bacteria, ya que, aunque la infección se llevo a cabo, la carga bacteriana endófito en el interior de los tejidos fue baja; otro factor que puede afectar este resultado fueron la aplicación de diferentes tasas de fertilizantes y las condiciones del suelo, puesto que el tipo de suelo utilizado afecta la funcionalidad de algunas bacterias para fijar nitrógeno, ya que la sobrevivencia de *Gluconacetobacter diazotrophicus* esta relacionada con la materia orgánica del suelo. También, el género *Acidithiobacillus* junto con la bacteria diazotrófica *Beijerinckia indica*, han mostrado efectos positivos en la planta, debido a la fijación de nitrógeno y la capacidad de aumentar la disponibilidad de nutrientes del suelo, principalmente como nitrato y amonio, además de fósforo y potasio (Oliveira *et al.*, 2017).

Los efectos positivos de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en caña de azúcar también son visibles en los parámetros de crecimiento, tales como altura, diámetro de tallo, área foliar y biomasa. Al respecto Lopes *et al.* (2019) evaluaron dos ciclos de cultivo de caña de azúcar y encontraron que al inocular plantas con *Azospirillum brasilense* (Triazo), las plantas alcanzaron una altura de 2.02 m y diámetro de tallos 2.08 cm, la misma respuesta se observó con el inóculo de

consorcios bacterianos a base de bacterias de las especies *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* y *B. troica*.

También se ha observado que la inoculación de *G. diazotrophicus* en plántulas de caña de azúcar aumenta el número de brotes en 56.4 % a los 30 días y alcanza un rendimiento promedio de 84.32 t ha<sup>-1</sup> en un ciclo de cultivo (Murumkar *et al.*, 2017). La bacteria endófito *Klebsiella variicola* también tuvo efectos positivos en el crecimiento de plántulas de caña de azúcar, mostrando estas mayor peso seco y contenido de N después de 14 días. Esta bacteria también aumentó los pesos secos de raíces, brotes y plántulas enteras en 43, 36 y 39%, respectivamente e incrementó el contenido de N en raíces, brotes y plántulas enteras en 38, 43 y 42% respectivamente, en la variedad de caña de azúcar ROC22 (Wei *et al.*, 2014). Similarmente en estudios realizados en la India, se encontraron que bacterias del género *Burkholderia gladioli* y *Roseateles terrae* inoculadas en plantas de caña de azúcar promovieron el crecimiento de las plantas. Se observó que la acumulación de biomasa se incrementó hasta en un 66% con *Burkholderia gladioli* y 16 % con *Roseateles terrae*, también se observó mayor contenido de nitrógeno en las hojas con 0.88 mg g<sup>-1</sup> y 1.39 mg g<sup>-1</sup> respectivamente, comparadas con plantas no inoculadas (Muthukumarasamy *et al.*, 2017).

Otras cepas de bacterias de las especies *Pseudomonas luteola*, *P. fluorescens*, *Ochrobactrum anthropi* y *Stenotrophomonas maltophilia* inoculadas en las plantas de caña de azúcar incrementaron el índice de área foliar en un 49 % con respecto a plantas no inoculadas (Morgado *et al.*, 2015). Asimismo, en experimentos realizados en Cuba con la inoculación de *Azospirillum sp.* en caña de azúcar se obtuvieron



rendimientos de 16 a 25.5 t ha<sup>-1</sup> cuando se aplicaron dosis de entre 50 y 100 kg ha<sup>-1</sup> de inóculo de forma sólida y enterrada, después del corte y en cepas de retoño, comparado con el uso de fertilizantes químicos en el cual tuvieron rendimientos de 4.9 a 13.6 t ha<sup>-1</sup> (Torriente, 2010).

En investigaciones en Brasil se reportaron que la combinación de residuos agroindustriales y la inoculación de bacterias tienen impactos benéficos en el crecimiento de caña de azúcar, observándose rendimientos de tallos de 70.9 y 86.6 t ha<sup>-1</sup> cuando se aplicó 1 t ha<sup>-1</sup> de biofertilizante (NPKB 150) sin y con cachaza (60 t ha<sup>-1</sup>), respectivamente, mayor altura (2.25 m), y mayor diámetro de tallo (2.22 cm) así como efectos positivos en el total de sólidos solubles (Brix), contenido de sacarosa (Pol) y porcentaje de pureza, comparado con fertilizantes minerales aplicados a diferentes dosis (Oliveira *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2017). El género *Acidithiobacillus* junto con la bacteria diazotrófica *Beijerinckia indica*, también han mostrado buenos resultados en la absorción de nutrientes en las partes de la planta como tallo y hojas, debido a la fijación de nitrógeno y la capacidad de aumentar la disponibilidad de nutrientes del suelo (Oliveira *et al.*, 2017). De igual forma, la aplicación de biofertilizante, preparado con *Bacillus megatherium*, en diferentes variedades de caña de azúcar, incrementó la altura de caña, diámetro de tallos, porcentaje de grados brix y porcentaje de sacarosa (Ahmed, 2017).

Actualmente el uso de bacterias promotoras de crecimiento está teniendo importancia en el cultivo de tejidos vegetales. Las bacterias promotoras de crecimiento vegetal como *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Methylobacterium* y *Rhizobium* han sido utilizadas para el enraizamiento de explantes (Yarte *et al.*, 2021). También se están

empleando para la aclimatación de plantas micropropagadas en caña de azúcar. La inoculación de *Pseudomonas luteola*, *Aeromonas salmonicida* y *Streptophomonas maltophilia* en plántulas de caña de azúcar durante 75 días de aclimatización, mostraron incrementos en la altura de 27.75 %, diámetro de tallo en 30.75 %, área foliar en 49 % y número de brotes en 38.5 %, en comparación con el testigo (Morgado *et al.*, 2015).

Silva *et al.* (2021), observaron que la inoculación en plantas micropropagadas de caña de azúcar con *Acinetobacter iwoffii* Bac 109, tuvo efecto en la longitud de tallo con aumento de 35 % con respecto a plantas no inoculadas. Asimismo, la inoculación de *Rhizobium sp.* BR10268 en plántulas de caña de azúcar bajo condiciones de invernadero, incrementaron la longitud de tallo (62.55 cm) y volumen de raíz (8.56 cm<sup>3</sup>) a los 30 días. Estos efectos fueron más más notorios a los 75 días, con incrementos significativos en diámetro de tallo (8.2 cm), volumen de raíz (54 cm<sup>3</sup>) y área foliar (544 cm<sup>2</sup>), lo cual se atribuyó a la capacidad de la bacteria de producir ácido indolacético y giberelinas (Ferreira *et al.*, 2020).

También se ha observado que las bacterias *Ochrobactrum intermedium*, *Acetobacter sp.*, *Bacillus sp.* y *Escherichia sp.* actúan como biocontroladores al suprimir el crecimiento del patógeno *Colletotrichum falcatum*, conocido por causar enfermedades en los cultivos de caña de azúcar (Patel *et al.*, 2019). Shastri *et al.* (2020), descubrieron que el uso de sobrenadante libre de células bacterianas de *Bacillus subtilis* S17, también inhibió el crecimiento micelial de *Colletotrichum falcatum* en más de 70 %. Por lo tanto, el uso de bacterias representa una alternativa importante en el cultivo de caña de azúcar, tanto para la producción en campo, así como para la reproducción de

plantas mediante el cultivo de tejidos, por lo que estas tienen un gran potencial para ser aplicadas como biofertilizantes, con lo que contribuirían a reducir dosis de fertilizantes nitrogenados y por ende contrarrestar los problemas ambientales. Mediante diferentes mecanismos, estos microorganismos pueden promover el crecimiento y mejorar la nutrición de la planta.

La diversidad bacteriana es extensa, por lo que el descubrimiento de nuevos géneros que muestren asociaciones benéficas con caña de azúcar amplía la gama de bacterias para ser utilizadas como biofertilizantes para este cultivo, adaptadas a condiciones locales y que proporcionen a las plantas los beneficios necesarios para su crecimiento y desarrollo. En México los estudios realizados sobre el aprovechamiento de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en caña de azúcar son limitados, por lo que realizar investigación en esa área del conocimiento es muy importante para contribuir a resolver algunos de los problemas que se presentan en el cultivo de caña de azúcar, como la contaminación del suelo y cuerpos de agua, debido al uso de altas dosis de fertilizantes químicos así como la adaptación y la aclimatación de las plantas micropropagadas.

# CAPITULO I. BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO AISLADAS DE COMPOST Y SU EFECTO EN PLÁNTULAS MICROPROPAGADAS DE CAÑA DE AZÚCAR

## 1.1 RESUMEN

El compost es una fuente abundante y diversa de bacterias promotoras de crecimiento vegetal. La finalidad del presente trabajo fue evaluar el efecto de bacterias aisladas de compost de cachaza y gallinaza, sobre plantas micropropagadas de caña de azúcar durante la fase de aclimatación. Se cuantificaron poblaciones microbianas por la técnica de diluciones y cuenta viable en compost de diferentes mezclas de cachaza y gallinaza (2.5:7.5 v/v; 5:5 v/v; 7.5:2.5 v/v y 10:0 v/v), de las colonias crecidas en diferentes medios de cultivo se aislaron cepas bacterianas, las cuales fueron caracterizadas por su capacidad de promoción de crecimiento vegetal. Las mejores cepas se identificaron a nivel molecular y se evaluaron en plántulas micropropagadas de caña de azúcar variedad Mex 69-290. Se aislaron un total de 63 cepas bacterianas, se seleccionaron 14 que presentaron diferentes mecanismos de promoción de crecimiento. De acuerdo con el análisis de las secuencias de ADNr 16 S amplificadas, las cepas de bacterias tienen alta similitud a 7 géneros diferentes: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Paenarthrobacter*, *Weizmannia* y *Staphylococcus*. La inoculación de rizobacterias en plantas de caña de azúcar, durante la fase de aclimatación, mostró que *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 incrementó significativamente la altura (40%), área foliar (107 %), volumen radical (124%), peso seco (93%) y contenido de nitrógeno (115%) comparado con plantas no inoculadas. Las 14 cepas seleccionadas que presentaron varios atributos benéficos pertenecieron

a 11 especies distintas. La cepa de rizobacteria *Achromobacter Xyloxosidans* CPOC56 presentó los mejores resultados, el cual podría tener el potencial de ser utilizado como un biofertilizante y ser una buena opción para favorecer el crecimiento de plantas *in vitro* de caña de azúcar durante la fase de aclimatación en invernadero.

Palabras clave: *microorganismos benéficos, aclimatación, compost, cultivo de tejidos, plantas in-vitro.*

# GROWTH-PROMOTING BACTERIA ISOLATED FROM COMPOST AND THEIR EFFECT ON MICROPROPAGATED SUGARCANE SEEDLINGS

## 1.2 ABSTRACT

Compost is an abundant and diverse source of plant growth-promoting bacteria. The aim of the present work was to evaluate the effect of bacteria isolated from sugarcane filter cake and chicken manure compost on micropropagated sugarcane plants during the acclimatization phase in the greenhouse. Microbial populations were quantified by the technique of serial dilutions and plate counts in compost samples obtained from different mixes of filter cake and chicken manure (2.5:7.5 v/v; 5:5 v/v; 7.5:2.5 v/v and 10:0 v/v), and the colonies grown in different culture media bacterial strains were isolated, which were characterized by their capacity to promote plant growth. The best strains were identified at the molecular level and evaluated on micropropagated sugarcane seedlings variety Mex 69-290. A total of 63 bacterial strains were isolated, from which 14 were selected by their growth promotion mechanisms. According to the analysis of the amplified 16 S rDNA sequences, the selected bacterial strains have high similarity to 7 different genera: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Paenarthrobacter*, *Weizmannia* and *Staphylococcus*. Inoculation of rhizobacteria in sugarcane plants during the acclimatization phase showed that *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 significantly increased height (40%), leaf area (107%), root volume (124%), dry weight (93%), nitrogen content (115%) and phosphorus (133%), compared to non-inoculated plants. Compost is an abundant and diverse source of plant growth-promoting bacteria. The selected strains that exhibited various beneficial

attributes belonged to 11 different species. The rhizobacterial strain *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 showed the best results, which could have the potential to be used as a biofertilizer and be a good option to favor the growth of sugarcane plants in vitro during the acclimatization phase in the greenhouse.

Key words: *beneficial microorganisms, acclimatization, compost, tissue culture, in-vitro plants.*

### 1.3 INTRODUCCIÓN

México ocupa el 6º lugar en producción de caña de azúcar a nivel mundial, solo detrás de países como Brasil, India, China, Estados Unidos y Tailandia. El cultivo de caña es la principal fuente de azúcar en el país y el mundo, con un consumo anual per cápita de azúcar de 39 kg (SIAP, 2020). No obstante, debido a la baja tasa de propagación y la frecuente transmisión de enfermedades en las plantas por la siembra por esquejes, se ha optado por buscar alternativas para aminorar este problema (Miranda *et al.*, 2018).

Actualmente, la propagación *in vitro* de plantas mediante el cultivo de tejidos vegetales es una técnica utilizada para obtener plantas sanas de forma masiva, el cual que permite, mayor tasa de propagación vegetal, producir individuos uniformes y controlar las condiciones ambientales para evitar la aparición de patógenos, etc. (Pasqual *et al.*, 2014). Sin embargo, la fase de aclimatación es quizá la etapa más difícil para las plantas micropropagadas ya que son expuestas a estrés biótico y abiótico cuando son trasladadas a condiciones *ex-vitro* (Lopes *et al.*, 2017). La aclimatación es un proceso de supervivencia de las plantas para aumentar su crecimiento y reducir su mortalidad, el cual representa la eficiencia del proceso y la calidad de las plantas producidas *in vitro* (Scortecci *et al.*, 2012). Se ha observado que el uso de microorganismos benéficos como las rizobacterias, promueven el crecimiento de plantas mediante funciones como solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno y producción de reguladores de crecimiento que ayudan a las plantas a tolerar el estrés causado por diversos factores (Alam *et al.*, 2019). Además, se ha mostrado que la inoculación de



rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en caña de azúcar en plantas en campo, ayudan a reducir la dosis de fertilizantes químicos aplicados a las plantas, haciéndolas más eficientes en la captación de nutrimentos del suelo (Khan *et al.*, 2007; Gyaneshwar *et al.*, 2012).

Por otra parte, la industria azucarera genera grandes cantidades de residuos, como la cachaza, proveniente principalmente del proceso de clarificación de los jugos de la caña, con una cantidad aproximada de 40,500 t, tan solo en el estado de Tabasco (Arreola-Enríquez *et al.*, 2004), mientras que países como India, generan de 3.6 a 3.9 millones de t al año (Rasappan *et al.*, 2015). El compost ha sido una alternativa viable para tratar estos residuos y aprovechar estos subproductos, el cual es un producto estabilizado que funciona como un fertilizante orgánico y mejora las condiciones del suelo (Cunha-Queda *et al.*, 2007; Romero-Yam *et al.*, 2015). El compost, además de ser una fuente de nutrientes, representa un reservorio de microorganismos benéficos que pueden ser aislados y que tiene funciones que ayudan al desarrollo y crecimiento vegetal, tales como bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bacillus*, que han sido encontrados en composta de residuos de caña de azúcar (Estrada-Bonilla *et al.*, 2017) o como *Serratia plymuthica* (BAT), *Serratia grimesii* (BA10) y *Achromobacter piechaudii* (BA30) que han sido aislados en otras compostas (Samet *et al.*, 2022).

Aunque se tiene conocimiento sobre la importancia y beneficio de los microorganismos en los cultivos, se han realizado muy pocos estudios enfocados en el uso de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en la fase de aclimatización de plantas micropropagadas de caña de azúcar, por lo que el principal objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de bacterias aisladas de compost de cachaza de caña de

azúcar mezclada con gallinaza, sobre plantas micropropagadas de caña de azúcar durante la fase aclimatización en invernadero.

## **1.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Microbiología de Suelos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en la Carretera México- Texcoco Km 36.5, Montecillo, Texcoco, Edo. de México y en el Campus Córdoba del Colegio de Postgraduados ubicado en Km 348 carretera federal Córdoba-Veracruz, congregación Manuel León, Municipio de Amatlán de los Reyes, Veracruz.

### **1.4.1 Origen y descripción del compost utilizado**

El material utilizado fue compost obtenido del área de compostaje del Campus Córdoba, fue una mezcla de cachaza de caña de azúcar con gallinaza, en cuatro proporciones diferentes: T1=25 % cachaza y 75 % gallinaza (2.5:7.5 v/v); T2=50 % cachaza y 50 % gallinaza (5:5 v/v); T3=75 % cachaza y 25 % gallinaza (7.5:2.5 v/v); T4=100 % cachaza y 0 % gallinaza (10:0 v/v). Se colectaron submuestras de la pila de compost a diferentes profundidades, las cuales se mezclaron para obtener una muestra compuesta de 500 g por cada tipo de compost, posteriormente, después se les realizó un análisis químico en el Laboratorio de Génesis de Suelos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados.

Los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Suelos Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados. Las muestras fueron procesadas bajo condiciones de asepsia en campana de flujo laminar, utilizando el método de diluciones y conteo en placa. Se pesaron 10 g de cada tipo de compost y se colocaron

en botellas que contenían 90 mL de agua destilada estéril, siendo la primera dilución y a partir del cual se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$ , posteriormente se sembró 0.1 mL de cada dilución en cajas Petri con medio de cultivo sólido y fue distribuida en la superficie con ayuda de una varilla de vidrio en forma de L (James y Sutherland, 1939; Jensen, 1968). Los microorganismos evaluados y los medios utilizados fueron: bacterias totales (BT) en agar nutritivo y hongos totales (HT) en papa dextrosa agar (Wollum II, 1982), bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSP) en medio Pikovskaya (Pikovskaya, 1948), bacterias fijadoras de nitrógeno (BFN) en medio Rennie, bacterias productoras de auxinas (BPA) en medio Luria Bertani, bacterias degradadoras de celulosa (BC) en medio agar-carboximetil celulosa (Pochon y Tardieux, 1962) y actinomicetos (AC) en medio Czapek. Después de la siembra, las cajas fueron incubadas a 28 °C de 3 a 7 días, dependiendo de cada grupo de microorganismos, después se realizó el conteo de colonias crecidas para calcular las unidades formadoras de colonias (UFC) (Ramírez-Gama *et al.*, 2020). Posteriormente, se seleccionaron y se aislaron cepas bacterianas de cada medio de cultivo, considerando características fenotípicas diferentes, como el color, forma, tamaño y apariencia, las cuales fueron sembradas posteriormente en medio agar nutritivo para su purificación.

#### **1.4.2 Caracterización cualitativa de cepas bacterianas por atributos promotores de crecimiento vegetal**

Después de la purificación, las cepas de bacterias se propagaron en caldo nutritivo por 48 h a 28°C y a 180 rpm en un agitador Thermo scientific® modelo MAXQ 400 con el fin de obtener los inóculos bacterianos para realizar pruebas cualitativas de mecanismos de promoción de crecimiento vegetal: producción de ácido indolacético

(AIA), solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno, degradación de celulosa y producción de sideróforos.

La identificación de cepas de bacterias productoras de AIA se realizó mediante una técnica colorimétrica en microplacas. Las cepas de bacterias fueron sembradas en microplacas de 96 celdas que contenían 150  $\mu$ L de medio líquido LB (Luria-Bertani) por celda, después de 48 h de incubación a 28°C, se le agregó a cada celda 150  $\mu$ L de reactivo salkowski (2 % 0.5 M FeCl<sub>3</sub> en 35 % de ácido perclórico) y se incubó durante 30 min en oscuridad. El indicativo de producción de AIA es el cambio de coloración del medio, que va de un rosado tenue a rojo (Bric *et al.*, 1991; Almaraz-Suárez *et al.*, 2020). En el caso de la identificación de cepas solubilizadoras de fosfato, se sembró 10  $\mu$ L de inóculo de cada cepa en cajas Petri con medio de cultivo Pikovskaya y se incubaron por 48 h, la formación de un halo de color claro alrededor de la colonia fue el indicativo de solubilización de fosfato.

Para bacterias con actividad celulolítica se inocularon las cepas en medio para microorganismos celulolíticos (Pochon y Tardieux, 1962), las colonias de bacterias se revelaron agregando a las cajas rojo congo al 0.1 % durante 15 min y solución de NaCl 1 M durante 15 min, el indicativo de degradación de celulosa es la formación de un halo de color amarillo o crema alrededor de la colonia. Para el caso de producción sideróforos, las cepas de bacterias se sembraron en tubos con 1 ml de caldo nutritivo e incubadas a 28°C durante 24 h a 180 rpm, posterior a la incubación se tomó 10  $\mu$ L de cada inóculo y se sembró en cajas con medio cromo azurol-S (CAS) (Louden *et al.*, 2011). Las cajas se incubaron durante 24 y 48 h, el indicativo de producción de sideróforos fue la formación de un halo amarillo alrededor de la colonia. Para identificar

cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno, estas fueron sembradas en cajas Petri con medio de cultivo Rennie (Rennie, 1981) y se incubaron durante 24 h. Las bacterias que fueron capaces de crecer en el medio libre de nitrógeno se consideraron como BFN.

### **1.4.3 Cuantificación de AIA y fosfato soluble**

A partir de las pruebas cualitativas, se seleccionaron 14 cepas bacterianas, con alguna función de promoción del crecimiento vegetal. Estas cepas se evaluaron en medio líquido con la finalidad de determinar la cantidad de ácido indolacético que producen y la cantidad de fosfato que solubilizan.

Con respecto a la capacidad de solubilizar fosfato, las cepas de bacterias seleccionadas se sembraron en tubos falcon de 15 ml que contenían medio Pikovskaya líquido y utilizando  $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$  como única fuente de fosfato (Pikovskaya, 1948). Después fueron incubadas en agitación a 28 °C durante 7 días. Posteriormente, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 min y se filtraron en una membrana Durapore de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millex®), se tomó 150  $\mu\text{L}$  de cada filtrado y se depositaron en microplacas de 96 celdas (Microplates Costar 3591, Corning, NY), a cada pozo se le agregó 50  $\mu\text{L}$  de vanadato ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$  0.25 % en 35 %  $\text{HNO}_3$ ) y 50  $\mu\text{L}$  de molibdato ( $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$  al 5 %), después de 5 min de reacción, las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro Synergy 2 microplate reader, Biotek Instruments, Inc. a 420 nm (Almaraz-Suárez *et al.*, 2020). La cantidad de fosfato soluble se calculó mediante una curva estándar elaborada con concentraciones conocidas de fosfato soluble.

