



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

POSTGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

***Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* Promotores del
Desarrollo en Plántulas de Caña de Azúcar de Cultivo de
Tejidos**

JOSÉ LUIS LARRIBA TEODORO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA

OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ

2018

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS
COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el (la) que suscribe **José Luis Larriba Teodoro**, Alumno(a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del profesor(a) **Francisco Hernández Rosas**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "**Trichoderma harzianum y Bacillus subtilis Promotores del Desarrollo en Plántulas de Caña de Azúcar de Cultivo de Tejidos**" Y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Profesor Consejero(a) o Director(a) de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Amatlán de los Reyes, Veracruz a 24 de abril de 2018



Firma



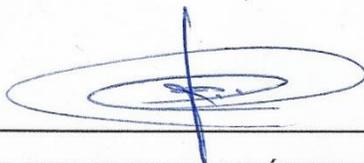
Francisco Hernández Rosas

Vo.Bo. del Profesor Consejero o Director de Tesis

La presente tesis, titulada: "*Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* Promotores del Desarrollo en Plántulas de Caña de Azúcar de Cultivo de Tejidos", realizada por el alumno: **José Luis Larriba Teodoro**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE
CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO: _____



DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ ROSAS

ASESOR: _____



DR. JOEL VELASCO VELASCO

ASESOR: _____



DR. JUAN VALENTE HIDALGO

Amatlán de los Reyes, Veracruz. Abril del 2018

***Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* Promotores del Desarrollo en Plántulas de Caña de Azúcar de Cultivo de Tejidos**

José Luis Larriba-Teodoro, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2018

Resumen

El proceso de adaptación de las plantas producidas *in vitro* depende entre otras cosas de la elección del sustrato, la obtención de una relación adecuada entre los componentes, que asegure una buena sobrevivencia y ganancia de peso en el trasplante. *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* reportados como promotores del crecimiento vegetal, como estimuladores de la asimilación de los fertilizantes presentes en el suelo, ejercen efectos beneficios sobre el crecimiento de las plantas. En la presente investigación se evaluaron 2 microorganismos (comerciales y nativos): *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, aplicados en plantas de caña de azúcar de cultivo *in vitro*, las variables respuesta fueron: unidades formadoras de colonia por gramo (UFC g⁻¹) y por mililitro (UFC/ml), concentración de elementos esenciales (EE) en ppm y densidad radicular (g), el establecimiento del experimento se realizó en la Microrregión de Atención Prioritaria (MAP) Zona Centro del Campus Córdoba. Las plantas pasaron a la fase de aclimatación con tres meses de edad. Los resultados no mostraron diferencias estadísticas significativas respecto a las cepas de *Trichoderma* estudiadas; no obstante, *Trichoderma harzianum* nativo resultó más efectiva con un mayor número de (UFC g⁻¹) presentes en el suelo, mayor asimilación del elemento Manganeseo que la cepa comercial. Así también permitió confirmar que *Bacillus subtilis* nativo tuvo mejor desarrollo respecto al crecimiento en (UFC/ml), mayor asimilación de Hierro y aumentó el crecimiento de masa radicular que la cepa comercial, pero sin darse una diferencia estadística significativa entre ellos, como en el caso de *Trichoderma*. Para el caso de la absorción de elementos esenciales se detectó con los análisis foliares que las cepas nativas tuvieron mejor desempeño con respecto a la absorción de nutrientes por la concentración de Manganeseo (Mn) y Hierro (Fe) presente en las plantas de caña. Los aislamientos nativos mejoran la densidad de volumen radical en peso fresco y seco para *Trichoderma* con 18% y 35%, respectivamente y en el caso de *Bacillus* con 37.87% y 17.88%, por encima de las cepas comerciales.

Palabras clave: *in vitro* plantas, antagonistas, *Saccharum*, caña de azúcar.

***Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* Promoter of the Development in Seedlings of Sugar-cane of Cultivation of Textiles**

José Luis Larriba-Teodoro, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2018

Abstract

The process of adaptation of the produced plants *in vitro* depends between other things on the election of the substrate, the securing of a relation adapted between the components, which this assures a good survival and weight gain in the transplant process. *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* known like vegetal growth promoters, like stimulating fertilizer assimilation in the soil, exert benefit effects on the plant growth. In the present research 2 microorganisms (commercial and native): *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* applied in plants of sugar-cane of cultivation *in vitro* were evaluated. The answer variables were: forming colony units for gram (UFC g⁻¹) and for milliliter (UFC/ml), concentration of essential elements (USA) in ppm and thickness radicular (g), the stablishment of the experiment was carry out in the central Priority Attention Microregion (MAP) of the Campus Córdoba. The plants entered into a acclimation phase with three months of age. The results did not show significant statistical differences with regard to the strains of studied *Trichoderma*; nevertheless, native *Trichoderma harzianum* was more effective with a major number of (UFC g⁻¹) presents in the soil, major assimilation of the element Manganese that the commercial strain. In addition, this allowed to confirm that native *Bacillus subtilis* had better development with regard to the growth in (UFC ml⁻¹), major Iron assimilation and the radicular biomass growth increased than the commercial strain, but without giving it a significant statistical difference between them, as in the case of *Trichoderma*. In relation to the absorption of essential elements it was detected by the chemical foliage analyses that the native strain had better performance with regard to the nutrients absorption as the concentration of Manganese (Mn) and Iron present in the sugarcane plants. The native isolations improved the thickness of radical volume in wet weight and dry weight for *Trichoderma* with 18 % and 35 %, respectively, and in the case of *Bacillus* with 37.87 % and 17.88 %, over the commercial strains.

Keywords: *vitroplants*, antagonists, *Saccharum*, *sugarcane*.

DEDICATORIA

A mis PADRES

Sr. Enrique Larriba Rodríguez y Sra. Petra Teodoro Soto, por todo el apoyo incondicional que me han brindado para poder llegar hasta en donde hoy me encuentro, por todos sus consejos, su paciencia, y depositar su confianza en mí y poder ver culminada una etapa más de mi vida, este

logro que más mío es de ustedes, **TODO LO QUE SOY ES GRACIAS A USTEDES.**

LOS AMO...!!

A mis HERMANOS:

Rafael, Ricardo, Jesús Enrique, porque parte de este logro, es también gracias a ustedes, cuando existe la unión y el amor entre familia todo se puede lograr y este trabajo es muestra de ello.

LOS AMO...!!

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de postgrado.

Al colegio de Posgraduados y al Programa de Maestría en Innovación Agroalimentaria Sustentable por la oportunidad brindada por continuar con mi formación académica.

Al Dr. Francisco Hernández Rosas, por la orientación brindada, sugerencias, apoyo y dirección de esta investigación. A demás por todos sus consejos y experiencias brindadas durante mi estancia en colegio.

Al Dr. Juan Valente Hidalgo, por las atenciones brindadas y sugerencias en la redacción y análisis de resultados de esta investigación.

Al Dr. Joel Velasco Velasco, por sus finas atenciones en momentos requeridos.

A la M. C. Marisol Cruz Tobón, encargada del laboratorio de Biotecnología Microbiana Aplicada, por todas las facilidades otorgadas durante la parte experimental de este trabajo, por sus consejos y enseñanzas, gracias.

Al Lic. Pedro Gamas Luna, más que un amigo un hermano, por el apoyo incondicional que recibí durante esta experiencia, “Amigo aquel que está en los buenos y malos momentos”, gracias por haberme enseñado el significado de amistad.