En el caso de la producción de ácido indolacético (AIA), las cepas bacterianas fueron cultivadas en viales de 2 ml con medio Luria-Bertani líquido e incubadas por 48 h a 28 °C en agitación a 180 rpm, se utilizaron dos grupos de tubos. A las 24 h, un grupo de tubos con los cultivos bacterianos se centrifugaron a 7000 rpm por 15 min y se filtraron en una membrana Durapore de 0.22 µm (Millex®), se tomó 150 µL del sobrenadante de cada cultivo y se depositó en microplacas de 96 celdas (Microplates Costar 3591, Corning, NY), añadiendo 150 µL de reactivo Salkowski, después se incubaron en oscuridad durante 30 min y se analizaron en un espectrofotómetro Synergy 2 microplate reader, Biotek Instruments, Inc. a 530 nm. A las 48 h, el otro grupo de tubos se procesaron realizando el mismo procedimiento (Almaraz-Suárez *et al.*, 2020). La concentración de AIA, se determinó en función a una curva estándar con concentraciones conocidas de ácido indol acético.

#### **1.4.4 Identificación molecular**

Se obtuvo material genético de 14 cepas bacterianas a partir de cultivos jóvenes de 24 h y se realizó siguiendo el protocolo de extracción de DNA para bacterias mediante el método CTAB (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 2H<sub>2</sub>O mM, CTAB 2 %; NaCl 1,4 M) del Laboratorio de Biotecnología de Semillas del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados.

Se amplificó un fragmento del gen ribosomal 16S ADN<sub>r</sub>, utilizando los iniciadores 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). La mezcla de reacción de amplificación fue con regulador de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se basó en: buffer 5X, dNTP's 2.5 mM, vaya Taq ADN polimerasa

(5U), ADN 100 ng. La PCR se realizó en un termociclador C100 Touch (Bio-Rad, USA) con una desnaturalización inicial de 95 °C por 2 min; seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 59 °C por 30 s y la extensión a 72 °C por 2 min, y una extensión final de un ciclo a 72 °C por 10 min. Las amplificaciones se observaron en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con colorante verde de ADN (Green-DNA dye, Bio Basic Inc., Canada). Posteriormente, los productos finales se purificaron con ExoSAP-IT (Affymetrix, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo con el Genetic Analyzer modelo 3130 (Applied Biosystem, EE. UU) en ambas direcciones. Las secuencias correspondientes a la región 16S ADNr de cada una de las cepas, se editaron con el programa BioEdit v7.0.9.1 (Hall, 1999). Se hizo un análisis para encontrar regiones de similitud local entre secuencias con alineamientos significantes de cada aislamiento obtenido, para la región 16S ADNr en la plataforma BLAST\_ nucleotide 2.2.19 del National Center for Biotechnology Informatio (NCBI) (Zhang *et al.*, 2000). Finalmente, las secuencias de las bacterias se depositaron en la base de datos de GenBank del NCBI.

#### **1.4.5 Efecto de cepas de bacterias inoculadas en plantas micropropagadas de caña de azúcar durante la fase de aclimatización en invernadero**

La fase de aclimatación de plántulas de caña de azúcar se efectuó en el invernadero de cultivo de tejidos vegetales del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, Veracruz, en los meses de diciembre/2020-febrero/2021. Se seleccionaron 120 plántulas de caña de azúcar de la variedad Mex 69-290 propagadas *in vitro* con edad de 20 días en invernadero (pre-aclimatización). Como sustrato se utilizó una mezcla de agrolita con peat-moss y tezontle en una relación 1:1:1 v/v/v, esterilizada 3 veces en

días no consecutivos a 18 lbs de presión durante 3 horas en autoclave vertical. Las plantas seleccionadas fueron homogenizadas, dejando sólo un vástago y podadas en la parte aérea y en la raíz, después fueron trasplantadas en charolas de 32 cavidades, siendo una planta por cavidad la unidad experimental. Se utilizaron 15 tratamientos (14 cepas bacterianas y un testigo) con 8 repeticiones para cada tratamiento, donde las plantas sin inocular fueron el tratamiento testigo. Las cepas de bacterias fueron crecidas en caldo nutritivo durante 48 h hasta obtener una concentración de  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  de acuerdo con la escala de McFarland. Las plantas se inocularon a los 5 días después del trasplante agregando 2 ml de inóculo a las raíces con jeringas estériles. Las plantas fueron establecidas durante dos semanas en un invernadero con malla sombra, posteriormente fueron transferidas a un invernadero con mayor iluminación. EL riego se realizó diariamente y se fertilizó dos veces a la semana con 15 ml de solución nutritiva al 10 % (Steiner, 1961), aplicado con jeringas de 10 ml.

Las plantas fueron evaluadas a los 55 días después de la inoculación considerando las siguientes variables de crecimiento: la altura de planta se midió con una regla graduada en cm, número de hojas se contó de manera manual, volumen de raíz se determinó mediante la técnica de desplazamiento de agua por raíz en una probeta graduada en mililitros (mL), diámetro de tallo se midió con un vernier en mm. El área foliar se determinó mediante una metodología no destructiva, descrita por Herman y Cámara (1999) para caña de azúcar:  $AF=C*L*0.75*(N+2)$ , en donde: AF= área foliar; C=largo de la primera hoja completamente abierta; L=ancho de la primera hoja completamente abierta; 0.75= factor de corrección de la hoja del cultivo; N=número de hojas totalmente abiertas con por lo menos 20% de área verde; 2=factor de corrección.



Para determinar el peso seco de la parte aérea y de raíz, las muestras fueron secadas hasta peso constante en un horno Felisa, Modelo 242-A a 70 °C durante 72 h, y luego se pesaron en una balanza analítica Sartorius Modelo Analytic AC 210S, Illinois, EUA, expresada en gramos (g). Las muestras secas se molieron para determinar el contenido de nitrógeno (N), Fósforo (P) y potasio (K) en el laboratorio de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa. El N se determinó por el procedimiento semi-micro Kjeldahl (Etchevers, 1987). El P por colorimetría de complejos molibdofosfóricos reducidos con ácido ascórbico (AOAC, 1980) y el K por fotometría de llama (Rodríguez y Rodríguez, 2015).

#### **1.4.6 Diseño experimental y análisis estadístico**

Las poblaciones de microorganismos de cada uno de los 4 compost se analizaron estadísticamente bajo un diseño experimental completamente al azar con 3 repeticiones. La capacidad de solubilizar fosfato y producir AIA de las 14 cepas de bacterias se analizó estadísticamente en un diseño experimental completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Se realizaron análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) mediante el software estadístico R 4.0.2. (R Core Team, 2020), utilizando el entorno de desarrollo integrado Rstudio. El experimento de invernadero se estableció en un diseño experimental completamente al azar y se usó como covariable la altura inicial de la planta bajo el siguiente modelo:  $Y_{ij}=\mu+C_i+\beta(X_{ij}-\bar{X})+\varepsilon_{ij}$ . Los datos de crecimiento se procesaron estadísticamente y se realizó un análisis de covarianza con comparación de medias Ls-means en el paquete estadístico SAS 9.2.

## 1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.5.1 Características químicas de los compost

Los compost presentaron valores de pH alcalinos, el compost T1 mostró el valor más alto con 9.6, mientras que el T4 el valor más bajo con 8. El mayor contenido de materia orgánica (M.O.) se observó en el compost T1 con 37.9 %, por su parte el T4 presentó el valor más bajo de M.O. con 26.4 %.

**Cuadro 1.1. Análisis químico de compost de cachaza de caña de azúcar mezclada con gallinaza en cuatro diferentes proporciones.**

Compost	pH	CE (dS/m)	% CO	%M. O.	% NT	Relación C/N
T1	9.6	0.33	21.97	37.88	2.31	9.5
T2	9.0	0.29	19.11	32.94	2.59	7.4
T3	8.7	0.16	19.75	34.04	1.51	13.1
T4	8.0	0.05	15.29	26.35	1.33	11.5

**T1**=25% cachaza y 75 % gallinaza (2.5:7.5 v/v); **T2**=50% cachaza y 50 %gallinaza (5:5 v/v); **T3**=75% cachaza y 25 % gallinaza (7.5:2.5 v/v); **T4**=100% cachaza y 0% gallinaza (10:0 v/v)

En cuanto al contenido de nitrógeno, también se observó mayor concentración en T1 (2.31 %). La mayor relación C/N se encontró en T3, compost conformado solo por 75 % de cachaza con 25% de gallinaza, mientras que la conductividad eléctrica fluctuó de 0.05 a 0.33 dS/m (Cuadro 1.1). Bohorquez *et al.* (2014) encontró valores de pH en compost de cachaza de caña de azúcar de 7.1 a 7.3 y una relación C/N de 11.6 a los 90 días, mientras que Rasappan *et al.* (2015) a los 40 días encontró valores de pH en compost de 7.8 y contenido de nitrógeno de 1.7. Esto sugiere que valores diferentes encontrados en los compost, quizá es debido a diferencias en las proporciones de los materiales usados para preparar los compost.

### 1.5.2 Poblaciones microbianas en compost

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas ( $gl=3,8$ ;  $F=1.48$ ,  $P<0.00456$ ) entre los compost con respecto a poblaciones de bacterias totales (BT), lo cual la mayor población se encontró en los compost T4 y T3 con alrededor de  $53 \times 10^5$  UFC.

**Cuadro 1.2. Unidades formadoras de colonias (UFC) en compost de cachaza de caña de azúcar mezclada con gallinaza en cuatro proporciones diferentes.**

Compost	HT	BSP	AC	BT	BDC	BPA	BFN
	UFC x $10^3$ g <sup>-1</sup>	UFC x $10^4$ g <sup>-1</sup>	UFC x $10^4$ g <sup>-1</sup>	UFC x $10^5$ g <sup>-1</sup>	UFC x $10^5$ g <sup>-1</sup>	UFC x $10^6$ g <sup>-1</sup>	UFC x $10^6$ g <sup>-1</sup>
T1	5.1 <sub>b</sub>	5.8 <sub>a</sub>	3.3 <sub>b</sub>	26.2 <sub>ab</sub>	25.1 <sub>b</sub>	60.4 <sub>a</sub>	38.6 <sub>a</sub>
T2	1.6 <sub>b</sub>	24.6 <sub>a</sub>	2.5 <sub>b</sub>	10.8 <sub>b</sub>	7.5 <sub>b</sub>	17.9 <sub>bc</sub>	7.1 <sub>a</sub>
T3	4.9 <sub>b</sub>	12.7 <sub>a</sub>	1.8 <sub>b</sub>	53.1 <sub>a</sub>	25.8 <sub>b</sub>	46.3 <sub>ab</sub>	18.6 <sub>a</sub>
T4	40.3 <sub>a</sub>	22.5 <sub>a</sub>	14.82 <sub>a</sub>	54.5 <sub>a</sub>	65.2 <sub>a</sub>	8.8 <sub>c</sub>	16.1 <sub>a</sub>
CME	6.03x10 <sup>6</sup>	7.4x10 <sup>9</sup>	6.8x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>12</sup>	1.8x10 <sup>12</sup>	1.2x10 <sup>16</sup>	1.7x10 <sup>16</sup>

**T1=25% cachaza+75 % gallinaza; T2=50% cachaza+50 %gallinaza; T3=75% cachaza+25 % gallinaza; T4=100% cachaza+0% gallinaza. HT** (hongos totales); **BSP** (bacterias solubilizadoras de fosfatos); **AC** (actinomicetos); **BT** (bacterias totales); **BDC** (bacterias degradadoras de celulosa); **BPA** (bacterias productoras de auxinas); **BFN** (bacterias fijadoras de nitrógeno). \*Letras diferentes dentro de la misma columna mostraron diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ). **CME**=Cuadrado Medio del Error.

La mayor población de bacterias productoras de auxinas (BPA) se observó en el compost T1 con  $60.45 \times 10^5$  UFC, la cual fue estadísticamente diferente ( $gl=3,8$ ;  $F=0.30$ ;  $P<0.00163$ ) a los compost T2 y T4. Para bacterias con actividad celulolítica (BDC), el compost T4 fue estadísticamente diferente y superior al resto de los tratamientos ( $gl=3,8$ ;  $F= 4.21$ ;  $P<0.0012$ ), con una población de  $65.2 \times 10^5$  UFC. Los actinomicetos (AC) y hongos totales (HT) siguieron la misma tendencia, siendo el compost T4 estadísticamente mayor al resto de los tratamientos ( $gl=3,8$ ;  $F=2.56$ ;  $P<0.00085$ ) con

poblaciones de  $14.8 \times 10^4$  UFC y  $40.3 \times 10^3$  UFC, respectivamente. Con respecto a BSP y BFN no se observaron diferencias significativas ( $gl=3,8$ ;  $F=3.88$ ;  $P<0.089$ ) entre los compost (Cuadro 1.2). Se puede observar que la mayor población de bacterias se observó en T4 y T3 mientras que hongos y actinomicetos se encontraron en el T4, el cual está conformado solo por cachaza de caña de azúcar. En un estudio similar realizado por Romero-Yam *et al.* (2015), las mayores poblaciones de bacterias y hongos se observaron en mezclas de cachaza de caña de azúcar con gallinaza en una relación 9:1 v/v y 7:3 v/v. Sin embargo, las poblaciones más bajas, se encontraron en compost conformado solo por cachaza de caña de azúcar. Estos resultados contrarios, puede deberse a la etapa de estabilización, en el que se encontraba el compost al momento de los análisis. Kutu *et al.* (2019) encontraron bajas poblaciones de hongos y actinomicetos en residuos avícolas, comparado con otro tipo de residuos, como estiércol de vaca, lo cual sugiere que la calidad nutrimental de los materiales usados para producir compost afecta a los microorganismos. De hecho, en un estudio reciente sobre los factores que contribuyen a la variación de los microorganismos durante el compostaje de estiércol de ganado bovino, se observó que la composición de las comunidades microbianas estuvo significativamente relacionada con el carbono orgánico soluble y la temperatura. Además de estos dos factores, la relación C/N contribuyó significativamente en la variación de la composición de la comunidad de hongos (Huhe *et al.*, 2017). Abou *et al.* (2021) menciona que, la dieta proporcionada a las aves influye en la calidad del compost y la población microbiana. Resultados de esta investigación también pueden estar influenciados por las características químicas del compost, tales como contenido de materia orgánica, relación carbono-nitrógeno y el

pH. El compost T4 presentó un pH de 8, el cual fue más bajo con respecto a los otros compost (Cuadro 1). El pH del compost debe oscilar entre 6.5 y 7, valores más altos puede influir negativamente en las poblaciones microbianas y su actividad (Mari *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2016). No obstante, los valores de pH dependen del proceso de compostaje y los materiales utilizados. Alvarez *et al.* (2019), observaron incrementos en el pH en 11 semanas de composteo, con valores mayores a 8 en residuos avícolas. Por su parte, Villar *et al.* (2016), mencionan que la degradación de materia orgánica y la actividad de los microorganismos tienen influencia directa en las variaciones del pH, además, el tipo de material original del compost determina los microorganismos que se pueden desarrollar en el material, durante el proceso hasta la etapa de maduración.

Por otra parte, en el presente trabajo se encontró una mayor población de bacterias degradadoras de celulosa (BDC) en compost conformado solo por cachaza de caña de azúcar ( $65.2 \times 10^5$  UFC). La celulosa es el polímero más abundante en plantas, por lo que se puede encontrar en mayor cantidad en residuos orgánicos vegetales como la cachaza, y dado que es una fuente de carbono para los microorganismos, hay una relación entre contenido de celulosa y microorganismos que degradan este material tales como bacterias, hongos y actinobacterias (Insam y De Bertoldi, 2007). Tayyab *et al.* (2018) mencionan que un aspecto determinante en la población microbiana es la mezcla de materiales para el composteo, por ejemplo, la utilización de paja de caña de azúcar sin compostear presenta una población baja de bacterias e incluso de las bacterias degradadoras de lignocelulosa, debido a que su funcionalidad esta reducida, lo contrario sucede cuando la paja es mezclada con estiércol animal. No obstante, en este estudio, se observó mayor población de algunos grupos de microorganismos en

compost de cachaza de caña de azúcar mezclada con gallinaza, e incluso en el compost que solo tenía cachaza de caña de azúcar (T4). Hay varios factores que están influyendo en el crecimiento de la población microbiana en los diferentes tipos de compost, durante el proceso de descomposición, la maduración y la estabilización del compost y que también dependen de la composición de la materia prima utilizada y de los microorganismos presentes, tales como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Chinakwe *et al.*, 2019), que al final del proceso refleja la calidad del compost, el cual podría ser considerado como una opción a la fertilización química.

### **1.5.3 Aislamiento y caracterización cualitativa de cepas bacterianas**

Se aislaron un total de 63 cepas bacterianas, de las cuales solo el 22 % mostraron la capacidad de producir ácido indolacético, el 21.4 % tenían capacidad de fijar nitrógeno, mientras que el 10.7 % de las cepas mostraron el atributo de solubilizar fosfatos, con halos de solubilización entre 1mm a 4.3 mm; y solo un pequeño porcentaje de las cepas presentaron capacidad de producción de sideróforos (6.93 %) y degradación de celulosa (5 %). Del total de cepas se seleccionaron 14 que presentaron al menos un mecanismo de promoción de crecimiento (Cuadro 1.3). Además de compost, muchas cepas de bacterias han sido aisladas de hojas, tallos, raíces y rizosfera de caña de azúcar. Muthukumarasamy *et al.* (2017) aislaron 41 cepas bacterianas de hojas, raíces y rizosfera de caña de azúcar, sin embargo, solo el 19 % de las cepas fueron capaces de mostrar habilidades de solubilización de fosfato, producción de ácido indolacético y fijación de nitrógeno y que pertenecían a los géneros *Roseateles* y *Burkholderia*.

**Cuadro 1.3. Cepas bacterianas seleccionadas con algún mecanismo de promoción del crecimiento vegetal.**

Cepas	Producción de AIA <sup>a</sup>	Actividad celulolítica <sup>b</sup>	Solubilización de fosfato <sup>c</sup>	Fijación de nitrógeno <sup>d</sup>	Producción de sideróforos <sup>e</sup>
CPOC3	-	+	+	+	+
CPOC5	-	-	+	-	-
CPOC7	-	+	+	-	-
CPOC11	+	+	+	-	-
CPOC12	+		+	-	-
CPOC22	+	+	+	+	-
CPOC32	+	-	+	+	-
CPOC36	+	-	+	-	-
CPOC45	+	-	+	-	-
CPOC48	-	-	+	+	-
CPOC49	+	-	+	-	-
CPOC56	+	-	-	-	-
CPOC57	+	-	-	-	+
CPOC60	+	-	-	-	+

**a** (+) produce AIA, (-) no produce AIA; **b** (+) degrada celulosa (-) no degrada celulosa; **c** (+) solubiliza fosfato, (-) no solubiliza fosfato; **d** (+) fija N, (-) no fija N; **e** (+) produce sideróforos, (-) no produce sideróforos.

Wahla y Shukla (2017) aislaron cepas de bacterias de la rizosfera de caña de azúcar, capaces de solubilizar fosfato, con índices de solubilización de 3 a 3.5 mm, principalmente de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azotobacter*. Mientras que, Santos y Rigobelo (2021) aislaron un total de 167 cepas bacterianas de la rizosfera de diferentes variedades de caña de azúcar, de las cuales 34.7 % de las cepas fueron capaces de fijar de nitrógeno, 12 % produjeron ácido indolacético, 31.7 % mostraron actividad celulolítica y 30 % mostraron la habilidad de solubilizar fosfato. Estos estudios demuestran la gran diversidad funcional de bacterias que se encuentran en compost, rizosfera y en las diferentes partes u órganos de plantas de caña de azúcar, de las cuales muchas de estas tienen habilidades promotoras de crecimiento que pueden ser inoculadas en plantas para mejorar su crecimiento.

#### 1.5.4 Cuantificación de AIA y solubilización de fosfato

Con respecto a las pruebas cuantitativas, se encontraron diferencias estadísticas significativas ( $gl=4,56$ ;  $F= 2.6$ ;  $P<0.0001$ ) para la producción de AIA y solubilización de fosfato entre de las 14 cepas de bacterias evaluadas. A las 24 h, la cepa CPOC12 produjo la mayor cantidad de ácido indolacético (AIA) ( $14.7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) el cual mostró diferencias estadísticas significativas con el resto de las cepas ( $gl=4,56$ ;  $F=1.04$ ;  $P<0.0001$ ). Mientras que, a las 48 h la cepa CPOC56 fue estadísticamente diferente ( $gl=4,56$ ;  $F=1.26$ ;  $P<0.0001$ ) al resto de los tratamientos con una cantidad de AIA producida de  $33.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ . En cuanto la solubilización de fosfato, la cepa CPOC48 fue estadísticamente diferente ( $gl=4,56$ ;  $F= 1.69$ ;  $P<0.0001$ ) al resto de los tratamientos y mostró una fuerte capacidad de solubilizar fosfato con un valor de  $257.55 \mu\text{g mL}^{-1}$ , seguido por las cepas CPOC49 y CPOC12 con  $181.1 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $55.13 \mu\text{g mL}^{-1}$  de fosfato solubilizado respectivamente (Cuadro 1.4).

Muchos estudios han demostrado que bacterias aisladas de rizosfera, residuos y partes de la planta de caña de azúcar, tienen la capacidad de producir AIA y solubilizar fosfato. Santos y Rigobelo (2021), aislaron 167 cepas de bacterias de la rizosfera de algunas variedades de caña de azúcar, de las cuales dos cepas de *Enterobacter asburiae* produjeron la mayor cantidad de AIA con alrededor de  $56 \mu\text{g mL}^{-1}$ , y una cepa de *Bacillus thuringiensis* tuvo la capacidad de solubilizar hasta  $481 \text{ mg de P mL}^{-1}$ . Mientras que, Morgado *et al.* (2015) observó que *Pseudomonas luteola* produjo una mayor cantidad de AIA con  $117.3 \mu\text{g mL}^{-1}$  y *Stenotrophomas maltophilia* solubilizó  $222.4 \mu\text{g}$  de fosfato  $\text{mL}^{-1}$ . Sin embargo, algunos géneros de rizobacterias como



*Acinetobacter sp* tienen la capacidad de solubilizar hasta 682  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de fosfato tricálcico y hacerlo disponible para las plantas (Bharward y Rajkumar, 2020).

**Cuadro 1.4. Producción de ácido indolacético a las 24 y 48 h y fosfato soluble a los 7 días, de bacterias aisladas de compost.**

Cepas	Producción de ácido indol acético (AIA) $\mu\text{g mL}^{-1}$		Fosfato soluble $\mu\text{g mL}^{-1}$ (7 días)
	24 h	48 h	
CPOC12	14.7a	23.4b	55.13c
CPOC49	9.1ab	13.3cd	181.10b
CPOC45	8.9abc	17.1bc	10.41d
CPOC5	8.1abc	5.1e	0.37d
CPOC56	5.9bc	33.3a	0.72d
CPOC36	5.1bc	19.9	0.56d
CPOC48	4.8bc	5.3e	257.59a
CPOC60	4.4bc	9.6de	0.53d
CPOC3	3.9bc	20.1bc	15.69d
CPOC7	2.9bc	16.5bcd	0.98d
CPOC32	2.7bc	13.9cd	0.91d
CPOC11	1.5bc	19.6bc	5.43d
CPOC57	1.1bc	9.4de	0.29d
CPOC22	0.8c	18.3bc	0.22d
CME	10.63	8.61	65.67

\*Letras diferentes dentro de la misma columna mostraron diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ), **CME**=Cuadrado Medio del Error.

La producción de AIA y la solubilización de fosfatos, son dos características importantes en la selección de bacterias con capacidad de promover crecimiento, las cuales pueden ayudar a un mayor desarrollo celular de la raíz y la proliferación de pelos radicales, lo que contribuye a incrementar la absorción de agua y nutrientes (Glick, 2012).

### 1.5.5 Identificación molecular

El análisis de las secuencias de ADNr 16 S amplificadas mostró que las 14 cepas con atributos de promoción de crecimiento tienen alta similitud a 7 géneros diferentes (Cuadro 1.5).

**Cuadro 1.5. Especies de bacterias aisladas de compost de cachaza de caña de azúcar con gallinaza.**

Clave de identificación	Identificada como	Máxima identidad	No. de acceso al GenBank
CPOC3	<i>Bacillus lincheniformis</i>	100	ON982497
CPOC5	<i>Staphylococcus equorum</i>	100	ON982498
CPOC7	<i>Bacillus lincheniformis</i>	100	ON982499
CPOC11	<i>Bacillus lincheniformis</i>	100	ON982500
CPOC12	<i>Acinetobacter pittii</i>	100	ON982501
CPOC22	<i>Bacillus pumilus</i>	100	ON982502
CPOC32	<i>Paenarthrobacter sp.</i>	99.79	ON982503
CPOC36	<i>Bacillus australimaris</i>	100	ON982504
CPOC45	<i>Enterobacter cloacae</i>	99.93	ON982505
CPOC48	<i>Acinetobacter vivianii</i>	99.93	ON982506
CPOC49	<i>Weizmannia ginsengihumi</i>	100	ON982507
CPOC56	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	99.93	ON982508
CPOC57	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99.93	ON982509
CPOC61	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	99.93	ON982510

El género *Bacillus* presentó mayor número de especies: *Bacillus lincheniformis* (CPOC3, CPOC7, CPOC11), *Bacillus pumilus* (CPOC22), *Bacillus australimaris* (CPOC36), también se encontraron dos especies de *Enterobacter*: *Enterobacter cloacae* (CPOC46) y *Enterobacter hormaechei* (CPOC57). De igual forma, se encontraron las especies de *Acinetobacter pittii* (CPOC12) y *Acinetobacter vivianii* (CPOC48). Las cepas CPOC56 y CPOC61 fueron identificadas como *Achromobacter xylosoxidans.*, y finalmente las cepas CPOC32, CPOC6 y C49 como *Paenarthrobacter sp.*, *Staphylococcus equorum* y *Weizmannia ginsengihumi*, respectivamente (Cuadro 1.5). Las bacterias del género *Bacillus* se han encontrado en diferentes ambientes, sin

embargo, sus funciones pueden diferir de cepa en cepa. Se ha observado que varias de las especies que se identificaron en el presente trabajo tienen diferentes características funcionales, por ejemplo, se ha observado que *Bacillus lincheniformis* tiene actividad celulolítica y es capaz de tolerar altas temperaturas durante el proceso de compostaje, esta especie ha sido aislada en compost de residuos avícolas mezclados con paja de arroz (Zainudin *et al.*, 2022), por su parte *Bacillus pumilus* ha mostrado la capacidad de suprimir enfermedades en algunos cultivos (Li *et al.*, 2020). *Weizmannia ginsengihumi* ha sido aislada principalmente de suelo y de *Panax ginseng*, la cual ha mostrado la capacidad de producir ácido indolacético (Gupta *et al.*, 2020; Kwon *et al.*, 2021). Mientras que el género *Enterobacter sp.* lo han caracterizado como una bacteria solubilizadora de fosfatos (Safirzadeh *et al.*, 2019). Las especies del género *Staphylococcus sp.* han sido conocidos como patógenos humanos, no obstante, también han sido aislados en rizosfera de cultivos como arroz, caña de azúcar y suelos contaminados, entre otros y tienen características de promoción del crecimiento vegetal (Silva y Vidor, 2000; Sarathambal *et al.*, 2015).

Por otra parte, el género *Acinetobacter* ha sido reconocido que posee cepas de bacterias endófitas, con capacidad de promover el crecimiento vegetal, a través de la solubilización de fosfato y antagonismo contra *Rhizoctonia sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Phomas sp.* y *Bipolaris papendorffii* (Silva *et al.*, 2021). Asimismo, Khan *et al.* (2010), mencionan que este género tiene la habilidad de fijar nitrógeno y producir ácido indolacético. Algunas especies de *Achromobacter* también han sido aislados de varias fuentes, se ha observado que estas bacterias tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal, debido a que presentan diferentes atributos como capacidad para

solubilizar fosfato, producir ácido indolacético y sideróforos, así como actividad antagonista contra *Phytophthora cinnamomi* (Rosli, 2016; Li *et al.*, 2018;). Mientras que, Nascimento *et al.* (2021), ha mostrado que *Achromobacter xylosoxidans* tiene capacidad de producir ácido indolacético, ácido fenilacético, ácido salicílico, ácido benzoico y etileno.

## **1.5.6 Efecto de cepas de bacterias inoculadas en plantas micropropagadas de caña de azúcar durante la fase de aclimatación**

### **1.5.5.1 Variables de crecimiento**

El análisis de covarianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos ( $gl=15,87$ ;  $F= 2.92$ ;  $P<0.0001$ ). De acuerdo con los resultados de este estudio, las plantas inoculadas con *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56, *Acinetobacter vivianii* CPOC48, *Bacillus lincheniformis* CPOC11 y *Bacillus lincheniformis* CPOC3, mostraron los mejores resultados en las variables de crecimiento evaluadas, siendo estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos (Cuadro 1.6). Las plantas inoculadas con *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 tuvieron una altura promedio de 8.3 cm, lo que significa ( $gl=15,87$ ;  $F= 2.92$ ;  $P<0.0009$ ) un incremento del 40 % con respecto a plantas sin inocular (Tes). Además, las plantas desarrollaron mayor número de hojas al ser inoculadas con *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56, *Acinetobacter vivianii* CPOC48 y *Bacillus lincheniformis* CPOC11 con 4 hojas en promedio, mostrando diferencias estadísticas significativas con el resto de los tratamientos ( $gl=15,87$ ;  $F=0.74$ ;  $P<0.0001$ ). El mayor volumen radical se observó con la inoculación de *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 y

*Acinetobacter vivianii* CPOC48, con incrementos significativos ( $gl=15,87$ ;  $F= 1.69$ ;  $P<0.0001$ ) en el volumen de raíz de hasta 124% y 81 % respectivamente, comparado con plantas sin inocular (Tes). Con respecto al diámetro de tallo, se observó que diez cepas fueron estadísticamente diferentes al testigo (Tes) ( $gl=15,87$ ;  $F= 1.52$ ;  $P<0.0001$ ), siendo *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56, *Bacillus lincheniformis* CPOC3 y *Acinetobacter viviani* CPOC48, con los mayores valores. Otra variable importante es el área foliar, las plantas inoculadas con *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 mostraron diferencias estadísticas significativas con el resto de los tratamientos ( $gl=15,87$ ;  $F= 1.25$ ;  $P<0.0001$ ), obteniendo un área foliar promedio de 101.6 cm<sup>2</sup>, el cual representa un incremento altamente significativo de 107 % con respecto a plantas no inoculadas (Tes) (Cuadro 1.6).

Diferentes estudios han demostrado que varios géneros de bacterias son capaces de mejorar el crecimiento de plantas de caña de azúcar. Morgado *et al.* (2015), encontraron resultados similares al presente trabajo en plántulas de caña de azúcar durante la fase de aclimatación a los 75 días después de la inoculación de rizobacterias, con incrementos en la altura del 27.7 %, diámetro de tallo en 30.7%, mientras que el área foliar incrementó en 49 % y el número de brotes en 38.5 %. Las cepas usadas por los autores fueron de las especies *Pseudomonas luteola*, *Aeromonas salmonicida* y *Streptophomonas maltophilia*. También, Hossain *et al.* (2020), observaron que la inoculación de plántulas de caña de azúcar con *Bacillus cereus* BUSo13 y *Acinetobacter calcoaceticus* BUSo9 junto con diferentes dosis de nitrógeno en solución nutritiva, tuvieron un efecto positivo en la altura de planta, número de hojas, longitud de raíz y verdor de hoja, con respecto al testigo. Asimismo,

Patel *et al.* (2022), encontraron un mayor desarrollo en el número de hojas en plántulas de caña de azúcar y un incremento en la longitud de la raíz de 10.22% con respecto al testigo, al ser inoculadas con *Acinetobacter sp.* RSC9, incluso bajo condiciones de estrés salino. Mientras que Silva *et al.* (2021), observaron que la inoculación en plantas micropropagadas de caña de azúcar con *Acinetobacter iwoffii* Bac 109, tuvo efecto en la longitud de tallo con un aumento de 35 % con respecto a plantas no inoculadas (tratamiento testigo).

**Cuadro 1.6. Variables evaluadas de plántulas in vitro de caña de azúcar inoculadas con rizobacterias en la fase de aclimatización en invernadero.**

Cepas	Altura (cm)	No. hojas	Volumen radical (cm <sup>3</sup> )	Diámetro de tallo (mm)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )
CPOC56	8.31 <sub>a</sub>	4.06 <sub>a</sub>	2.72 <sub>a</sub>	2.70 <sub>a</sub>	101.63 <sub>a</sub>
CPOC60	7.02 <sub>b</sub>	3.59 <sub>ab</sub>	1.54 <sub>cde</sub>	2.43 <sub>abc</sub>	56.16 <sub>bc</sub>
CPOC22	7.00 <sub>b</sub>	3.62 <sub>ab</sub>	1.85 <sub>bcd</sub>	2.25 <sub>bc</sub>	62.52 <sub>b</sub>
CPOC36	6.94 <sub>bc</sub>	3.80 <sub>ab</sub>	1.84 <sub>bcde</sub>	2.46 <sub>ab</sub>	55.78 <sub>bc</sub>
CPOC12	6.78 <sub>bc</sub>	3.58 <sub>ab</sub>	1.78 <sub>bcde</sub>	2.45 <sub>ab</sub>	55.03 <sub>bc</sub>
CPOC45	6.71 <sub>bcde</sub>	3.93 <sub>ab</sub>	1.92 <sub>bcd</sub>	2.33 <sub>abc</sub>	59.81 <sub>bc</sub>
CPOC3	6.67 <sub>bcde</sub>	3.74 <sub>ab</sub>	1.81 <sub>bcde</sub>	2.66 <sub>a</sub>	58.10 <sub>bc</sub>
CPOC48	6.63 <sub>bcde</sub>	4.05 <sub>a</sub>	2.20 <sub>ab</sub>	2.50 <sub>ab</sub>	55.66 <sub>bc</sub>
CPOC49	6.53 <sub>bcde</sub>	3.70 <sub>ab</sub>	2.05 <sub>bc</sub>	2.43 <sub>ab</sub>	56.06 <sub>bc</sub>
CPOC32	6.46 <sub>bcde</sub>	3.93 <sub>ab</sub>	1.41 <sub>de</sub>	2.30 <sub>abc</sub>	62.63 <sub>b</sub>
CPOC11	6.30 <sub>bcde</sub>	4.04 <sub>a</sub>	1.68 <sub>bcde</sub>	2.20 <sub>bcd</sub>	57.24 <sub>bc</sub>
CPOC7	6.12 <sub>cde</sub>	3.85 <sub>ab</sub>	1.35 <sub>de</sub>	2.47 <sub>ab</sub>	66.12 <sub>b</sub>
CPOC5	6.12 <sub>cde</sub>	3.86 <sub>ab</sub>	1.53 <sub>cde</sub>	2.18 <sub>bcd</sub>	48.61 <sub>bc</sub>
CPOC57	5.84 <sub>e</sub>	3.85 <sub>ab</sub>	1.37 <sub>de</sub>	2.03 <sub>cd</sub>	41.46 <sub>c</sub>
Tes	5.93 <sub>de</sub>	3.43 <sub>b</sub>	1.21 <sub>e</sub>	1.81 <sub>d</sub>	49.07 <sub>bc</sub>
CME	0.7379	0.2739	0.3895	0.1591	399.65

\*Letras diferentes dentro de la misma columna mostraron diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ), **CME**=Cuadrado Medio del Error.

Por otra parte, los efectos positivos de la inoculación del género *Achromobacter*, se han observado en el crecimiento de plantas de pepino, donde las cepas SOLR10 y

AB2 de este género incrementaron la longitud de tallo y el volumen de raíz (Nascimento *et al.*, 2021). Asimismo, Abdel-Rahman *et al.* (2017), en tomate mostraron que *Achromobacter sp.* EMCC1936 incrementó significativamente la altura de la planta, diámetro de tallo y número de frutos por planta en 162 % con respecto al testigo. Mientras que, *Achromobacter spanius* promovió el crecimiento de otras gramíneas como *Phragmites australis* (Soares *et al.*, 2016) y *Lolium multiflorum* (Castanheira *et al.*, 2014).

Estos efectos positivos en el crecimiento de las plantas, probablemente se debió a alguna de las funciones que realizan las cepas de bacterias como producción de AIA, solubilización de fosfato, producción de sideróforos, fijación de nitrógeno, o degradación de celulosa. Con respecto a la producción de AIA, *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 fue capaz de producir 33.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA, mientras que, *Acinetobacter vivianii* CPOC48 produjo la cantidad más baja de AIA con 5.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

El AIA es una de las principales hormonas vegetales que las bacterias pueden producir y al que se le atribuye un mayor desarrollo radical, con lo que se aumenta la capacidad de absorción de nutrientes y se manifiesta en mayor crecimiento de la planta (Spaepen y Vanderlyeden, 2011). Con respecto a la solubilización de fosfato, *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 solubilizó menos fosfato (0.72  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y *Acinetobacter vivianii* CPOC48 solubilizó mayor cantidad (257.59  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Estudios realizados con *Vigna radiata* indicaron que la inoculación de *Acinetobacter sp.* SK2, mejoró el crecimiento de las plantas debido a que solubiliza una gran cantidad de fosfato tricálcico (682  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Bharward *et al.*, 2020), además, fue capaz solubilizar K, lo cual es un elemento importante para la activación de varias enzimas, que ayudan al

crecimiento vegetal (Etesami *et al.*, 2017). Govindarajan *et al.* (2006) y Pereira *et al.* (2019), encontraron que la inoculación de rizobacterias en plantas de caña de azúcar, estimula el desarrollo del sistema radical.

Este incremento en el crecimiento de la raíz permite una mayor exploración del suelo y una eficiente absorción de agua y nutrientes e incluso mejora el uso de los fertilizantes nitrogenados (Schultz *et al.*, 2016), lo cual conduce a un aumento en la producción de biomasa. Por consiguiente, estos dos mecanismos promotores de crecimiento, como la producción de ácido indolacético y solubilización de fosfato, pudieron influir principalmente, en mejorar el desarrollo de las plántulas de caña de azúcar en la fase de aclimatación. Según Lugtenberg y Kamilova (2009), las rizobacterias, además de ayudar al crecimiento de la planta mediante la nutrición, pueden aminorar el ataque de microorganismos patógenos, así como moderar los efectos deletéreos causados por los estreses bióticos y abióticos, como sucede en las plántulas de caña de azúcar producidas in-vitro, al momento de adaptarlas en invernadero.

#### **1.5.5.2 Biomasa seca**

En cuanto a biomasa seca, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $gl=15,87$ ;  $F= 1.69$ ;  $P<0.0001$ ) (Cuadro 1.7). Las plantas inoculadas con *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 presentaron incrementos significativos del 93 % y 37 %, en peso seco de la parte aérea y la raíz, con respecto a plantas no inoculadas.



**Cuadro 1.7. Peso seco de parte aérea y raíz de plántulas in vitro de caña de azúcar, inoculadas con rizobacterias durante la fase de aclimatización en invernadero.**

Cepas	g planta <sup>-1</sup>	
	Peso seco aéreo	Peso seco de raíz
CPOC56	0.305 <sub>a</sub>	0.218 <sub>a</sub>
CPOC48	0.202 <sub>b</sub>	0.185 <sub>ab</sub>
CPOC49	0.190 <sub>bc</sub>	0.167 <sub>bc</sub>
CPOC3	0.193 <sub>bc</sub>	0.182 <sub>ab</sub>
CPOC36	0.187 <sub>bc</sub>	0.177 <sub>b</sub>
CPOC45	0.197 <sub>bc</sub>	0.175 <sub>b</sub>
CPOC11	0.167 <sub>bc</sub>	0.158 <sub>bc</sub>
CPOC12	0.180 <sub>bc</sub>	0.161 <sub>bc</sub>
CPOC22	0.211 <sub>b</sub>	0.177 <sub>b</sub>
CPOC7	0.194 <sub>bc</sub>	0.176 <sub>b</sub>
CPOC32	0.181 <sub>bc</sub>	0.161 <sub>bc</sub>
CPOC5	0.163 <sub>bc</sub>	0.149 <sub>bc</sub>
CPOC60	0.186 <sub>bc</sub>	0.158 <sub>bc</sub>
Tes	0.158 <sub>bc</sub>	0.159 <sub>bc</sub>
CPOC57	0.147 <sub>c</sub>	0.131 <sub>c</sub>
CME	0.0027	0.0014

Letras diferentes dentro de la misma columna mostraron diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ), **CME**=Cuadrado Medio del Error.

En varios estudios se ha observado que el género *Achromobacter* posee atributos que promueven el crecimiento de las plantas, en investigaciones similares, se encontraron incrementos en la biomasa seca de tallo y raíz de plántulas de caña de azúcar del 29 % y 30% al ser inoculadas con *Achromobacter spanius* IP23 en comparación con plantas no inoculadas (Santos y Rigobelo, 2021). Por otra parte, los efectos positivos de *acinetobacter viviannii* CPOC48 solo se observaron en peso de la parte aérea y raíz, con aumentos significativos del 60 % y 39 %, respectivamente, al ser comparados con el testigo (Tes). Estudios realizados en trigo con la inoculación de *Acinetobacter guillouiae* EU-B2RT.R1 encontraron un aumento significativo en peso de biomasa aérea (34 g) y de raíz (17 g) con respecto al testigo. Estos resultados positivos, es probablemente debido a la producción de hormonas por las rizobacterias, lo cual

influye en la elongación de la raíz y mayor formación de hojas, lo cual se refleja en un incremento en la biomasa fresca y seca (Hossain *et al.*, 2020).

### 1.5.5.3 Contenido nutrimental

El análisis de covarianza mostró diferencias altamente significativas ( $gl=14,105$ ;  $F= 5.8$ ;  $P<0.000028$ ) entre tratamientos en el contenido de macronutrientes (N, P, K (Cuadro 1.8). Las plantas inoculadas con *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 fueron estadísticamente diferentes al resto de los tratamientos en el contenido de nitrógeno ( $4.61 \text{ mg planta}^{-1}$ ).

**Cuadro 1.8. Contenido de N, P y K en plantas de caña de azúcar micropropagadas, inoculadas con rizobacterias.**

Cepas	mg planta <sup>-1</sup>		
	Nitrógeno (N)	Fósforo (P)	Potasio (K)
CPOC56	4.61 <sub>a</sub>	0.042 <sub>e</sub>	2.79 <sub>ab</sub>
CPOC48	3.03 <sub>b</sub>	0.036 <sub>e</sub>	2.19 <sub>bcd</sub>
CPOC49	2.72 <sub>b</sub>	0.092 <sub>b</sub>	3.65 <sub>a</sub>
CPOC7	2.71 <sub>b</sub>	0.068 <sub>bcd</sub>	2.12 <sub>bcd</sub>
CPOC45	2.68 <sub>b</sub>	0.068 <sub>bcd</sub>	1.68 <sub>cd</sub>
CPOC36	2.66 <sub>b</sub>	0.073 <sub>bc</sub>	2.56 <sub>bc</sub>
CPOC3	2.60 <sub>b</sub>	0.055 <sub>cde</sub>	1.91 <sub>bcd</sub>
CPOC60	2.52 <sub>b</sub>	0.083 <sub>b</sub>	1.89 <sub>bcd</sub>
CPOC22	2.52 <sub>b</sub>	0.076 <sub>bc</sub>	2.80 <sub>ad</sub>
CPOC12	2.28 <sub>b</sub>	0.048 <sub>de</sub>	1.84 <sub>bcd</sub>
CPOC11	2.11 <sub>b</sub>	0.120 <sub>a</sub>	2.11 <sub>bcd</sub>
CPOC5	2.11 <sub>b</sub>	0.057 <sub>cde</sub>	1.94 <sub>bcd</sub>
CPOC32	2.04 <sub>b</sub>	0.055 <sub>cde</sub>	1.48 <sub>d</sub>
CPOC57	1.76 <sub>b</sub>	0.043 <sub>e</sub>	1.61 <sub>cd</sub>
TES	2.14 <sub>b</sub>	0.053 <sub>cde</sub>	1.74 <sub>cd</sub>
CME	0.595	0.000206	0.331

\*Letras diferentes dentro de la misma columna mostraron diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ), **CME**=Cuadrado Medio del Error.