Gracias a Dios, por brindarme salud, paciencia e inteligencia, por estar siempre conmigo.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	3
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
2.1.2. HIPÓTESIS.....	3
3. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. Caña de azúcar	4
3.2. La micropropagación.....	5
3.2.1. Etapas de la micropropagación.....	5
3.2.2. Fase 0: Selección de la madre	6
3.2.3. Fase 1: Establecimiento de los cultivos <i>in vitro</i>	6
3.2.4. Fase 2: Multiplicación	7
3.2.5. Fase 3: Elongación y enraizamiento.....	8
3.2.6. Fase 4: Aclimatación	8
3.3. Alternativas para la conservación de recursos genéticos en caña de azúcar	9
3.4. Siembra de caña <i>in vitro</i> en México.....	9
3.4.1. La restringida base genética de caña de azúcar en México.....	10
3.5. Microorganismos de control biológico y su importancia en el crecimiento vegetal	10
3.6. Aspectos generales de <i>Trichoderma</i>	12
3.6.1. Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i>	13
3.7. Aspectos generales de <i>Bacillus</i>	13
3.7.1. Mecanismos de acción de <i>Bacillus</i>	15
3.8. Elementos esenciales.....	16
3.8.1. La nutrición de la caña de azúcar.....	17
3.9. Características de la cepa comercial <i>Trichoderma harzianum</i> “PHC® T-22®”	18
3.9.1. Modo de acción	18
3.9.2. Beneficios.....	18
3.10. Características de la cepa comercial <i>Bacillus subtilis</i> “Serenade® MAX™”	19
3.10.1. Beneficios.....	19

3.11. Relación de vitroplantas de caña de azúcar y microorganismos benéficos en lo innovador y agroalimentario.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1. Ubicación geográfica del experimento	21
4.2. Material vegetal.....	21
4.3. Microorganismos nativos.....	21
4.4. Microorganismos de productos comerciales.....	22
4.5. Siembra de plántulas propagadas <i>in vitro</i> en invernadero.....	23
4.6. Tratamientos evaluados en plántulas de caña micropropagadas	24
4.7. Diseño experimental Bloques completos al Azar (DBCA)	24
4.7.1. Modelo estadístico.....	25
4.8. Inoculación con <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Bacillus subtilis</i> en la rizósfera de caña de azúcar de cultivo de tejidos.....	26
4.8.1. Evaluación del desarrollo (supervivencia) de Th y Bs nativo y comercial en plántulas de caña provenientes de cultivo de tejidos.....	27
4.8.2. Toma de muestra de suelo de tratamientos.....	27
4.8.3. UFC de muestra de suelo por tratamiento	27
4.9. Análisis foliar de macro y micronutrientes de caña.....	28
4.10. Análisis de la zona radicular en plantas provenientes de cultivo de tejidos (peso seco de raíces)...	29
4.11. Análisis estadístico	31
5. RESULTADOS.....	32
5.1. Evaluación del desarrollo (supervivencia) de <i>Th</i> y <i>Bs</i> nativo y comercial en plántulas de caña provenientes de cultivo de tejidos.....	32
5.1.1. Tiempo	33
5.1.2. Comportamiento de la interacción tratamientos por tiempo (1, 2, 3, 4 y 5)	33
5.2. Cuantificación de <i>Bacillus subtilis</i> en la rizósfera de las plantas de caña de azúcar de cultivo de tejidos	34
5.2.1. Tiempo	35
5.2.2. Comportamiento de la interacción tratamientos por tiempo (0, 1, 2, 3, 4 y 5)	36
5.3. Análisis foliar de macro y micronutrientes de caña.....	37
5.3.1. Nitrógeno foliar de caña	37
5.3.2. Fósforo foliar de caña	38
5.3.3. Concentración de K.....	39

5.3.4. Concentración de Mn.....	40
5.3.5. Concentración de B.....	41
5.3.6. Concentración de Na.....	42
5.3.7. Concentración de Ca.....	43
5.3.8. Concentración de Mg.....	44
5.3.9. Concentración de Fe.....	45
5.3.10. Concentración de Cu.....	46
5.3.11. Concentración de Zn.....	47
5.4. Determinación del desarrollo radicular en la rizósfera de caña de azúcar de cultivo de tejidos.....	48
6. DISCUSIÓN.....	50
6.1. Cuantificación de <i>Trichoderma harzianum</i> en la rizósfera de plantas de caña de azúcar de cultivo de tejidos.....	50
6.2. Cuantificación de <i>Bacillus subtilis</i> en la rizósfera de la planta de caña de azúcar de cultivo de tejidos.....	51
6.3. Comparación de concentraciones nutrimentales en hojas de caña de azúcar proveniente de cultivo de tejidos.....	52
6.4. Determinación del desarrollo radicular en la rizósfera de caña de azúcar de cultivo de tejidos.....	53
7. CONCLUSIONES.....	55
8. LITERATURA CITADA.....	56