Un estudio mostró que la inoculación de bacterias consideradas como fijadoras de nitrógeno tales como, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropidace*,

*Herbaspirillum rubisulbicas*, *Nitrospirillum amazonense* tienen un efecto positivo en la acumulación de nitrógeno en plantas de cañas de azúcar de hasta 42% más, que en plantas no inoculadas (Martins *et al.*, 2020). En esta investigación, aunque *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56, no mostró la habilidad de fijación de nitrógeno, las plantas inoculadas con esta cepa obtuvieron un incremento de 115 % de nitrógeno con respecto al tratamiento testigo, posiblemente debido a que estas plantas desarrollaron un mayor volumen radical, con el tuvieron mayor capacidad de exploración y captar mayor cantidad de este nutrimento. Santos y Rigobelo (2021) también encontró una mayor concentración de nitrógeno (69%) en plantas de caña de azúcar que incrementaron su volumen radical, al ser inoculadas con *Achromobacter spanius* IP23, comparado con plantas no inoculadas. Sin embargo, algunas bacterias que presentaron mecanismos de fijación de nitrógeno no presentaron efectos diferentes con respecto a las plantas no inoculadas. Según Moutia *et al.* (2010), la acumulación de nitrógeno depende del tipo de bacteria y su actividad nitrogenasa, ya que son más eficientes en cuanto a la fijación biológica de nitrógeno, por crecer dentro de los tejidos de la planta. Asimismo, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, una bacteria encontrada en caña de azúcar mejora la actividad nitrogenasa, cuando se desarrolla en espacios intercelulares con baja disponibilidad de nitrógeno (Dong *et al.*, 1995).

En cuanto al fósforo, la mayor concentración (0.12375 mg/ planta), se observó en plantas inoculadas con *Bacillus licheniformis* CPOC11, con un incremento significativo ( $gl=14,105$ ;  $F=20.03$ ;  $P<0.000023$ ) de 133 %, comparado con el testigo. Este resultado puede atribuirse a la capacidad de la cepa, de solubilizar fosfato ( $5.43 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y hacerlo disponible para la planta. El contenido de fósforo en parte aérea es importante,

ya que este nutrimento participa en varias funciones importantes como la síntesis de componentes celulares, de fosfolípidos, nucleótidos, entre otros (Taiz *et al.*, 2015). Rosa *et al.* (2020), mencionan que la inoculación de plantas de caña de azúcar con *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* junto con dosis bajas de fósforo, aumentaron la concentración de fósforo en hojas, Asimismo, dos Santos *et al.* (2020), encontraron que la inoculación de bacterias en dos variedades de plantas de caña de azúcar y utilizando solución nutritiva Hoagland con dosis baja en nitrógeno, aumento la concentración de fósforo y potasio, en comparación con plantas no inoculadas, lo cual puede estar ocurriendo en este experimento al utilizar solución nutritiva al 10%, lo que indica que los nutrimentos son absorbidos de manera eficiente con ayuda de las bacterias.

Por otra parte, el mayor contenido de potasio se encontró en plantas inoculadas con *Weizmannia ginsengihumi* CPOC49, seguido de *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 y *Bacillus safensis* CPOC22, con incrementos en las concentraciones de 108 %, 60% y 59 % con respecto al testigo (plantas sin inocular). El potasio es otro de los nutrientes importantes para el crecimiento y buen desarrollo de las plantas, siendo uno de los nutrimentos almacenados en grandes cantidades por las plantas de caña de azúcar, después del nitrógeno (Rossetto *et al.*, 2010). En algunos estudios se ha demostrado que algunas cepas de bacterias, tales como las que pertenecen al género *Achromobacter* sp. tienen la capacidad de solubilizar potasio (Santos y Rigobelo, 2020), que en esta forma puede ser absorbido por las plantas.

Además de las características mencionadas, probablemente las cepas poseen otros atributos que necesitan ser evaluadas y que no fueron estudiadas en esta

investigación. Otros factores pudieron haber influido sobre estos efectos positivos, tales, como la formación de biofilms, lo cual es un mecanismo que la bacteria utiliza para la colonizar los tejidos de la planta (Silva *et al.*, 2021). Se ha demostrado que bacterias de los géneros *Acinetobacter sp.* y *Achromobacter sp.* tienen la capacidad de producir biofilms, cuando entran en contacto con algunos cultivos, incluso con plantas de caña de azúcar (Syed-Ab-Rahman *et al.*, 2018; Vyas *et al.*, 2018). Souza *et al.* (2016), destaca que la etapa de crecimiento es otro factor que influye en la respuesta de la interacción planta-rizobacterias, ya que estos microorganismos colonizan los órganos de la planta en las primeras etapas de desarrollo. Por otra parte, Matoso *et al.* (2020), observaron que, en la respuesta a la inoculación de plántulas de caña de azúcar, influye la variedad del cultivo y el tipo de sustrato que se utiliza.

## **1.6 CONCLUSIONES**

El compost conformado por cachaza de caña de azúcar (T4) mostró la mayor población de hongos, bacterias totales, bacterias degradadoras de celulosa y actinomicetos. La mayor población de bacterias productoras de auxinas y bacterias fijadoras de nitrógeno se observó en el compost T1 (75% gallinaza y 25% cachaza) y las bacterias solubilizadoras de fosfatos fueron mayores en el compost T2 (50% gallinaza y 50 % de cachaza). El 22% de las bacterias aisladas mostraron capacidad de producir ácido indolacético, el 21.4 % de fijar nitrógeno, 10.7 % de solubilizar fosfato y solo el 6.93 % y 5 % tuvieron capacidad de producir sideróforos y actividad celulolítica, respectivamente.

Las 14 cepas de bacterias seleccionadas pertenecieron a siete géneros: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Paenarthrobacter*, *Weizmannia* y *Staphylococcus*. La mayor producción de ácido indolacético (AIA) se observó a las 48 h, diez cepas produjeron la mayor cantidad de AIA con valores que fluctuaron de 13.35  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 33.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Cinco cepas mostraron mayor capacidad de solubilizar fosfato con valores que van de 74.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 397.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los resultados del experimento con plantas micropropagadas de caña de azúcar mostraron efectos positivos de la inoculación principalmente con *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56, el cual mostró incrementos en la altura (40%), número de hojas (4), volumen radical (124%), diámetro de tallo (49%), área foliar (107%) y contenido de nitrógeno (115%) en material vegetal. Resultados de la presente investigación resaltan la importancia del compost de cachaza de caña de azúcar con gallinaza como fuente de microorganismos benéficos. Además, indica que la cepa bacteriana con los mejores resultados podría tener el potencial de ser utilizado para la aclimatación y crecimiento de plantas *in vitro* de caña de azúcar en invernadero.

## CAPITULO II. FILTRADOS BACTERIANOS EN LA ACLIMATACIÓN DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CAÑA DE AZÚCAR

### 2.1 RESUMEN

La micropropagación de caña de azúcar es una alternativa para la obtención de plantas uniformes; sin embargo, la etapa de aclimatización es la etapa más difícil para las plántulas *in-vitro*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de filtrados bacterianos en la aclimatización en invernadero de plantas micropropagadas de caña de azúcar. Se cultivaron 9 cepas en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) y se caracterizó la cinética de crecimiento bacteriana y la producción de ácido indol-3-acético con o sin presencia de triptófano. Posteriormente las cepas se cultivaron nuevamente por 72 h, se centrifugaron y filtraron. En total se obtuvieron 20 filtrados (incluyendo dos testigos), los cuales se inocularon en plantas micropropagadas de caña de azúcar en la fase aclimatización. El experimento se cosechó a los 50 días para determinar el efecto de los filtrados en el crecimiento de las plantas. La cinética de crecimiento bacteriano fue similar con o sin la presencia de triptófano. Las cepas de las especies *Acinetobacter vivvianii*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Enterobacter cloacae* produjeron ácido indolacético sin la presencia de triptófano, no obstante, la presencia de triptófano en el medio incrementó la producción de AIA. Los resultados de la inoculación de los filtrados en plantas de caña de azúcar mostraron que los filtrados de la cepa CPOC56 incrementaron la altura (53 %), área foliar (253%) y contenido de nitrógeno y fósforo, mientras que el filtrado de la cepa CPOC48 tuvo efectos positivos en volumen de raíz y contenido de potasio. Estos resultados sugieren que el uso de filtrados bacterianos en

la fase de aclimatación puede ser una alternativa para mejorar el crecimiento y adaptación de plantas micropropagadas en invernadero, debido a la presencia de compuestos contenidos en los sobrenadantes como el ácido indolacético.

Palabras clave: *Sobrenadantes libres de células bacterianas, ácido indolacético, cultivo de tejidos vegetales, rizobacterias, metabolitos secundarios.*



# BACTERIAL FILTRATES FOR ACCLIMATIZATION OF MICROPROPAGATED SUGARCANE PLANTS IN GREENHOUSES

## 2.2 ABSTRACT

The sugarcane micropropagation is an alternative for obtaining uniform and healthy plants; however, the acclimatization stage is a complicated stage for *in-vitro* plantlets. The objective of this work was to evaluate the effect of bacterial filtrates on greenhouse acclimatization of micropropagated sugarcane plants. Nine bacterial strains were cultivated in Luria-Bertani (LB) medium and the growth kinetics and the production of indole-3-acetic acid with or without the presence of tryptophan were characterized. Twenty bacterial filtrates (including two controls) were inoculated on micropropagated sugarcane plants in the acclimatization phase. The experiment was harvested after 50 days to determine the effect of the filtrates on plant growth. Bacterial growth kinetics were similar with or without the presence of tryptophan. The strains belonging to *Acinetobacter vivvianii*, *Achromobacter xylosoxidans* and *Enterobacter cloacae* produced indoleacetic acid without the presence of tryptophan, however, the presence of this in the medium increased AIA production. The results of the inoculation of the filtrates in sugarcane plants showed that the filtrate from the strain CPOC56 increases height (53 %), leaf area (253%) and nitrogen and phosphorus content, while the filtrate from the strain CPOC48 had positive effects on root volume and potassium content. These results suggest that the use of bacterial filtrates in the acclimatization phase can be an alternative to improve the growth and adaptation of micropropagated plants in

greenhouses, due to compounds contained in the supernatants such as indolacetic acid.

Key words: *Bacterial cell-free supernatants, indoleacetic acid, plant tissue culture, rhizobacteria, secondary metabolites.*

## 2.3 INTRODUCCIÓN

En México, la caña de azúcar es un cultivo importante, considerado como un cultivo básico por la Ley de Desarrollo Rural Sustentable y se encuentra dentro de los 10 cultivos más consumidos por las familias mexicanas (SAGARPA, 2017). No obstante, la siembra del cultivo de manera convencional con esquejes enfrenta una serie de problemas como: tasa baja de propagación, la calidad genética no se controla y la transmisión de patógenos a la planta es muy frecuente, afectando la producción y los rendimientos (Miranda *et al.*, 2018).

Una alternativa a estas dificultades es la micropropagación de plantas mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales (Sime, 2013), el cual garantiza una tasa de propagación más rápida; disponibilidad de material vegetal todo el año; individuos uniformes; evita la aparición y eliminación de patógenos (Lal, 2021). Sin embargo, la aclimatación, es quizá una de las etapas más importantes en la obtención de plantas por micropropagación, es un proceso de supervivencia y adaptación de las plantas para seguir su desarrollo y reducir su mortalidad (Scortecci *et al.*, 2012; Irsyadi, 2021), ya que durante el proceso de cultivo *in vitro* se eliminan también microorganismos benéficos como bacterias y hongos que podrían ayudar a la planta con su desarrollo y tolerar el estrés abiótico al que son sometidos (Panicker *et al.*, 2007; Bogino *et al.*, 2013).

Por otra parte, se conoce que las bacterias en interacción con plantas de caña de azúcar realizan diferentes funciones que contribuyen al crecimiento y desarrollo de la planta (Feitosa *et al.*, 2017; Wahla y Shukla, 2017; Patel *et al.*, 2019). Se ha observado

que la inoculación de caña de azúcar con bacterias benéficas que poseen diferentes atributos como capacidad de producir auxinas y sideróforos, fijar nitrógeno y solubilizar fosfatos, favorece el crecimiento vegetal, el desarrollo de pelos radicales y absorción de nutrimentos, (Mahanty *et al.*, 2017; Alam *et al.*, 2018). Auxinas como el ácido indol acético (AIA) intervienen en la división celular, elongación celular, la germinación de semillas y desarrollo de raíces (Wooward y Bartel, 2005; Ali, 2015). Se ha comprobado que el 80 % de las bacterias que tienen la capacidad de producir AIA, lo hacen a través de la vía del triptófano (Patten y Glick, 1996). También, se ha reportado que el AIA contenido en sobrenadantes libres de células o filtrados bacterianos aplicados en cultivo de tejidos, indujeron el enraizamiento e incrementaron significativamente el número de raíces de explantes, observándose un mayor desarrollo en comparación con la adición de AIA sintético (Sharma *et al.*, 2015). El AIA producido por bacterias puede sustituir productos comerciales, ya que este funciona como un fitoestimulante que mejora el desarrollo de pelos radicales y raíces laterales, por lo que aumenta la capacidad de la planta para absorber nutrientes del suelo (Spaepen y Vanderleyden, 2011). El uso de filtrados bacterianos en plantas micropropagadas durante la fase de aclimatación, puede ser una alternativa viable para favorecer el desarrollo y crecimiento de las plantas. El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar el efecto de filtrados, obtenidos de nueve cepas bacterianas crecidas en caldo nutritivo con o sin presencia de triptófano, en la fase de aclimatación en invernadero de plantas micropropagadas de caña de azúcar.

## **2.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

La primera parte del trabajo de la presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología del suelo, Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, ubicado la Carretera México-Texcoco Km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, entre las coordenadas 19° 27' 18" N y 98° 54' 25.9" O y una altitud de 2220 msnm. El clima predominante es templado semiseco y precipitación media anual de 686 mm. La segunda parte fue realizada en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos e invernadero, Campus Córdoba del Colegio de Postgraduados, ubicado en el Km 34.8 carretera federal Córdoba-Veracruz, congregación Manuel León, Municipio de Amatlán de los Reyes, Veracruz, entre las coordenadas 18° 51'05" N y 96° 52' 13" O y altitud de 650 msnm. El clima predominante es cálido húmedo con régimen de lluvias en verano y una precipitación media anual de 1800-2000 mm.

### **2.4.1 Cepas bacterianas utilizadas**

Se utilizaron ocho cepas bacterianas, las cuales fueron aisladas previamente de compost de cachaza de caña de azúcar con gallinaza (Cuadro 2.1). Fueron sembradas en agar nutritivo e incubadas a 28° C durante 24 horas, para su reactivación. Cabe destacar que las bacterias fueron elegidas debido a que presentaron varios mecanismos promotores de crecimiento vegetal.

**Cuadro 2.1. Cepas bacterianas aisladas de composta de cachaza de caña de azúcar con gallinaza.**

Clave de identificación	Identificada como	No. de acceso al GenBank
CPOC7	<i>Bacillus licheniformis</i>	ON982499
CPOC22	<i>Bacillus pumilus</i>	ON982502
CPOC36	<i>Bacillus australimaris</i>	ON982504
CPOC45	<i>Enterobacter cloacae</i>	ON982505
CPOC48	<i>Acinetobacter vivianii</i>	ON982506
CPOC56	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	ON982508
CPOC57	<i>Enterobacter hormaechei</i>	ON982509
CPOC61	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	ON982510

**2.4.2 Cinética de crecimiento y cuantificación de ácido indolacético (AIA)**

Las cepas se cultivaron por un periodo de 96 h. Los medios de cultivo utilizados fueron: caldo nutritivo y caldo nutritivo adicionado con triptófano ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ). El caldo nutritivo utilizado fue de la marca Merck y contenía: peptona de carne  $5 \text{ g L}^{-1}$ , extracto de carne  $3 \text{ g L}^{-1}$ . Las bacterias fueron sembradas en 1 ml de medio de cultivo en viales de 2 ml. Posteriormente fueron incubadas en un periodo de 96 h a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  a 180 rpm, evaluándolas cada 24 h.

Para la cinética de crecimiento se tomaron 200  $\mu\text{l}$  de muestra de cultivo bacteriano a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h, las cuales fueron depositadas en una microplaca de 96 pozos (Costar 3591, Corning incorporated, NY), posteriormente se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro Synergy 2 microplate reader, Biotek Instruments, Inc. a 600 nm.

La cuantificación de ácido indol-3-acético (AIA) también se realizó a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h usando solo los filtrados, sin la presencia de las bacterias. Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 7000 rpm durante 15 min, posteriormente se filtraron a

través de una membrana Millex estéril de 0.22  $\mu\text{m}$  y se tomó 150  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de cada cultivo y se depositó en microplacas de 96 celdas, añadiendo 150  $\mu\text{l}$  de reactivo Salkowski e incubándolos en oscuridad durante 30 min.

Los filtrados se analizaron en un espectrofotómetro Synergy 2 microplate reader, Biotek Instruments, Inc. a 530 nm (Almaraz-Suárez *et al.*, 2020). La concentración de AIA, se determinó en función a una curva estándar con concentraciones conocidas de ácido indol acético.

### **2.4.3 Filtrados bacterianos para el experimento de aclimatación**

Para la obtención de filtrados bacterianos en mayor cantidad y con el fin de utilizarlos en el experimento con plantas, las cepas de las bacterias fueron crecidas en caldo nutritivo (CN) y caldo nutritivo adicionado con triptófano (CNTRP) en tubos falcon de 50 ml durante 48 h.

Los cultivos bacterianos fueron centrifugados a 7000 rpm durante 15 minutos, posteriormente los sobrenadantes fueron filtrados en condiciones asépticas en frascos esterilizados de 50 ml con jeringas estériles de 5 ml y mediante unidades de filtración Millex (33mm) con membrana durapore y tamaño de poro de 22  $\mu\text{m}$ . Esto se realizó para cada cultivo bacteriano, finalmente se obtuvieron 18 filtrados bacterianos, incluyendo los testigos (Cuadro 2.2). Estos filtrados fueron conservados en una hielera para su traslado y su posterior inoculación.

**Cuadro 2.2. Cepas bacterianas sembradas en caldo nutritivo y caldo nutritivo adicionado con triptófano**

Medio de cultivo	Cepa bacteriana	Identificada como	Filtrado/Tratamiento
Caldo nutritivo (CN)	CPOC7	<i>Bacillus lincheniformis</i>	C7CN
	CPOC22	<i>Bacillus pumilus</i>	C22CN
	CPOC36	<i>Bacillus australimaris</i>	C36CN
	CPOC45	<i>Enterobacter cloacae</i>	C45CN
	CPOC48	<i>Acinetobacter vivianii</i>	C48CN
	CPOC56	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	C56CN
	CPOC57	<i>Enterobacter hormaechei</i>	C57CN
	CPOC61	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	C61CN
	S/B	N/A	TESCN
Caldo nutritivo con triptófano (CNTRP)	CPOC7	<i>Bacillus lincheniformis</i>	C7CNTRP
	CPOC22	<i>Bacillus pumilus</i>	C22CNTRP
	CPOC36	<i>Bacillus australimaris</i>	C36CNTRP
	CPOC45	<i>Enterobacter cloacae</i>	C45CNTRP
	CPOC48	<i>Acinetobacter vivianii</i>	C48CNTRP
	CPOC56	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	C56CNTRP
	CPOC57	<i>Enterobacter hormaechei</i>	C57CNTRP
	CPOC61	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	C61CNTRP
	S/B	N/A	TESCNTRP

#### **2.4.4 Inoculación de filtrados bacterianos en plantas micropropagadas de caña de azúcar en la fase de aclimatización en invernadero**

La fase de aclimatización de plántulas de caña de azúcar se efectuó en el invernadero de cultivo de tejidos vegetales del Campus Córdoba del Colegio de Postgraduados en los meses de febrero/2021-abril/2021. Para este experimento se utilizaron plantas micropropagadas de caña de azúcar de la variedad Mex 69-290. Estas plantas fueron retiradas de frascos de vidrio, para lavarlas y sumergirlas en una solución fúngica (INTERMICIN 50) durante 10 min. Se realizó una pre-aclimatización en invernadero en charolas de 72 cavidades con sustrato compuesto por agrolita, peat moss y tezontle (1:1:1 v/v/v), esterilizado tres veces a 18 lbs durante 3 horas en autoclave vertical.



Después de 20 días de pre-aclimatización, las plantas fueron transferidas a charolas de 32 cavidades con sustrato estéril (agrolita+peat moss+tezontle). Se escogieron 220 plantas homogéneas de un solo brote, se podaron raíces y parte aérea, para posteriormente sembrarlas en charolas y tomando como dato inicial la altura de la planta.

El experimento se estableció con 18 tratamientos (filtrados bacterianos) y 11 repeticiones para cada tratamiento (Cuadro 2.2). Las plantas se inocularon agregando 1.5 ml de filtrado bacteriano a las raíces con jeringas estériles de 5 ml. Las plantas fueron establecidas durante dos semanas en invernadero con malla sombra, posteriormente fueron transferidas a invernadero con mayor iluminación. EL riego se realizó diariamente y se fertilizó dos veces a la semana con 15 ml de solución nutritiva al 10 % (Steiner, 1961), aplicado con jeringas de 10 ml.

Las plantas fueron evaluadas a los 50 días después de la inoculación con las siguientes variables de crecimiento: altura de planta (regla graduada en cm); número de hojas (conteo manual); volumen de raíz (técnica de desplazamiento de agua por raíz en probeta graduada en mililitros) y diámetro de tallo (vernier en mm). El área foliar se determinó mediante una metodología no destructiva, descrita por Herman y Cámara (1999) para caña de azúcar:  $AF=C*L*0.75*(N+2)$  en donde; AF= área foliar; C=largo de la primera hoja completamente abierta; L=ancho de la primera hoja completamente abierta; 0.75= factor de corrección de la hoja del cultivo; N=número de hojas totalmente abiertas con por lo menos 20% de área verde; 2=factor de corrección.

Para peso seco, las muestras fueron secadas hasta peso constante en un horno Felisa, Modelo 242-A a 70 °C durante 72 h, posteriormente se pesaron en una balanza analítica Sartorius Modelo Analytic AC 210S, Illinois, EUA. Las muestras secas se molieron para determinar el contenido de nitrógeno (N), Fósforo (P) y potasio (K) en el laboratorio de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa. El N se determinó por el procedimiento semi-micro Kjeldahl (Etchevers, 1987). El P por colorimetría de complejos molibdofosfóricos reducidos con ácido ascórbico (AOAC, 1980) y el K por fotometría de llama (Rodríguez y Rodríguez, 2015).

#### **2.4.5 Diseño experimental y análisis estadístico**

Para el experimento en invernadero se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 10 X 2 con covariable, evaluando como factor A=nueve cepas bacterianas más un testigo (control) y como factor B=dos medios de cultivo de crecimiento de bacterias CN y CNTRP), tomando como covariable, altura inicial de la planta, con 11 repeticiones, bajo el siguiente modelo:

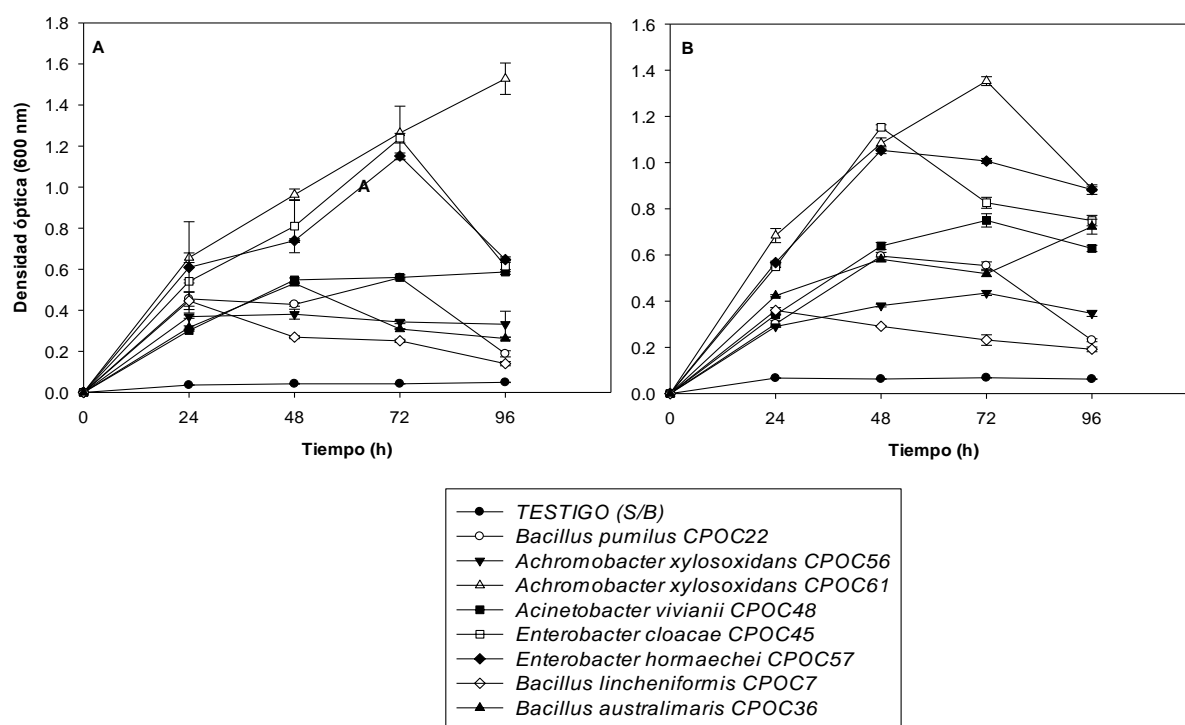
$$y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \beta(x_{ijk} - \bar{x}) + \varepsilon_{ijk}$$

EL análisis estadístico de los datos de las variables evaluadas se realizó mediante un análisis de covarianza y con comparación de medias Ls-means (P<0.05) en el paquete estadístico SAS 9.2.

## 2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.5.1 Cinética de crecimiento y cuantificación de ácido indolacético (AIA)

De acuerdo con la densidad óptica (DO), el crecimiento de las cepas tiene un comportamiento similar con o sin la presencia de triptófano en el medio cultivo (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Cinética de crecimiento de 9 cepas bacterianas a una densidad óptica de 600 nm **A)** sin presencia de triptófano **B)** con presencias de triptófano. \*S/B= sin bacteria.

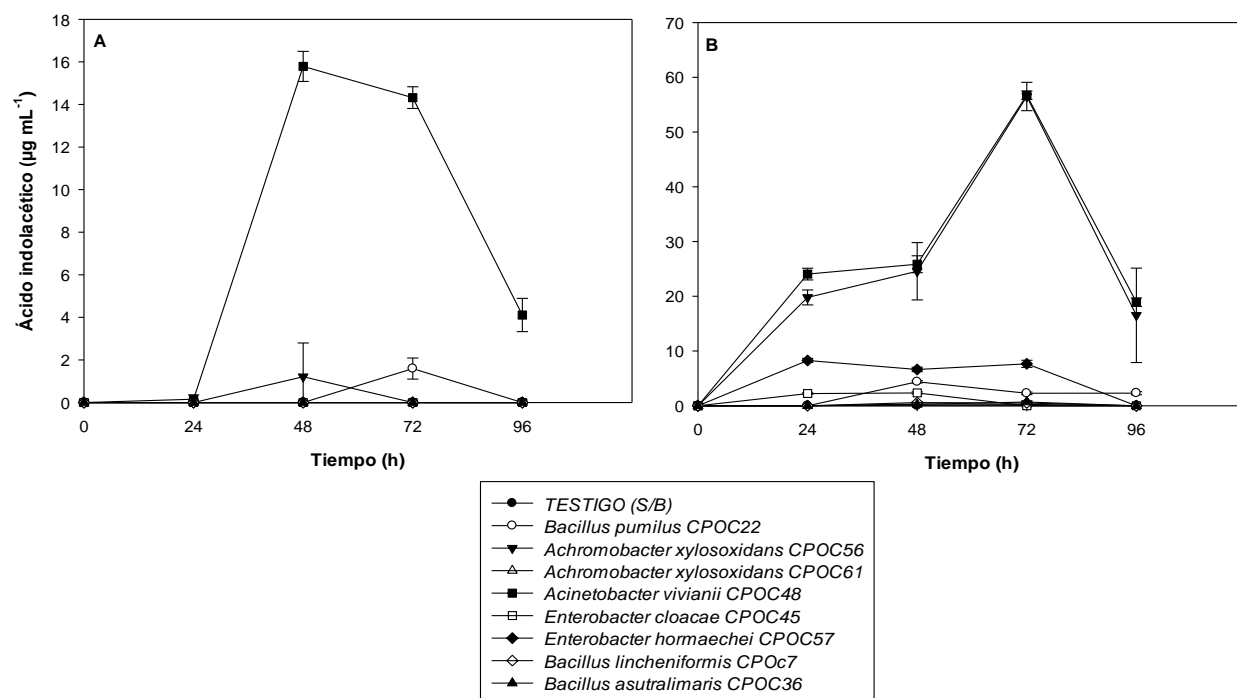
Sin la presencia de triptófano, *Achromobacter xylosoxidans* CPOC61 alcanzó su mayor crecimiento a las 96 h con una DO de 1.528, mientras que, en medio de cultivo adicionado con triptófano su mayor crecimiento se observó a las 72 h con 1.353 de DO. Por su parte, *Enterobacter cloacae* CPOC45 y *Enterobacter hormaechei* CPOC57 alcanzaron su mayor crecimiento a las 72 h, sin la presencia del triptófano

con 1.238 y 1.151 de DO, respectivamente; no obstante, la adición de triptófano en el medio adelantó su mayor crecimiento a las 48 h. Caso contrario sucede con *Bacillus pumilus* CPOC22, la presencia de triptófano afectó su crecimiento, observándose una mayor densidad óptica de 0.595 a las 72 h y sin la presencia de triptófano esta cepa alcanzó su mayor crecimiento a las 48 h con una DO de 0.559 (Figura 2.1).

Por otra parte, *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 y *Acinetobacter vivianii* CPOC48 tienen comportamientos similares, sin la presencia de triptófano en medio de cultivo, su mayor crecimiento se observó a las 48 h con DO de 0.381 y 0.548, respectivamente; encontrándose en una fase de estabilización que se prolongó hasta las 96 h. Sin embargo, la presencia de triptófano retardó su máximo crecimiento hasta las 72 h, para después entrar a una fase de declive.

Para el caso de *Bacillus australimari* CPOC36, con o sin presencia de triptófano en el medio su mayor crecimiento se observó a las 48 h. Mientras que el crecimiento de *Bacillus licheniformis* CPOC7 no fue afectado, con o sin presencia de triptófano en el medio, la mayor DO (0.446, 0.360) se observó a las 24 h, para después entrar en una fase de declive.

En cuanto a la producción de ácido indolacético (Figura 2.2) se observaron tres cepas capaces de producir esta auxina, sin presencia de triptófano en el medio de cultivo, siendo *Acinetobacter vivianii* CPOC48 la que produjo mayor cantidad de ácido indolacético con 15.78  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a las 48 h, seguido por *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 (1.21  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a las 48 h) y *Bacillus pumilus* CPOC22 (1.59  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a las 72 h).



**Figura 2.2.** Producción de ácido indolacético de 9 cepas bacterianas en un periodo de 0-96 h. **A)** Sin la presencia de triptófano; **B)** Con presencia de triptófano. \*S/B= sin bacteria.

No obstante, la presencia de triptófano en el medio de cultivo incrementó la cantidad de ácido indolacético producido por *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 y *Acinetobacter vivianii* CPOC48, las cuales produjeron la mayor cantidad de ácido indolacético a las 72 h con 56.72 µg mL<sup>-1</sup> y 56.5 µg mL<sup>-1</sup> respectivamente. Además, otras cepas como *Enterobacter hormaechei* CPOC57, *Bacillus pumilus* CPOC22 y *Enterobacter cloacae* CPOC45, fueron capaces de producir ácido indolacético con la presencia de triptófano en el medio, con cantidades menores a 10 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 2.2).

Aunque la adición de triptófano en el medio de cultivo pudo influir en la fase de crecimiento de las bacterias con respecto al tiempo, no hay una tendencia clara si el aumento de las células bacterianas en el medio es afectado por la adición de este compuesto, ya que la densidad óptica muestra comportamientos similares en el

periodo de evaluación (Figura 2.1). Sin embargo, el mayor impacto del triptófano en el medio se observó en la producción de ácido indolacético de las cepas bacterianas.

Ali (2015), menciona que la producción de ácido indolacético es dependiente de la densidad celular, ya que durante las primeras 24 h, las bacterias se encuentran en una fase de latencia, para después pasar a una fase exponencial, en donde se observa mayor densidad óptica, lo cual está relacionado con una mayor producción de ácido indolacético. Lin *et al.* (2018) encontró que la presencia del triptófano y el metabolito indol-3 piruvato, en el medio de cultivo incrementó las unidades formadoras de colonia de *Acinetobacter baumannii*, reflejándose en una mayor densidad óptica y en consecuencia se observó una mayor producción de ácido indolacético con respecto a otros medios sin la presencia de estos compuestos.

En algunas investigaciones similares, también se mostró que bacterias del género *Acrhomobacter sp.* y *Acinetobacter sp.* tienen la capacidad de producir ácido indolacético. Aeron *et al.* (2021), observaron que *Acrhomobacter xylosoxidans*, *Enterobacter hormaechei* y *Enterobacter cloaace*, son capaces de producir ácido indolacético, en presencia del triptófano en el medio, sin embargo, estas cepas no fueron capaces de producirlo sin la presencia de triptófano.

Patel *et al.* (2022) encontró que *Acinetobacter sp.* RSC9 produjo 14.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de AIA, utilizando triptófano en medio de cultivo como precursor, incluso bajo diferentes porcentajes de salinidad. Por su parte Park *et al.* (2021), encontró resultados similares para *Ignatzchineria* CG20001, donde el crecimiento de la cepa fue similar en medio de cultivo con o sin triptófano. Sin embargo, la producción de ácido indolacético aumentó

con la presencia del precursor, pasando de 102.5 mg L<sup>-1</sup> (sin triptófano) a 170 mg L<sup>-1</sup>, lo que confirma que la producción de AIA, es altamente dependiente de la adición de triptófano en el medio. De acuerdo con otras investigaciones, algunas bacterias como *Azospirillum oryzae* NBT506 y *Bacillus velezensis* UTB96 son capaces de producir ácido indolacético a las 24 h con cantidades de hasta 41.47 mg L<sup>-1</sup> y 10.16 mg L<sup>-1</sup> respectivamente, sin la presencia de algún aditivo o precursor en el medio de cultivo (Bagheri *et al.*, 2022).

Estudios realizados con el género *Burkholderia*, mostraron que la producción de ácido indolacético es menor sin la presencia de triptófano, lo cual osciló de 1.80 a 3.61 µg mL<sup>-1</sup>, mientras que, con la presencia de triptófano en medio de cultivo, la cantidad producida fue entre 2.77 y 5.06 µg mL<sup>-1</sup> (Aroumougame *et al.*, 2020). Asimismo, *Pseudomonas aeuroginosa* B18, bacteria aislada de raíces de caña de azúcar, mostró la capacidad de producir AIA sin la presencia de triptófano de hasta 97.96 µg mL<sup>-1</sup>, y la adición de este compuesto en medio de cultivo elevó las cantidades de AIA producido hasta en un 62 %, de acuerdo con la cantidad de triptófano adicionado (Singh *et al.*, 2021). Estos comportamientos también se observaron en este estudio principalmente con *Acinetobacter vivianii* CPOC48, *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 y *Bacillus pumilus* CPOC22. Aunque produjeron pequeñas cantidades de AIA sin la presencia de triptófano, la adición del precursor al medio de cultivo incrementó la cantidad de AIA producido por las cepas. Además, estas cepas mostraron menores densidades ópticas (DO), con respecto a otras cepas como *Achromobacter xylosoxidans* CPOC61, en la cual se observó 1.35 de DO, aunque, la producción de ácido indolacético fue casi nulo, con o sin presencia del triptófano.

Estos estudios demuestran que la presencia de triptófano en el medio favorece una mayor producción de ácido indolacético, aunque sea a bajas densidades celulares, por lo que se puede asumir que un gran porcentaje de cepas de bacterias, requieren de la presencia del precursor para producir ácido indolacético.

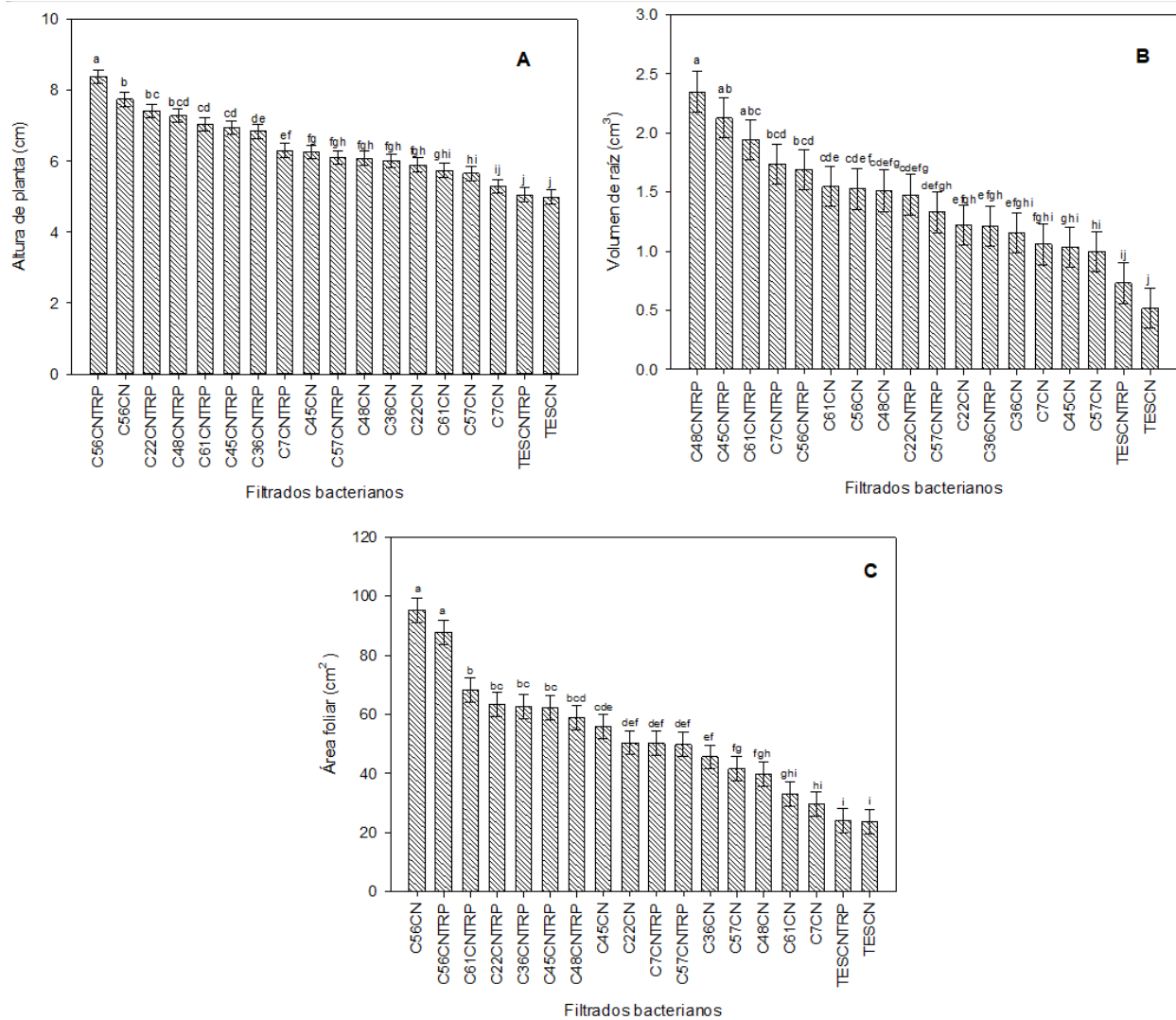
## **2.5.2 Inoculación de filtrados bacterianos en plantas micropropagadas de caña de azúcar en la fase de aclimatización en invernadero**

### **2.5.2.1 Variables de crecimiento**

El análisis de covarianza mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ). Algunos de los filtrados bacterianos tuvieron efectos positivos significativos en las variables de crecimiento evaluadas.

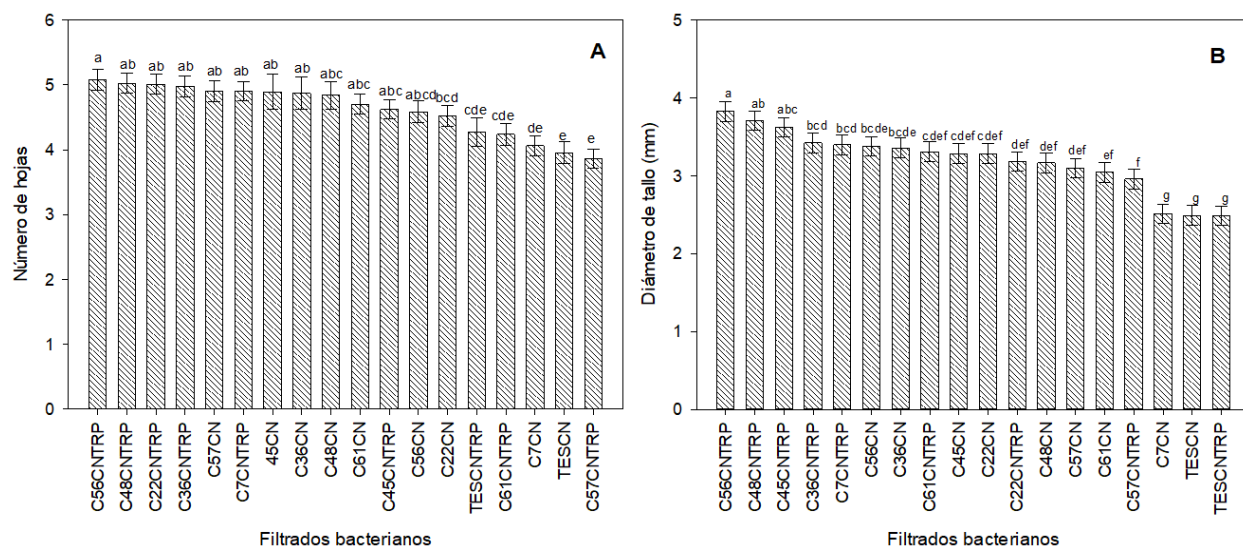
Las plantas con los filtrados C56CNTRP, C22CNTRP y C56CN, mostraron incrementos significativos ( $gl=8,179$ ;  $F=2.73$ ;  $P < 0.0072$ ) en altura de la planta del 53 %, 46 % y 41 % con respecto a los testigos (TESCNTRP y TESCN). En cuanto al volumen de raíz, se observó que las plantas con el filtrado C48CNTRP fueron estadísticamente ( $gl=8,179$ ;  $F=2.11$ ;  $P < 0.037$ ) superiores a los filtrados testigos (TESCNTRP, TESCN), mostrando un incremento de 263 %. Mientras que, para el área foliar, se encontró que plantas con los filtrados C56CN y C56CNTRP mostraron diferencias estadísticas significativas ( $gl=8,180$ ;  $F=4.73$ ;  $P < 0.0001$ ) con respecto a los filtrados C48CN, C61CN C7CN y a los testigos TESCNTRP y TESCN (Figura 2.3).





**Figura 2.3.** Variables evaluadas en plantas micropropagadas de caña de azúcar, inoculadas con filtrados bacterianos en la fase de aclimatización en invernadero. A) Altura de planta; B) Volumen de raíz; C) Área foliar. \*Promedios con diferente letra mostraron diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ).

Por otra parte, también se encontraron diferencias significativas entre los filtrados bacterianos para las variables, número de hojas ( $gl=8,162$ ;  $F=2.95$ ;  $P<0.0042$ ) y diámetro de tallo ( $gl=8,179$ ;  $F=3.61$ ;  $P<0.007$ ), en el cual se observó que los filtrados C56CNTRP y C48CNTRP obtuvieron el mayor número de hojas (5 hojas) y mayor diámetro de tallo (3.8 mm), en comparación con los filtrados testigos (TESCN, TESCNTRP) (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Variables evaluadas en plantas micropropagadas de caña de azúcar, inoculadas con filtrados bacterianos en la fase de aclimatización en invernadero. A) Número de hojas; B) Volumen de raíz; B) Diámetro de tallo. \*Promedios con diferente letra mostraron diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ).