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Producción mundial de caña (ciclo 2015/16).....	5
Cuadro 2. Tratamientos evaluados en caña de azúcar proveniente de cultivo de tejidos, (N) Nativo, (C) Comercial.....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Plántulas de caña de azúcar variedad MEX 69-290 de cultivo <i>in vitro</i> . A) Plántula en charola y B) plántula en forma individual (cepellón).	21
Figura 2. Aislamientos nativos, A) el hongo <i>Trichoderma harzianum</i> , y B) la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> .22	
Figura 3. Productos biológicos comerciales, A) PHC® T-22® con unidades infectivas del hongo <i>Trichoderma harzianum</i> , y B) la bacteria <i>Bacillus subtilis</i> del producto comercial “ Serenade® MAX™ ”.	22
Figura 4. Sustratos: Agrolita y suelo.....	23
Figura 5. Trasplante de plántulas de caña de charola a macetas. A) Siembra de plántulas de caña variedad MEX 69-290, y B) macetas con la plántula etiquetadas.	24
Figura 6. Distribución de tratamientos en invernadero.....	25
Figura 7. Inóculos y plantas con los tratamientos con <i>T. harzianum</i> (Th) y con <i>B. subtilis</i> (Bs). A) inóculos preparados con los microorganismos Th y Bs, y B) aspecto de plantas en maceta inoculadas.....	26
Figura 8. Toma de muestras, A) Muestreo con sacabocados, y B) muestra tomada en tubo.....	27
Figura 9. Toma de muestra de la hoja de caña de azúcar para análisis nutrimental por tratamiento.	28
Figura 10. Secado de tejido vegetal a 70 °C en horno de secado (TERLAB®).	29
Figura 11. Lavado y distribución de raíces en el plano con base en el diseño experimental.....	30
Figura 12. Secado de raíz a 70 °C en horno de secado (TERLAB® modelo TE-H68D, serie 090325)....	30
Figura 13. Unidades formadoras de colonias (UFC x 10 ¹² g ⁻¹) de suelo seco (s.s.) de macetas con plantas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos. ThN= <i>Trichoderma harzianum</i> nativo, BsN + ThN= <i>Bacillus subtilis</i> nativo más <i>Trichoderma harzianum</i> nativo, ThC= <i>Trichoderma harzianum</i> comercial y T= Testigo. Letras iguales indican que son estadísticamente iguales entre sí (LSD de Fisher, p ≤ 0.05).	32
Figura 14. Unidades formadoras de colonias (UFC x 10 ¹² g ⁻¹) de suelo seco (s.s.) durante el desarrollo de los tratamientos con <i>T. harzianum</i> en plantas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos. T1= Tiempo uno, T2= Tiempo dos, T3= Tiempo 3, T4= Tiempo cuatro y T5= Tiempo 5. Letras iguales indican que son estadísticamente iguales (LSD de Fisher, p ≤ 0.05).....	33
Figura 15. Unidades formadoras de colonias (UFC x 10 ¹² g ⁻¹) de suelo seco (s.s.) durante el desarrollo de los tratamientos con <i>T. harzianum</i> respecto al tiempo en plantas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos. ThN= <i>Trichoderma harzianum</i> nativo, ThC= <i>Trichoderma harzianum</i> comercial, BsN + ThN= <i>Bacillus subtilis</i> nativo mas <i>Trichoderma harzianum</i> nativo, T= Testigo y (1...5)=Tiempos. Letras distintas indican diferencias mínimas significativas (LSD de Fisher, p ≤ 0.05).	34
Figura 16. Unidades formadoras de colonias (UFC x 10 ⁵ g ⁻¹) de suelo seco (s.s.) durante el desarrollo de los tratamientos con <i>B. subtilis</i> en plantas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos. BsN= <i>Bacillus subtilis</i> nativo, BsN + ThN= <i>Bacillus subtilis</i> nativo mas <i>Trichoderma harzianum</i> nativo, BsC= <i>Bacillus subtilis</i> comercial y T= Testigo. Letras distintas indican diferencias mínimas significativas (LSD de Fisher, p ≤ 0.05).....	35
Figura 17. Unidades formadoras de colonias (UFC x 10 ⁵ g ⁻¹) de suelo del desarrollo en general de los tratamientos/tiempo en plantas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos, en cada	