Varios estudios han mostrado que la inoculación de bacterias productoras de fitohormonas, tienen efectos positivos en variables de crecimiento de plantas de caña de azúcar. Por ejemplo, se ha encontrado que la inoculación de *Rhizobium* sp. BR10268 en plántulas de caña de azúcar bajo condiciones de invernadero, incrementó la longitud de tallo (62.5 cm) y volumen de raíz (8.6cm<sup>3</sup>) a los 30 días, mientras que, a los 75 días los efectos positivos se observaron en diámetro de tallo (8.2 cm), volumen de raíz (54 cm<sup>3</sup>) y área foliar (544 cm<sup>2</sup>) (Ferreira *et al.*, 2020). Esta bacteria presentó capacidad de producir ácido indolacético y giberelinas, por lo que estas sustancias, pudieran estar ejerciendo un efecto positivo en la planta (Ferreira *et al.*, 2020).

Según Cassan *et al.* (2014) los reguladores de crecimiento producidos por bacterias tales como auxinas, citoquininas, giberelinas y acetileno, pueden contribuir al desarrollo de raíces adventicias y laterales, elongación de la raíz y división celular, desde una

etapa temprana. Aun cuando en esta investigación se inocularon solo los sobrenadantes de cultivo bacteriano libre de células (filtrados bacterianos), se observaron efectos positivos en el desarrollo de plantas de caña de azúcar. Fukami *et al.* (2017) menciona que el buen desarrollo de las plantas está influenciado por la producción de metabolitos secundarios presentes en el sobrenadante de cultivos bacterianos, como ácido-indol-acético, indol-3 etanol, ácido-indol-3 láctico y ácido salicílico, además, en presencia del triptófano, en el sobrenadante también se puede detectar trazas de ácido giberélico y ácido jasmónico. Asimismo, Ali (2015) encontró otro tipo de metabolitos secundarios en el sobrenadante de diferentes cultivos de bacterias, como ácido fosfórico, ácido antranílico, ácido esteárico y ácido fenilpirúvico. Por lo que, los resultados positivos observados en la presente investigación, puede ser debido a que los filtrados C56CNTRP, C22CNTRP y C48CNTRP, contenían, además del ácido indolacético, otras sustancias o metabolitos secundarios producidos por las bacterias. Otro filtrado que mostró mejor resultado fue el C56CN, obtenido del cultivo de la cepa CPOC56 sin la presencia de triptófano. Esta cepa fue capaz de producir ácido indolacético sin la adición del triptófano, aunque produjo esta auxina en bajas concentraciones, se observó un efecto positivo en el desarrollo de las plantas.

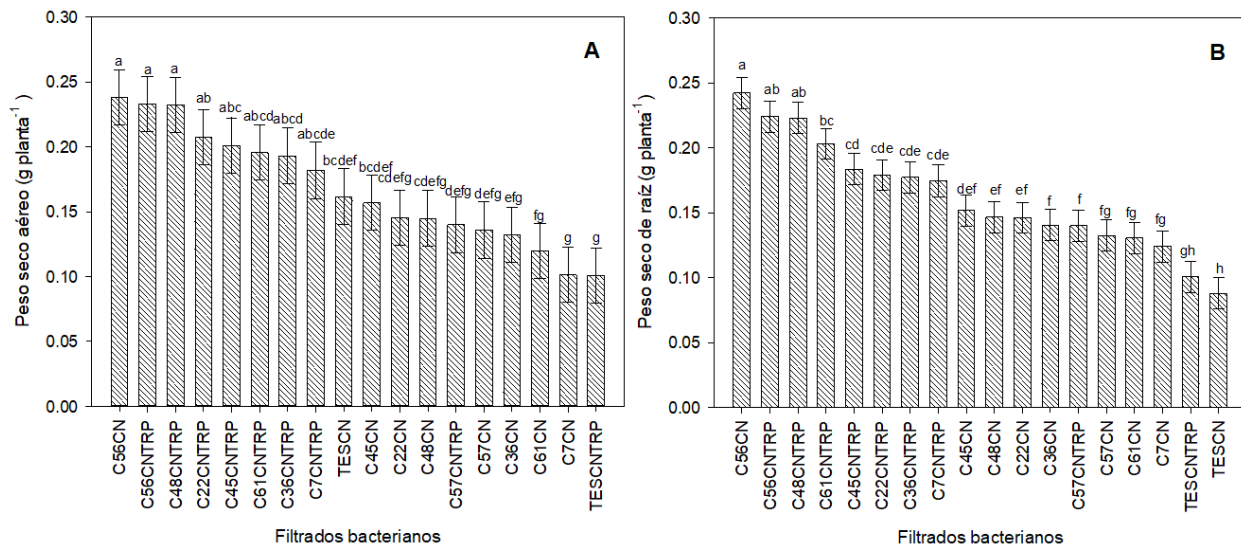
En un estudio con plantas de *Chysanthenum morifolium* y *Mentha suaveolans* se observó que la inoculación del sobrenadante libre de células del cultivo bacteriano de la cepa *Ignatzschineria sp.* CG20001, aumentó el número de raíces y longitud de raíces adventicias en un 50% comparado con plantas sin inoculación, atribuyendo este efecto a la cantidad de AIA producido por dicha cepa (Park *et al.*, 2021). efecto similar sucedió con el filtrado C48CNTRP del presente trabajo, ya que las plantas tratadas con

este filtrado tuvieron mayor volumen de raíces en relación al testigo, tal vez debido a que el filtrado contenía la mayor cantidad de ácido indolacético. Algunos autores mencionan que el desarrollo de las raíces en mayor volumen ayuda a la planta en una mayor absorción de nutrientes y agua, por lo que se reflejaría en un mayor crecimiento de la parte aérea (Spaepen y Vanderlyeden, 2011). Asimismo, experimentos realizados con *Cajanus cajan*, mostraron que la inoculación de sobrenadantes de cultivos libres de células bacterianas de *Bradyrhizobium* sp. IC-4059 en fase de laboratorio y campo, tuvieron efectos positivos en la longitud de tallo, longitud de raíz y biomasa seca, comparado con plantas no inoculadas. Dichos resultados fueron atribuidos a los compuestos contenidos en el sobrenadante, posiblemente fitohormonas (Tewari *et al.*, 2020).

También se ha observado en maíz, que las semillas y las hojas tratadas con el sobrenadante de *Azospirillum* incrementan el crecimiento de las plantas lo cual se atribuyó a la presencia de metabolitos secundarios tales como: ácido indolacético, indol-3-etanol y ácido salicílico, en el sobrenadante (Fukami *et al.*, 2017). Baroja-Fernandez *et al.* (2021) encontró que la aplicación exógena de filtrados libres de células de *Trichoderma harzianum* (CECT 2413), *Alternaria alternata* (CECT20912) y *Penicillium aurantiogriseum* (CECT 20226), promovió el desarrollo de raíz y aceleró el desarrollo de fruto del cultivo de pimiento bajo condiciones de invernadero, atribuyendo estos resultados a las sustancias que contiene los filtrados, como auxinas citoquininas aminoácidos y compuestos volátiles que actúan como bioestimulantes en el desarrollo de la planta.

### 2.5.2.2 Peso seco aéreo y de raíz

De acuerdo con el análisis de covarianza se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los filtrados bacterianos para las variables peso seco aéreo ( $gl=8,179$ ;  $F= 2.74$ ;  $P<0.0072$ ) y peso seco de raíz ( $gl=8,179$ ;  $F=3.25$ ;  $P<0.0017$ ). Los filtrados C56CN, C56CNTRP y C48CNTRP mostraron incrementos en peso seco de la parte aérea del 47 %, 44 %, 43 % respectivamente, en comparación con los filtrados testigos, mientras que, en peso seco de raíz, el filtrado C56CN incrementó en 140% con respecto a los testigos (TESCN, TESCNTRP) (Figura 2.5).



**Figura 2.5.** A) Peso seco aéreo y B) Peso seco de raíz en plantas micropropagadas de caña de azúcar, inoculadas con filtrados bacterianos en la fase de aclimatización en invernadero. \*Promedios con diferente letra mostraron diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ).

Estos resultados en el peso seco, puede ser debido a la cantidad de filtrados bacterianos inoculados en las plantas o la concentración contenida en el sobrenadante, por lo que una mayor o menor cantidad de inóculo pudiera influir en esta variable. Dos Santos *et al.* (2019) menciona que las diferentes cantidades de auxinas que producen

las cepas bacterianas o las dosis que se inoculan en las plantas puede afectar el desarrollo y crecimiento de las plántulas, en una forma negativa o positiva.

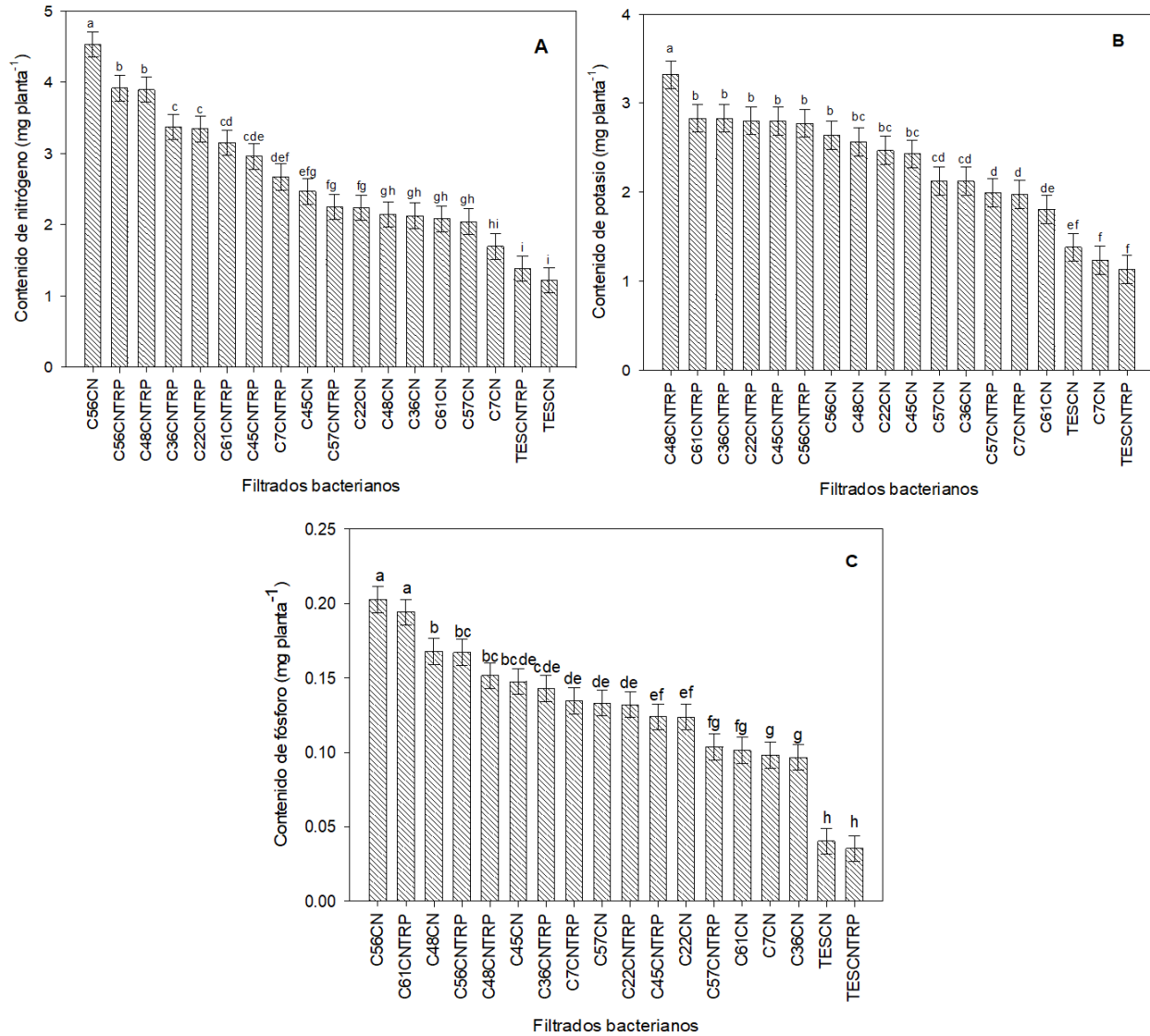
También es importante considerar que en el número de hojas y diámetro de tallo se observaron diferencias estadísticas significativas, por lo que este comportamiento se refleja en el peso seco. Los efectos positivos de la aplicación del sobrenadante de cultivo o filtrados bacterianos se han observado en otras investigaciones, como la de Park *et al.* (2021) en la que observaron que la inoculación de sobrenadante del cultivo bacteriano de *Ignatzschineria sp.* CG20001 incrementó el peso fresco de raíz de *Mentha suaveolans* en 100%, comparado con plantas sin tratar. Estudios realizados con *Brassica oleracea*, revelaron que la aplicación del sobrenadante libre de células del cultivo bacteriano de *Ignatzschineria sp.* CG20001 combinado con fertilización orgánica y química, estimuló el desarrollo de hojas con lo cual obtuvieron mayor peso fresco de la parte aérea hasta 200% más que en plantas sin aplicación de filtrado bacteriano y sin fertilización (Park y Shin, 2022).

Estos resultados, sugieren que los filtrados en combinación con fertilización pudieron estar actuando sinérgicamente y afectando a la planta de manera positiva, posiblemente por la presencia de AIA en los filtrados bacterianos, lo que contribuyó, en el desarrollo y actividad de las raíces de las plantas. Wadawati (2018), menciona que los rendimientos de los cultivos se incrementan cuando hay una mayor disponibilidad de nutrientes debido a la función que realizan las bacterias promotoras de crecimiento en combinación con fertilizantes orgánicos o inorgánicos.

### 2.5.2.3 Contenido de nutrientes

Se observó que el contenido de nitrógeno incrementó en más del 100 % en plantas inoculadas con el filtrado C56CN, seguido de C56CNTRP y C48CNTRP, los cuales fueron estadísticamente diferentes ( $gl=8,179$ ;  $F=8.15$ ;  $P<0.0001$ ) a los filtrados testigos TESCNTRP y TESCN (Figura 2.6). Asimismo, se encontraron diferencias estadísticas significativas para el contenido de fósforo ( $gl=8,179$ ;  $F= 11.7$ ;  $P<0.0001$ ), siendo las plantas inoculadas con los filtrados C56CN y C61CNTRP las que tuvieron los mayores valores con  $0.223 \text{ mg planta}^{-1}$  y  $0.2125 \text{ mg planta}^{-1}$ , respectivamente. En cuanto al contenido de potasio, las plantas inoculadas con los filtrados C48CNTRP tuvieron el mayor valor de potasio ( $gl=8,179$ ;  $F= 3.85$ ;  $P<0.0003$ ), siendo de más del 100% con respecto a los testigos TESCNTRP y TESCN.

El aumento en el contenido de nutrientes como el nitrógeno, fósforo y potasio en las plantas, puede deberse a que el ácido indolacético presente en los filtrados bacterianos ejerce una reacción positiva para la absorción y metabolismo de estos nutrientes. Hayat *et al.* (2009) menciona que independiente del tipo de auxina, estas hormonas, mejoran el metabolismo del nitrógeno, la fotosíntesis y el rendimiento de algunos cultivos. En leguminosas el uso de estos compuestos incrementa la nodulación, contenido leghemoglobina y las enzimas para asimilación del nitrógeno. Por su parte Hoppkins (1995), menciona que las fitohormonas regulan el proceso de fijación de nitrógeno, ya que estos compuestos inducen la expresión de genes específicos y activa varias enzimas que participan en el proceso (Woodward y Bartel, 2005).



**Figura 2.6.** Contenido de A) nitrógeno, B) potasio y C) fósforo en plantas micropropagadas de caña de azúcar micropropagadas e inoculadas con filtrados bacterianos. \*Promedios con diferente letra mostraron diferencias estadísticas significativas ( $\alpha=0.05$ ).

Santos *et al.* (2021) también encontró una mayor acumulación de nutrientes en plantas de caña de azúcar al ser inoculadas con *Achromobacter spanius* IP23, atribuyendo estos resultados al incremento en el volumen radical y a la captación eficiente de los nutrimentos. Esto posiblemente explica el efecto de los filtrados bacterianos en el contenido de nutrimentos del presente trabajo, en particular de los que provienen de las cepas *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 y *Acinetobacter vivianii* CPOC48.



Khalid *et al.* (2004) y Ali *et al.* (2009), mencionan que las auxinas provenientes de la síntesis microbiológica juegan un papel fundamental, en promover el crecimiento de las plantas, debido a que estas hormonas regularmente funcionan como biomoléculas de señalización. Sin embargo, dependiendo de la concentración estos compuestos producidos por las bacterias, estas pueden actuar como inhibitorias sobre el crecimiento de las plantas (Spaepen *et al.*, 2007), el cual puede ser atribuido a un estrés hormonal que afecta el desarrollo de estas (Dos santos *et al.*, 2019). Las investigaciones con filtrados bacterianos en la fase de aclimatación en plantas caña de azúcar son casi nulas. Algunas de ellas fueron enfocadas principalmente a la utilización de filtrados o sobrenadantes libres de células bacterianas como agentes biocontrol contra de enfermedades. Shastri *et al.* (2020), descubrió que el uso de sobrenadante libre de células bacterianas de *Bacillus subtilis* S17, inhibió el crecimiento micelial en más de 70 % de *Colletotrichum falcatum*, un hongo patógeno causante de enfermedades en plantas de caña de azúcar, esto debido a que los metabolitos contenidos en los filtrados bacterianos tienen actividad antagónica contra este hongo. Aunque, en nuestra investigación no se evaluó la capacidad antagónica de las cepas bacterianas, quizá los filtrados bacterianos también actuaron en este sentido, evitando el desarrollo de enfermedades en las plantas de caña de azúcar y con lo cual se observó mayor crecimiento.

## 2.6 CONCLUSIONES

De las nueve cepas seleccionadas, *Achromobacter xylosoxidans* CPOC61 mostró mayor densidad óptica en caldo nutritivo y caldo nutritivo adicionado con triptófano. *Acinetobacter viviani* CPOC48, *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 y *Bacillus*

*pumilus* CPOC22 fueron capaces de producir ácido indolacético sin la presencia de triptófano con cantidades que van de 1.21  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 15.78  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

La cantidad de ácido indolacético producida en presencia de triptófano, por las cepas *Acinetobacter viviani* CPOC48, *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56 se incrementó hasta en 56.72  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y 56.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

En el experimento con plantas micropropagadas de caña de azúcar se observaron efectos positivos de los filtrados C56CNTRP (obtenido de *Achromobacter xylosoxidans*), C56CN (obtenido de *Achromobacter xylosoxidans*) y CNTRP48 (obtenido de *Acinetobacter viviani*), los cuales incrementaron en las plantas la altura (53 %), volumen radical (263 %), área foliar (264 %) y contenido de nitrógeno, fósforo y potasio (en más del 100 %) con respecto a los testigos. Resultados de la presente investigación indican que los filtrados bacterianos pueden ser utilizados para la aclimatación y ayudar en el desarrollo de plantas micropropagadas de caña de azúcar.

## CONCLUSIONES GENERALES

El compost de cachaza de caña de azúcar y gallinaza mostró una gran diversidad de microorganismos como hongos, bacterias, y actinomicetos, de los cuales, las bacterias mostraron diferentes capacidades promotoras de crecimiento como; fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, producción de ácido indolacético, producción de sideróforos y actividad celulolítica. Las bacterias seleccionadas para los experimentos pertenecen a siete géneros diferentes: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Paenarthrobacter*, *Weizmannia* y *Staphylococcus*. La especie bacteriana *Achromobacter xylosoxidans* CPOC56, mostró efectos positivos e incrementos en la altura, número de hojas, volumen radical, diámetro de tallo, área foliar y contenido de nitrógeno en material vegetal, al ser inoculada en plantas micropropagadas de caña de azúcar.

La aplicación de los filtrados C56CNTRP (*Achromobacter xylosoxidans*) y C48CNTRP (*Acinetobacter vivianii*), provenientes del cultivo bacteriano en medio adicionado con triptófano contribuyeron al crecimiento de plantas micropropagadas de caña de azúcar, principalmente en variables como altura de planta, volumen radical, área foliar y contenido de nutrientes (N, P, K). La utilización de los filtrados bacterianos podrían ser una buena opción para la aclimatación de plantas en invernadero. Esta investigación contribuye con datos obtenidos en invernadero, que pudieran servir para futuras investigaciones relacionadas al uso de rizobacterias en la aclimatación de plantas obtenidas *in vitro*. Por lo que es importante aportar tecnologías para un mejor manejo de los cultivos e incrementar la productividad, pero con responsabilidad ambiental.

## LITERATURA CITADA

- Abdel-Rahman, H. M., Salem, A. A., Moustafa, M., & El-Garhy, H. A. 2017. A novice *Achromobacter* sp. EMCC1936 strain acts as a plant-growth-promoting agent. *Acta Physiologiae Plantarum*. 39(2): 1-15.
- Abou, F. S., Hammoud, M., El Sebaaly, Z., & Sassine, Y. N. 2021. Improvement of compost quality. *In: Mushrooms *Agaricus bisporus**, Sassine, Y. N. (ed). march, 2021, London, U.K. Emma McCann. pp: 136-189.
- Aeron, A., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. 2021. Next-Generation biofertilizers and novel biostimulants: Documentation and validation of mechanism of endophytic plant growth-promoting rhizobacteria in tomato. *Archives of Microbiology*. 203(6): 3715-3726.
- Ahmed, A. Z. 2017. Response of three sugar cane varieties to phosphorus bio fertilization. *Egyptian Journal of Agronomy*. 39 (2): 149-158.
- Ahmed, B., Zaidi, A., Khan, M., Rizvi, A., Saif, S., & Shahid, M. 2017. Perspectives of plant growth promoting rhizobacteria in growth enhancement and sustainable production of tomato. *In: Microbial strategies for vegetable production*, Zaidi, A. & Khan, M. (ed.). June 2017, Aligarh, India. Dept of Agricultural Microbiology. pp: 125-149.
- Alam, I. T., Nesa, S. R., Alam, K. M., Begum, A., & Akhter, H. 2019. Phenotypic and molecular characterization of diazotrophic bacteria associated with sugarcane in Bangladesh. *Organic Agriculture*. 9(3): 331-343.
- Ali, B. 2015. Bacterial auxin signaling: comparative study of growth induction in *Arabidopsis thaliana* and *Triticum aestivum*. *Turkish Journal of Botany*. 39(1): 1-9.
- Ali, B., Sabri, A. N., Ljung, K., & Hasnain, S. 2009. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Letters in Applied Microbiology*. 48(5): 542-547.
- Almaraz-Suárez, J. J., Pineda-Mendoza, D. Y., & Heredia-Acuña, C. 2020. Métodos prácticos para el estudio de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *In: Microbiología aplicada a la Agricultura y Agroecosistemas, Principios y Técnicas para su Investigación*, Ferrera C. R., Delgadillo M. J., Alarcón A, Alvarado L. J., Pérez M. J., & Almaraz S. J. J. (ed.), Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Colegio de Postgraduados. pp: 227-240.
- Alvarez, V. M., Largo, A., Iglesias, A. S., & Castillo, J. 2019. Calidad de compost obtenido a partir de estiércol de gallina, con aplicación de microorganismos benéficos. *Scientia Agropecuaria*. 10 (3): 353-361.

- Andreote, F. D. & Silva, M. C. 2017. Microbial communities associated with plants: Learning from nature to apply it in agricultura. *Current Opinion in Microbiology*. 37: 29-34.
- Antoun, H. 2013. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *In: Brenner's Encyclopedia of Genetics*, Maloy, S., & Hughes, K. (ed.), San Diego, California, USA .2nd edition, Academic press of Elsevier. pp: 353-355.
- Arreola-Enríquez, J., Palma-López, D. J., Salgado-García, S., Camacho-Chiu, W., Obrador-Olán, J. J., Juárez-López, J. F., & Pastrana-Aponte, L. 2004. Evaluación de abono órgano-mineral de cachaza en la producción y calidad de la caña de azúcar. *Terra Latinoamericana*. 22(3): 351–357.
- AOAC. 1980. Official Methods of Analysis. Horwitz, W. (ed.). 13th Ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C., USA. 387 p.
- Aroumougame, S., Geetha, T. M., & Thangaraju, M. 2020. Exploitation of PGPR endophytic *Burkholderia* isolates to enhance organic agriculture. *American Journal BioScience*. 8(3): 57-64.
- Bagheri, N., Ahmadzadeh, M., Mariotte, P., & Jouzani, G. S. 2022. Behavior and interactions of the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum oryzae* NBT506 and *Bacillus velezensis* UTB96 in a co-culture system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 38(6): 1-12.
- Baroja-Fernández, E., Almagro, G., Sánchez-López, Á. M., Bahaji, A., Gámez-Arcas, S., De Diego, N. & Pozueta-Romero, J. 2021. Enhanced yield of pepper plants promoted by soil application of volatiles from cell-free fungal culture filtrates is associated with activation of the beneficial soil microbiota. *Frontiers in Plant Science* 12: 752653.
- Bektaş, E., Cüce, M., & Sökmen, A. 2013. In vitro germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey. *Turkish Journal of Botany*. 37(2): 336-342.
- Bello, B. J. J. & Flores, R. C. 2016. Certificación fitosanitaria de vitroplantas de *Saccharum* spp. para establecer semilleros básicos. *Agroproductividad*. 9(3): 35-39.
- Bello, B. J. J., Morales, R. V. & Gómez, M. F. C. 2014. Conservación de recursos genéticos de Caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Agroproductividad*. 7(2): 42-46.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*. 35: 1044-1051.

- Berger, L. R. R., Stamford, N. P., Santos, C. E. R. S., Freitas, A. D. S., Franco, L. O. & Stamford, T. C. M. 2013. Plant and soil characteristics affected by biofertilizers from rocks and organic matter inoculated with diazotrophic bacteria and fungi that produce chitosan. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 13: 592-603.
- Bharwad, K., & Rajkumar, S. 2020. Modulation of PQQ-dependent glucose dehydrogenase (mGDH and sGDH) activity by succinate in phosphate solubilizing plant growth promoting *Acinetobacter* sp. SK2.3. *BioTech*. 10(1): 1-11.
- Bhor, S.V., C.D. Deokar, D.M. Sawant, & R.B. Sonawane. 2006. Studies on effect of *Acetobacter diazotrophicus* biofertilizer on growth and quality parameters in sugarcane. *Journal of Maharashtra Agricultural Universities*. 31(2): 219–221.
- Boddey, R. M., Urquiaga S., Alves B. J. R., & Reis V. 2003. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*. 252: 139–149.
- Bogino, P., Abod, A., Nievas, F., & Giordano, W. 2013. Water-limiting conditions alter the structure and biofilm-forming ability of bacterial multispecies communities in the alfalfa rhizosphere. *Plos One*. 8(11): e79614.
- Bohórquez, A., Puentes, Y. J., & Menjivar, J. C. 2014. Evaluación de la calidad del compost producido a partir de subproductos agroindustriales de caña de azúcar. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 15(1): 73-81.
- Bordonal, R. D. O., Carvalho, J. L. N., Lal, R., de Figueiredo, E. B., de Oliveira, B. G., & La Scala, N. 2018. Sustainability of sugarcane production in Brazil; A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 38(2): 1-23.
- Bric, J. M., Bostock, R. M., & Silverstone, S. E. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(2): 535-538.
- Cardona, C. A., Quintero, J. A., & Paz, I. C. 2010. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource Technology*. 101(13): 4754-4766.
- Cassán, F., Vanderleyden, J., & Spaepen, S. 2014. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*. 33(2): 440-459.
- Castanheira, N., Dourado, A. C., Alves, P. I., Cortes-Pallero, A. M., Delgado-Rodriguez, A. I., Prazeres, A., Borges, N., Sanchçéz C., Barreto Crespo, M. T. & Fareleira, P. 2014. Annual ryegrass-associated bacteria with potential for plant growth promotion. *Microbiological Research*. 169(9-10): 768-779.

- Castañeda, C. O., Gómez, M., F. C., Trejo, T., L. I., Morales, R. V., González, A. M. T., Martínez, O. Y. M., Gámez, P. R. & Pastelín, S. M. C. 2014a. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en caña de azúcar. *Agroproductividad*. 7(2): 16-21.
- Castañeda, C. O., Gómez M. F. C., Trejo T. L.I., Pastelín S. M. C., Martínez O. Y. M., González A. M. T. & Guevara V. M. 2009. Nutritional status and growth of sugarcane vitroplants in response to growth regulators. *Terra Latinoamericana*. 27: 177-185.
- Castillo G, Altuna B., Michelena G., Sánchez J. & Acosta M. 2005. Cuantificación del contenido de Ácido Indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Revista Anales de Biología*. 27:137-142.
- Chinakwe, E. C., Ibekwe, V. I., Ofoh, M. C., Nwogwugwu, N. U., Adeleye, S., Chinakwe, P. O., Nwachukwu, I. N. & Ihejirika, C. E. 2019. Effect of temperature changes on the bacterial and fungal succession patterns during composting of some organic wastes in greenhouse. *Journal of Advances in Microbiology*. 15(1):1-10.
- Chin, C. F. S., Furuya, Y., Zainudin, M. H. M., Ramli, N., Hassan, M. A., Tashiro, Y., & Sakai, K. 2017. Novel multifunctional plant growth-promoting bacteria in co-compost of palm oil industry waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 124(5): 506-513.
- Cunha-Queda, A. C., Ribeiro, H.M., Ramos, A., & Cabral, F. 2007. Study of biochemical and microbiological parameters during composting of *Pine* and *Eucalyptus* bark. *Bioresource Technology*. 98(17): 3213–3220.
- Dao, J.M., Guo, J.W., Cui, X.W., Fan, X., Liu, S.C., & Zhang, Y.B., 2011. Effects of different nitrogen application on yield and quality of sugarcane. *Sugarcane Canesugar*. 33: 22–23.
- da Silva, M. S. R. D. A., Tavares, O. C. H., de Oliveira, I. S. R., da Silva, C. S. R. D. A., da Silva, C. S. R. D. A., Vidal, M. S., Baldani, V. L.D. & Jesus, E. D. C. 2022. Stimulatory effects of defective and effective 3-indoleacetic acid-producing bacterial strains on rice in an advanced stage of its vegetative cycle. *Brazilian Journal of Microbiology*. 53(1): 281-288.
- Dardanelli, M. S., Fernández C. F., Espuny, M. R., Rodríguez, C. M., Soria, D. M., Gil, S. A., Okon & Megías, M. 2008. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biology & Biochemistry*. 40 (11): 2713-2721.
- Dixon, R., & Kahn, D. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*. 2(8): 621-631.

- Do Carmo, J. B., Filoso, S., Zotelli, L. C., De Sousa, Neto E. R., Pitombo, L. M. and Duarte-Neto P. J. 2013. Infield green house gas emissions from sugarcane soils in Brazil: effects from synthetic and organic fertilizer application and crop trash accumulation. *GCB Bioenergy*. 5: 267–80.
- Dong, Z., Heydrich, M., Bernard, K., McCully, M. E. 1995. Further evidence that the N<sub>2</sub> fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(5): 1843- 1846.
- Dos Santos, S. G., da Silva Ribeiro, F., Alves, G. C., Santos, L. A., & Reis, V. M. 2020. Inoculation with five diazotrophs alters nitrogen metabolism during the initial growth of sugarcane varieties with contrasting responses to added nitrogen. *Plant and Soil*. 451(1): 25-44.
- Dos Santos, S. G., Chaves, V. A., da Silva Ribeiro, F., Alves, G. C., & Reis, V. M. 2019. Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. *Applied Soil Ecology*. 133: 12-23.
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd\_Allah, E. F., & Hashem, A. 2017. Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness. *Frontiers in Microbiology*. 8 (2104):1-14.
- Estrada-Bonilla, G. A., Lopes, C. M., Durrer, A., Alves, P. R., Passaglia, N., & Cardoso, E. J. 2017. Effect of phosphate-solubilizing bacteria on phosphorus dynamics and the bacterial community during composting of sugarcane industry waste. *Systematic and Applied Microbiology*. 40(5): 308-313.
- Etchevers, J. D. 1987. Determinación de nitrógeno en suelos. *In: Análisis químico para evaluar la fertilidad del suelo*, Aguilar, S. A., Etchevers, J. D., & Castellanos, R. J. Z. (ed.). Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. pp: 45-83.
- Etesami, H., Emami, S., & Alikhani, H. A. 2017. Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects: A review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 17(4): 897-911.
- Feitosa, D. G., Zilli, J. E., Simoes, D. J., Parma, M. M., Soares, M. I., Radl, V., Baldani, J. I. and Marie, R. L. 2017. *Bradyrhizobium sacchari* sp. nov., a legume nodulating bacterium isolated from sugarcane roots. *Archives of Microbiology*. 199(9): 1251-1258.
- Feng, Y., Shen, D., & Song, W. 2006. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *Journal of Applied Microbiology*. 100(5): 938-945.
- Fernández, P., M., María, N. D., & Felipe, M. 2002. Fijación biológica del nitrógeno: Factores limitantes. *Ciencia y Medio Ambiente*. 2: 195-202.



- Ferreira, N. S., Matos, G. F., Meneses, C. H., Reis, V. M., Rouws, J. R., Schwab, S., Baldani, J. I. & Rouws, L. F. 2020. Interaction of phytohormone-producing rhizobia with sugarcane mini-setts and their effect on plant development. *Plant and Soil*. 451(1): 221-238.
- Feitosa, D. G., Zilli, J. E., Simoes, D. J., Parma, M. M., Soares, M. I., Radl, V., Baldani, J. I. and Marie, R. L. 2017. *Bradyrhizobium sacchari* sp. nov., a legume nodulating bacterium isolated from sugarcane roots. *Archives of Microbiology*. 199(9): 1251-1258.
- Fischer D, Pfitzner B, Schmid M, Simões-Araújo JL, Reis VM, Pereira W, Ormeño-Orillo E, Hai B, Hofmann A, Martinez-Romero E. 2012. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant and Soil*. 356: 83–99.
- Filoso, S., Do Carmo, J. B., Mardegan, S. F., Lins, S. R. M., Gomes, T. F. and Martinelli, L. A. 2015. Reassessing the environmental impacts of sugarcane ethanol production in Brazil to help meet sustainability goals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 52: 1847-1856.
- Franche, C., K. Lindström, and C. Elmerich. 2009. Nitrogen fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*. 321(1): 35-59.
- Franco, H. C. J., Otto R., Faroni C. E., Vitti A. C., Oliveira E. C. A. DE, and Trivelin P. C. O. 2011. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. *Field Crops Research*. 121(1): 29–41.
- Fukami, J., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. 2017. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Express*. 7(1): 1-13.
- Garay, A. A, de la Paz Sánchez M, García, P. B, Álvarez B. E. R. & Gutiérrez C. 2014. La Homeostasis de las auxinas y su Importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *Revista de Educación Bioquímica*. 33(1):13–22.
- Glick, B. R. 2012. Plant growth promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. 1-5.
- Govindarajan, M., J. Balandreau, R. Muthukumarasamy, G. Revathi, & C. Lakshminarasimhan. 2006. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant and Soil*. 280: 239–252.
- Gupta, R. S., Patel, S., Saini, N., & Chen, S. 2020. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robert murraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 70(11): 5753-5798.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parkeh, L. J., Poole, P. S. 2012. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*. 245 (1): 83-93.
- Halbleib, C. M., Zhang, Y. P. & Ludden, P. W. 2000. Regulation of dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase and dinitrogenase reductase-activating glycohydrolase by a redox-dependent conformational change of nitrogenase Fe protein. *Journal of Biological Chemistry*. 275(5):3493-3500.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 / NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttila, A. M., Compant, S. and Campisano, A. 2015. The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 79: 293-320.
- Heinz, D. J., & Mee, G. W. 1969. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* Species. *Crop Science*. 9(3):346-348.
- Hermann, E. R., & Câmara, G. M. S. 1999. Um método simples para estimar a área foliar de cana-de-açúcar. *Revista da STAB*. 17(1): 32-34.
- Hernández M.G.I., Salgado G.S., Palma L.D.J., Lagunes E.L.C., Castelán E.M., Ruíz R.O. 2008. Vinaza y composta de cachaza como fuente de nutrientes en caña de azúcar en un gleysol mólico de Chiapas. *Interciencia*. 33: 855-860.
- Hirata, R. 2002. Carga contaminante y peligros a las aguas subterráneas. *Revista Latinoamericana de hidrogeología*. 2: 81-90.
- Hopkins, W. J. 1995. *Introduction to Plant Physiology*. 4th ed. John Wiley and sons, N.J., USA. 489 p.
- Hossain, G. M. A., Solaiman, A. R. M., Karim, A. J. M. S., Rahman, G. K. M. M., & Mia, M. A. B. 2020. Influence of diazotrophic bacteria on growth and biomass production of sugarcane invitro. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 9(3): 3077-3088.
- Huhe JC, Wu Y, Cheng Y. 2017. Bacterial and fungal communities and contribution of physicochemical factors during cattle farm waste composting. *Microbiology Open*. 6 (6): 1-11.
- Insam, H., & De Bertoldi, M. 2007. *Microbiology of the composting process*. In: *Compost Science and Technology*, L. F. Diaz, M. de Bertoldi, W. Bidlingmaier & E. Stentiford (ed.). Amsterdam, Netherlands. Elsevier Science. pp: 25-48.

- Irsyadi, M. B. 2021. Factors that effect of the optimal plantlet growth from tissue culture on the acclimatization stage. Proceeding International Conference on Science and Engineering. 4:100-104.
- James, H. and M. L. Sutherland.1939. The accuracy of the planting method for estimating the numbers of soil bacteria, actinomycetes and fungi in the dilution plated. Canadian Journal of Research. 17(3): 72-86
- Jensen, V.1968. The plate count technique. *In: The Ecology of Soil Bacteria. International Symposium*, R. G. Gray and D. Parkinson (ed.). Liverpool, England. Liverpool University Press. pp: 158-170.
- Khalid, A., Arshad, M., & Zahir, Z. A. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. Journal of Applied Microbiology. 96(3): 473-480.
- Khan, M. A., Sahile, A. A., Jan, R., Asaf, S., Hamayun, M., Imran, M., Adhikari, A., Kang, S. M., Kim, K. M. & Lee, I. J. 2021. Halotolerant bacteria mitigate the effects of salinity stress on soybean growth by regulating secondary metabolites and molecular responses. BMC Plant Biology. 21(1): 1-15.
- Khan, I., Masood, A., & Ahmad, A. 2010. Effect of nitrogen fixing bacteria on plant growth and yield of *Brassica juncea*. Journal of Phytology. 2(9):25-27
- Khan, M. S., Zaidi, A. and Wani, P. A. 2007. Role of phosphate- solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: A review. Agronomy for Sustainable Development. 27(1): 29-43.
- Kutu, F. R., Mokase, T. J., Dada, O. A., & Rhode, O. H. J. 2019. Assessing microbial population dynamics, enzyme activities and phosphorus availability indices during phospho-compost production. International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture. 8(1): 87-97.
- Kwon, M., Lee, H., Lee, S. Y., & Jin, M. H. 2022. Characterization of *Weizmannia ginsengihumi* LGHNH from wild-Ginseng and anti-aging effects of its cultured product. Microbioly and Biotechnology Letters. 50(3): 414-421.
- Lal, N. 2021. Micropropagated plants as alternative planting material to sugarcane setts. Indian Journal of Biology. 8(1): 27-30
- Lal, N. & Krishna, R. 1994. Tissue culture for pure and disease-free seed production in sugarcane. Indian Sugar. 43(11): 847-848.
- Lamia, B., Messaoud, B., Ahmed, C., & Lakhdar, K. 2017. Activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) in the biocontrol of tomato *Fusarium* wilt. Plant Protection Science. 53(2): 78-84.

- Leite, M., Pereira, A., Souza, A., Andrade, P., Barbosa, M., Andreote, F., Freire, F. y Sobral, J. 2018. Potentially diazotrophic endophytic bacteria associated to sugarcane are effective in plant growth-promotion. *Journal of Experimental Agriculture International*. 21: 1–15.
- Lima E, Boddey R. M. & Döbereiner J. 1987. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a  $^{15}\text{N}$  aided nitrogen balance. *Soil Biology and Biochemistry*. 19(2): 165–170.
- Li, G., Yang, L., Zhang, T., Guo, X., Qin, J., Cao, Y., Yang, Q., You, S., Yuan, G., Wan, X., Luo, J., Li, Z., Gao, L., Liu, Y., Jiang, K. & Zheng, J. 2018. Complete genome sequence of *Achromobacter spanius* type strain DSM 23806T, a pathogen isolated from human blood. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 14: 1-3.
- Li, W., Lee, S. Y., Cho, Y. J., Ghim, S. Y., & Jung, H. Y. 2020. Mediation of induced systemic resistance by the plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* S2-3-2. *Molecular Biology Reports*. 47(11): 8429-8438.
- Lin, H. R., Shu, H. Y., & Lin, G. H. 2018. Biological roles of indole-3-acetic acid in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiological Research*. 216: 30-39.
- Lopes, V. R., Bessalho Filho, J. C., Figueiredo, G. G. O., de Oliveira, R. A., & Daros, E. 2019. Interaction between sugarcane families and plant growth-promoting bacteria in two crop cycles. *Semina: Ciências Agrárias*. 40(2): 527-538.
- Lopes, E. A. P., Brayner, F. A., Alves, L. C., Antunes, J. E. L., & Oliveira, J. P. 2017. Acclimatization of *Manihot esculenta* crantz seedlings inoculated in vitro with plant growth-promoting bacteria. *Advances in Plants and Agriculture Research*. 7(5): 377-386.
- Loiret, F. G., Ortega E., Kleiner D., Ortega R. P, Rodés R., Dong Z. 2004. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 504–511
- Lugtenberg, B. 2015. Life of Microbes in the Rhizosphere. *In: Principles of Plant-Microbe Interactions*, Lugtenberg, B. (ed.). Switzerland, Springer International. pp: 7-15.
- Lugtenberg, B. & Kamilova, F. 2009. Plant-growth promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 63: 541- 556.
- Louden, B.C., Haarmann, D., & Lynne, A.M. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology and Biology Education*. 12(1): 51.
- Madhi, S. S., Hassan, G. I., Samoon, S. A., Rather, H. A., Dar, S. A. & Zehra, B. 2010. Biofertilizers in organic agricultura. *Journal of Phytology*. 2(10): 42-54.

- Mahdi, S. S., Talat, M. A., Hussain Dar, M., Hamid, A. & Ahmad, L. 2012. Soil phosphorus fixation chemistry and role of phosphate solubilizing bacteria in enhancing its efficiency for sustainable cropping a review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 6(4):1–7.
- Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A. & Tribedi, P. 2017. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agricultural development. *Environmental Science and Pollution Research*. 24: 3315-3335.
- Malik, M. A. B. & Williams, R. D. 2008. Plant growth promoting rhizobacteria and mycorrhizal fungi in sustainable agriculture and forestry. *In: Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*, Zeng, R. S., Mallik, A. U. & Luo, S. M. (ed.). New York, USA. Springer-Verlag New York. pp: 321-345.
- Malusa, E. & Vassilev, N. 2014. A contribution to set a legal framework for biofertilizers. *Applied Microbiology Biotechnology*. 98(15): 217-230.
- Mari, I., Ehalotis, C., Kotsou, M., Chatzipavlidis, I., & Georgakakis, D. 2005. Use of sulfur to control pH in composts derived from olive processing by-products. *Compost Science and Utilization*. 13(4): 281-287.
- Martins, D. S., Reis, V. M., Schultz, N., Alves, B. J., Urquiaga, S., Pereira, W., Sousa, J. S. & Boddey, R. M. 2020. Both the contribution of soil nitrogen and of biological N<sub>2</sub> fixation to sugarcane can increase with the inoculation of diazotrophic bacteria. *Plant and Soil*. 454(1): 155-169.
- Matoso, E. S., Reis, V. M., Giacomini, S. J., Silva, M. T. D., & Avancini, A. R. 2020. Diazotrophic bacteria and substrates in the growth and nitrogen accumulation of sugarcane seedlings. *Scientia Agricola*. 78(1):1-9.
- Matoso, E. S., Reis, V. M., Avancini, A. R., Simon, E. D. T., De Marco, E., & dos Anjos, S. D. 2020. Application of a mixture of five diazotrophs on sugarcane cultivated in the south of Brazil. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 15(4): 1-8.
- Mekonnen, H., & Kibret, M. 2021. The roles of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable vegetable production in Ethiopia. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 8(1): 1-11.
- Miranda, M. R., Cruz, H. N., González, H. V. A. & Palma, T. M. 2018. Plant growth kinetics of sugarcane plants propagated conventionally and in vitro. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 21: 253-260.
- Moreno, S. J., Landeros, S. C., Pérez, V. A., Palacios, V. O., Castañeda, C. M. & López, C. C. 2016. Manejo y actitud del productor sobre la fertilización nitrogenada en caña de azúcar: un estudio de caso. *RINDERESU*. 1(1): 26-34.
- Morgado, G. A., Espinosa, V. D. & Gómez, M. F. 2015. Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in sugarcane. *Terra Latinoamericana*. 33 (4): 321-330.

- Moutia, J. F. Y., Saumtally, S., Spaepen, S. & Vanderleyden, J. 2010. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. *Plant and Soil*. 337(1-2): 233-242.
- Muchow, R. C., Robertson, M. J., Wood, A. W. & Keating, B. A. 1996. Effect of nitrogen on the time-course of sucrose accumulation in sugar cane. *Field Crops Research*. 47 (2-3):143-153.
- Murumkar, D. R., Nalawade, S. V., Indi, D. V. & Pawar, S. M. 2017. Response of sugarcane seed plot to microbial inoculation by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and phosphate-solubilizing bacteria. *Sugar Tech*. 19 (1): 26-32.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Vadivelu, M. & Arun, K. 2017. Isolation of bacterial strains possessing nitrogen-fixation, phosphate and potassium-solubilization and their inoculation effects on sugarcane. *Indian Journal of Experimental Biology*. 55: 161-170.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G. & Solayappan, A. R. 1994. Biofertilizer-A supplement or substitute for chemical nitrogen for sugarcane crop. *Cooperative Sugar*. 25: 287-290.
- Nain, L., Rana, A., Joshi, M., Jadhav, S. D., Kumar, D., Shivay, Y. S., Paul, S., & Prasanna, R. 2010. Evaluation of synergistic effects of bacterial and cyanobacterial strains as biofertilizers for wheat. *Plant and Soil*. 331(1-2): 217-230.
- Nasir, S. 2016. Review on major potato disease and their management in Ethiopia. *International Journal of Horticulture and Floriculture*. 4(5): 239-246.
- Nascimento, F. X., Glick, B. R., & Rossi, M. J. 2021. Multiple plant hormone catabolism activities: an adaptation to a plant-associated lifestyle by *Achromobacter* spp. *Environmental Microbiology Reports*. 13(4): 533-539.
- OCDE/FAO. 2021. OCDE-FAO Agricultural Outlook 2021-2030, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/19428846-en>.
- Olivares, F. L., Baldani, V. L., Reis, V. M., Baldani, J. I., & Döbereiner, J. 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*. 21(3): 197-200.
- Oliveira, F. L., Oliveira, W. S., Stamford, N. P., Nova, S. E., Silva, S. C. & Santiago, F. A. 2017. Effectiveness of biofertilizer enriched in N by *Beijerinckia indica* on sugarcane grown on an ultisol and the interactive effects between biofertilizer and sugarcane filter cake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 17(4): 1040-1057.

- Oliveira, F. L., Stamford, N. P., Neto, D. S., Oliveira, E. C., Oliveira, W. S., Rosália, C. E. & Santos, S. 2015. Effects of biofertilizers produced from roks and organic matter, enriched by diazotrophic bacteria inoculation on growth and yield of sugarcane. *Australian Journal of Crop Science*. 9 (6): 504-508.
- Oliveira, A. L. M., Urquiaga S., Döbereiner J. & Baldani J. I. 2002. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*. 242: 205–215
- Olowe, O. M., Akanmu, A. O., & Asemoloye, M. D. 2020. Exploration of microbial stimulants for induction of systemic resistance in plant disease management. *Annals of Applied Biology*. 177(3): 282-293.
- Ortiz, L. H., Rosas, C. D., Rosel, D., Salgado, G. S. & Debernardi, V. H. 2016. Efectividad y rentabilidad de técnicas de siembra de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Agroproductividad*. 9(3): 40-47.
- Panicker, B., Thomas, P., Janakiram, T., Venugopalan, R., & Narayanappa, S. B. 2007. Influence of cytokinin levels on in vitro propagation of shy suckering chrysanthemum “Arka Swarna” and activation of endophytic bacteria. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 43(6): 614-622.
- Parewa, H. P., Meena, V. S., Jain, L. K., & Choudhary, A. 2018. Sustainable crop production and soil health management through plant growth-promoting rhizobacteria. *In: Role of Rhizospheric Microbes in Soil*, V. Meena (ed.). Singapore. Springer Singapore. pp: 299-329.
- Park, S., & Shin, J. H. 2022. The effect of treatment of auxin producing bacterial culture supernatant in combination with organic and inorganic fertilizers. *Plant Biology*. 1: 1-16
- Park, S., Kim, A., Hong, Y. K., Shin, J. H., & Joo, S. H. 2021. A highly efficient auxin-producing bacterial strain and its effect on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 19(1): 1-9.
- Pasqual, M., Soares, J. D., & Rodrigues, F. A. 2014. Tissue culture applications for the genetic improvement of plants. *In: Biotechnology and Plant Breeding: Applications and Approaches for Developing Improved Cultivars*, A. Borem & R. Fritsche-Neto (ed.). São Paulo, Brazil. Academic Press. pp: 157-199.
- Patel, P., Gajjar, H., Joshi, B., Krishnamurthy, R., & Amaresan, N. 2022. Inoculation of salt-tolerant *Acinetobacter* sp (RSC9) improves the sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) growth under salinity stress condition. *Sugar Tech*. 24(2): 494-501.
- Patel, P., Shah, R., Joshi, B., Ramar K. & Natarajan, A. 2019. Molecular identification and biocontrol activity of sugarcane rhizosphere bacteria against red rot pahogen *Colletrichum falcatum*. *Biotechnology Reports*. 21: 1-8.

- Patel, T. S., & Minocheherhomji, F. P. 2018. Plant growth promoting rhizobacteria: blessing to agriculture. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*. 6(2): 481-492.
- Patten, C. L., & Glick, B. R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*. 42(3): 207-220.
- Pereira, W., Silva, S. J., Schultz, N. & Massena, R. V. 2019. Sugarcane productivity as a function of nitrogen fertilization and inoculation with diazotrophic plant growth-promoting bacteria. *Sugar Tech*. 21(1):71-82.
- Pérez, I. H. & Rodríguez, D. I. 2015. Fundamentos para el empleo eficiente de los fertilizantes nitrogenados en la caña de azúcar en Cuba. *Cumbres*. 1(1): 09-15
- Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17: 362-370
- Pirhadi, M., Enayatizamir, N., Motamedi, H. & Sorkheh, K. 2017. Impacto f soil salinity on diversity and community of sugarcane endophytic plant growth promoting bacteria (*Saccharum officinarum* L. VAR. CP48). *Applied Ecology and Environmental Research*. 16(1): 725-739.
- Pitombo, L. M., Carmo, J. B., De Hollander M., Rossetto, R., López, M. V., & Cantarella, H. 2015. Exploring soil microbial 16SrRNA sequence data to increase carbon yield and nitrogen efficiency of a bioenergy crop. *GCB Bioenergy*. 8(5): 867-879.
- Pochon, J. and Tardieux, P. 1962. *Analytical Techniques of Soil Microbiology*. Tourtoulle. St-Mandé, Paris, France. 120 p.
- Premachandra, D., Hudek, L., & Brau, L. 2016. Bacterial modes of action for enhancing of plant growth. *Journal of Biotechnology and Biomaterials*. 6(3): 1-8.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. & Freitas H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology*. 28(3):142–149
- Ramírez-Gama, R. M., Reyes, G. T. & Urzúa Hernández, M. C. 2020. Técnicas de cuantificación y aislamiento de los microorganismos del suelo y la rizosfera: bacterias, hongos, actinobacterias y otros grupos microbianos. *In: Microbiología aplicada a la agricultura y ecosistemas: principios y técnicas para su investigación*, Ferrera C. R., Delgadillo M. J., Alarcón A, Alvarado L. J., Pérez M. J., & Almaraz S. J. J. (ed.), Montecillo, Texcoco, Edo. De México. Colegio de Postgraduados. pp: 7-46.
- Ramírez, M. E., Pérez V. A., Landeros S. C., Martínez D. J. P., Villanueva J. J. A., & Lagunes E. L. D. C. 2018. Uso histórico de plaguicidas en caña de azúcar del DR035 La Antigua, Veracruz. *Acta Universitaria*. 28(4): 42-49.



- Rangel, E., S. E., Hernández, M. E., & Hernández, A. M. 2016. Micropropagation of sugarcane varieties grown in México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 39(3): 225-231.
- Rasappan, K., Kumar, A., & Santhosh, P. 2015. Studies on sugarcane press mud and distillery wastes as bio fertilizer through bio composting. *International Journal Chemical Sciences*. 13 (3):1333-1344.
- Reis, V. M., Olivares, F. L. & Dobereiner J. 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its habitat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10: 101-104
- Rennie, R.J. 1981. A single medium for the isolation of acetylene reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*. 27: 8-14.
- R Core Team, 2020. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Rodríguez, F. H., & Rodríguez, A. F. 2015. Métodos de análisis de suelos y plantas: criterios de interpretación. 3ª ed. México: trillas: UANL. 288 p.
- Rodríguez, S. & Romero, J. 2007. Efecto de biofertilizante y estrés por hidromorfía en vitroplantas de caña de azúcar, variedad C120-78. *Temas Agrarios*. 12(2): 14-20.
- Rodríguez, H. & Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances* 17: 319-339.
- Romero-Yam, L. A., Almaraz-Suárez, J. J., Velasco-Velasco, J., Galvis-Spinola, A., & Gavi-Reyes, F. 2015. Microbial dynamics during composting of filter cake reactivated with chicken manure. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 21(1): 21-31
- Rosa, P. A. L., Mortinho, E. S., Jalal, A., Galindo, F. S., Buzetti, S., Fernandes, G. C., Neto, M. B., Pavinato, P. S. & Teixeira Filho, M. C. M. 2020. Inoculation with growth-promoting bacteria associated with the reduction of phosphate fertilization in sugarcane. *Frontiers in Environmental Science*. 8(32):1-18.
- Rosas, G. N. 2008. Avances en el desarrollo de formulaciones de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 10 (1): 49-63.
- Rosli, A. R. B. 2016. Biodiscovery of plant growth-promoting rhizobacteria and their role in plant-microbe interactions [PhD Thesis, University of Queensland]. E-archivo <https://doi.org/10.14264/uql.2016.947>
- Rossetto, R., Dias, F. L. F., Vitti, A. C., Prado J., & Junior. P. Q. 2010. Fósforo. *In: Cana de açúcar*, Dinardo-Miranda, L. L., Vasconcelos, A. C. M., & Landell, M. G. A. (ed.). Instituto Agronômico, Campinas, Brazil. pp: 71-281.

- Safirzadeh, S., Chorom, M., & Enayatizamir, N. 2019. Effect of phosphate solubilising bacteria (*Enterobacter cloacae*) on phosphorus uptake efficiency in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Soil Research*. 57(4): 333-341.
- Samet, M., Ghazala, I., Karray, F., Abid, C., Chiab, N., Nouri-Ellouz, O., Sayadi, S. & Gargouri-Bouزيد, R. 2022. Isolation of bacterial strains from compost teas and screening of their PGPR properties on potato plants. *Environmental Science and Pollution Research*. 29: 75365–75379
- Santos, R. M. D., & Rigobelo, E. C. 2021. Growth-promoting potential of rhizobacteria isolated from sugarcane. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5:1-12.
- Santos, R. M. D., & Rigobelo, E. C. 2020. Selection of *Saccharum* spp. rhizobacteria with growth-promoting properties using PCA analysis. *Australian Journal of Crop Science*. 14(7): 1186-1194.
- Sarathambal, C., Ilamurugu, K., Balachandar, D., Chinnadurai, C., & Gharde, Y. 2015. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic isolates from the rhizosphere of semi-arid tropical grasses of India. *Applied Soil Ecology*, 87:1-10.
- Schultz, N., Pereira, W., Reis, V. M., & Urquiaga, S. S. 2016. Produtividade e diluição isotópica de 15 N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 51: 1594-1601.
- Scortecci, K. C., Creste, S., Calsa Jr, T., Xavier, M. A., Landell, M. G., Figueira, A., & Benedito, V. A. 2012. Challenges, opportunities and recent advances in sugarcane breeding. *Plant Breeding*. 1: 267-296.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2017. Planeación agrícola nacional 2017-2030. Recuperado 05/06/2022 <https://www.gob.mx/agricultura/documentos/planeacion-agricola-nacional-2017-2030?state=published>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2021. Producción Anual Agrícola 2020. Recuperado 03/06/2022 <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2022. Producción Anual Agrícola; Cierre de la producción agrícola 2021. Recuperado 03/10/2022 <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2022. Panorama agroalimentario 2022. Recuperado 06/12/2022 <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/panorama-agroalimentario-258035>
- Shastri, B., Kumar, R., & Lal, R. J. 2020. Isolation and identification of antifungal metabolite producing endophytic *Bacillus subtilis* (S17) and its in vitro effect on *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane. *Vegetos*. 33(3): 493-503.

- Sharma, V., Kamal, B., Srivastava, N., Negi, Y., Dobriyal, A. K., & Singh, J. V. 2015. Enhancement of in vitro growth of *Swertia chirayita* Roxb. Ex Fleming co-cultured with plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*. 121: 215–225.
- Silva, J. C. D., Santos, L. D. S., Faria, P. S. A., Silva, F. G., Rubio Neto, A., Martins, P. F., & Selari, P. J. R. G. 2021. Multifunctional characteristics of *Acinetobacter lwoffii* Bac109 for growth promotion and colonization in micropropagated sugarcane. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 51:1-10.
- Silva, F. G. N., & Vidor, C. 2000. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 24(2): 311-319.
- Sime, M. 2013. The effect of different cane portions on sprouting, growth and yield of sugarcane (*Saccharum* spp. L.). *International Journal of Scientific and Research Publications* 3(1): 338-340.
- Singh P., Singh R. K., Guo D. J., Sharma A, Singh R. N., Li D. P., Malviya, M. K., Song X. P., Lakshmanan P., Yang, L. T. & Li, Y. R. 2021. Whole genome analysis of sugarcane root-associated endophyte *Pseudomonas aeruginosa* B18—a plant growth-promoting bacterium with antagonistic potential against *Sporisorium scitamineum*. *Frontiers in Microbiology*. 12: 1-21
- Singh, M., Singh, D., Gupta, A., Pandey, K. D., Singh, P. K., & Kumar, A. 2019. Plant growth promoting rhizobacteria: application in biofertilizers and biocontrol of phytopathogens. *In: PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*, A. M. Singh, A. Kumar & P. K. Singh (ed.). Woodhead Publishing. Sawston, Cambridge. pp: 41-66.
- Singh, M. P., & Kumar, S. 2009. *Plant Tissue Culture*. APH Publishing Corporation. New Delhi, India 286 p.
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2020. Panorama Agroalimentario 2020: Caña de Azúcar. Recuperado 26/10/2021 [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020)
- Smercina, D. N., Evans, S. E., Friesen, M. L., & Tiemann, L. K. 2019. To fix or not to fix: controls on free-living nitrogen fixation in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 85(6):1-18.
- Smith, B. E., Richards, R. L. & Newton, W. E. 2013. *Catalysts for nitrogen fixation: nitrogenases, relevant chemical models and comercial processes*. Springer Dordrecht, New York, USA. 340 p.
- Soares, M. A., Li, H. Y., Kowalski, K. P., Bergen, M., Torres, M. S., & White, J. 2016. Functional role of bacteria from invasive *Phragmites australis* in promotion of host growth. *Microbial Ecology*. 72(2): 407-417.

- Souza, R. S. C., V. K. Okura, J. S. L. Armanhi, B. Jorrin, N. Lozano, M. J. Silva, M. Gonzalez-Guerrero, L. M. de Araujo, N.C. Verza, H.C. Bagheri, J. Imperial, & P. Arruda. 2016. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. *Scientific Reports*. 6: 28774
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3(4): 1-15.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. 31(4): 425-448.
- Stamford, N. P., Silva, J. S., Santos, C. E. R. S., Freitas, A. D. S., Santos, C. M. A., Arnaud, T. M. S. & Soares, H. R. 2014. Yield of grape (*Vitis labrusca* cv. Isabel) and soil nutrients availability affected by biofertilizers with diazotrophic bacteria and fungi chitosan. *Australian Journal of Crop Science*. 8: 301-306.
- Steiner, A. A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil*. 15 (2): 134-154.
- Syed-Ab-Rahman, S. F., Carvalhais, L. C., Chua, E., Xiao, Y., Wass, T. J., & Schenk, P. M. 2018. Identification of soil bacterial isolates suppressing different *Phytophthora* spp. and promoting plant growth. *Frontiers in Plant Science*. 9(1502):1-18.
- Tairo, E.V. & Ndakidemi P. A. 2013. Possible benefits of rhizobial inoculation and phosphorus supplementation on nutrition, growth and economic sustainability in grain legumes. *American Journal of Research Communication*. 1(12):532–556
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. 2015. *Plant physiology and development*. 6th. Sinauer Associates Incorporated, L. A., California, USA. 896 p.
- Tayyab, M., Islam, W., Arafat, Y., Pang, Z., Zhang, C., Lin, Y., Waqas, M., Lin, S., Lin, W. & Zhang, H. 2018. Effect of sugarcane Straw and goat manure on soil nutrient transformation and bacteria communities. *Sustainability*. 10(7): 1-21
- Tchan, Y. T. 1988. Some aspects of non-rhizobial diazotrophs: Their past and their future. *In: Microbiology in Action*, W. G. Murrell & J. R. Kennedy. Research Studies Press, Hertfordshire, England. pp: 193-207.
- Tewari, S., Pooniya, V., & Sharma, S. 2020. Next generation bioformulation prepared by amalgamating *Bradyrhizobium*, cell free culture supernatant, and exopolysaccharides enhances the indigenous rhizospheric rhizobial population, nodulation, and productivity of pigeon pea. *Applied Soil Ecology*. 147: 103363.
- Torriente, D. 2010. Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar; perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales*. 31(1): 19-26.

- Uddin, A. F. M. J.; Rahaman, Sk. S.; Ahmad, H.; Parvin, S. & Momena, K. 2017. In vitro regeneration of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Grise). International Journal of Business, Social and Scientific Research. 5(2): 126-135.
- Uribe, R. M., Gava, G. J., Saad, J. C. & Kolln, O. T. 2013. Ratoon sugarcane yield integrated drip irrigation and nitrogen fertilization. Engenharia Agrícola. 33(6): 1124-1133
- Urquiaga, S., Xavier R. P. & De Morais R. F. 2012: Evidence from field nitrogen balance and  $^{15}\text{N}$  natural abundance data for the contribution of biological  $\text{N}_2$  fixation to Brazilian sugarcane varieties. Plant and Soil. 356: 5–21.
- Vaikuntapu, P. R., Dutta, S., Samudrala, R. B., Rao, V. R., Kalam, S., & Podile, A. R. 2014. Preferential promotion of *Lycopersicon esculentum* (Tomato) growth by plant growth promoting bacteria associated with tomato. Indian Journal of Microbiology. 54(4): 403-412.
- Vaseva, I. I., Qudeimat, E., Potuschak, T., Du, Y., Genschik, P., Vandenbussche, F., & Van Der Straeten, D. 2018. The plant hormone ethylene restricts *Arabidopsis* growth via the epidermis. Proceedings of the National Academy of Science. 115(17): E4130-E4139
- Velasco, V. J. 2014. Los biofertilizantes y la producción de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Agroproductividad. 7(2): 60-64.
- Vitousek, P. M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C. B., Grimm, N. B., Howarth, R. W., Marino, R., Martinelli, L., Rastetter, E. B. & Sprent, J. I. 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. Biogeochemistry. 57:1–4
- Villar, I., Alves, D., Garrido, J., & Mato, S. 2016. Evolution of microbial dynamics during the maturation phase of the composting of different types of waste. Waste Management. 54: 83-92.
- Vyas, P., Kumar, D., Dubey, A., & Kumar, A. 2018. Screening and characterization of *Achromobacter xylosoxidans* isolated from rhizosphere of *Jatropha curcas* L. (energy crop) for plant-growth-promoting traits. Journal of Advanced Research in Biotechnology. 3(1): 1-8.
- Wahla, V. & Shukla, S. 2017. Isolation of phosphate solubilizing microorganism from rhizosphere of sugarcane. Environmental Conservation Journal. 18(3): 75-78.
- Walsh, K. B., Brown, S. M., Harrison, D. K. 2006. ¿Can a  $\text{N}_2$ -fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus* association with sugarcane be achieved? Australian Journal of Agricultural Research. 57(2): 235-241.
- Wei, C. Y., Lin L., Luo, L. J., Xing, Y. X., Hu, C. J., Yang, L. T., Li, Y. R. & An, Q. 2014. Endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E promotes sugarcane growth. Biology and Fertility of Soils. 50: 657–666

- Wiedenfled, R.P., 1995. Effects of irrigation and N fertilizer application on sugarcane yield and quality. *Field Crop Research*. 43: 101–108.
- Widawati, S. 2018. The effect of biofertilizer combined with organic or inorganic fertilizer on growth of *Caesalpinia pulcherrima* and bacterial population in soil. *Earth and Environmental Science* 10: 012024.
- Wilkinson, S., Kudoyarova, G. R., Veselov, D. S., Arkhipova, T. N., & Davies, W. J. 2012. Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *Journal of Experimental Botany*. 63(9): 3499-3509.
- Wollum II. A. 1982. Cultural Methods for Soil Microorganisms. *In: Methods of Soil Analysis Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, A. Page, R. Miller & D. Keenedy. (ed). American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA. pp: 781-802
- Woodward, A. W., & Bartel, B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*. 95(5): 707-735.
- Yang, W., Li, Z., Wang, J., Wu, P. & Zhang, Y. 2013. Crop yield, nitrogen acquisition and sugarcane quality as affected by interspecific competition and nitrogen application. *Field Crop Research*. 146: 44-50.
- Yarte, M. E., Llorente, B. E., & Larraburu, E. E. 2022. Native putatively endophytic bacteria from *Handroanthus impetiginosus* improve its in vitro rooting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 151(2): 265-274.
- Zainudin, M. H. M., Singam, J. T., Sazili, A. Q., Shirai, Y., & Hassan, M. A. 2022. Indigenous cellulolytic aerobic and facultative anaerobic bacterial community enhanced the composting of rice straw and chicken manure with biochar addition. *Scientific Reports* 12(1): 1-10.
- Zhang, J., Chen, G., Sun, H., Zhou, S., & Zou, G. 2016. Straw biochar hastens organic matter degradation and produces nutrient-rich compost. *Bioresource Technology*. 200: 876-883.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. 7: 203-214.