	figura con letras distintas indican diferencias mínimas significativas (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). T0= Tiempo cero, T1= 23 días, T2= 38 días, T3= 53 días, T4= 68 días y T5= 83 días.	36
Figura 18.	Unidades formadoras de colonias (UFC x 10^{12} g ⁻¹) de suelo seco (s.s.) respecto al tiempo en plantas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos, en cada figura promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). Bs N= Bacillus subtilis nativo, Bs N + ThN= Bascillus subillis nativo mas Trichoderma harzianum nativo, Bsc= Bacillus subtilis comercial, T= Testigo y (1...5)=Tiempos.....	37
Figura 19.	Contenido de nitrógeno en área foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos. ThC= Trichoderma harzianum nativo, ThC= Trichoderma harzianum comercial, BsN= Bacillus subtilis nativo, BsC= Bacillus subtilis comercial, Bs N + ThN= Bacillus subtilis nativo mas Trichoderma harzianum nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$).	38
Figura 20.	Contenido de Fósforo en ppm presente en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos: ThC= Trichoderma harzianum nativo, ThC= Trichoderma harzianum comercial, BsN= Bacillus subtilis nativo, BsC= Bacillus subtilis comercial, BsN= Bacillus subtilis nativo, BsN + ThN= Bacillus subtilis nativo mas Trichoderma harzianum nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$).	39
Figura 21.	Contenido de potasio en ppm presentes en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos, Bs N= Bacillus subtilis nativo, ThC= Trichoderma harzianum comercial, BsN= Bacillus subtilis nativo, Bsc= Bacillus subtilis comercial, Bs N + ThN= Bacillus subtilis nativo mas Trichoderma harzianum nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$).	40
Figura 22.	Contenido de Manganeso en ppm presente en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en la caña de azúcar en los 6 tratamientos, Bs N= Bacillus subtilis nativo, ThC= Trichoderma harzianum comercial, BsN= Bacillus subtilis nativo, Bsc= Bacillus subtilis comercial, Bs N + ThN= Bacillus subtilis nativo mas Trichoderma harzianum nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). Los tratamientos BsN y ThN+BsN fueron estadísticamente superiores al resto de los tratamientos.	41
Figura 23.	Contenido de Boro en ppm presente en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos, Bs N= Bacillus subtilis nativo, ThC= Trichoderma harzianum comercial, BsN= Bacillus subtilis nativo, Bsc= Bacillus subtilis comercial, Bs N + ThN= Bacillus subtilis nativo mas Trichoderma harzianum nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). Todos los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas.	42
Figura 24.	Contenido de Sodio en ppm presentes en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos, Bs N= Bacillus subtilis nativo, ThC= Trichoderma harzianum comercial, BsN= Bacillus subtilis nativo, Bsc= Bacillus subtilis comercial, Bs N + ThN= Bacillus subtilis nativo mas Trichoderma harzianum nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). Todos los tratamientos no tuvieron diferencias estadísticas.....	43
Figura 25.	Contenido de Calcio en ppm en la lámina de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos, Bs N= Bacillus subtilis nativo, ThC= Trichoderma harzianum comercial, BsN= Bacillus subtilis	

- nativo, Bsc= Bacillus subtilis comercial, Bs N + ThN= Bacillus subtilis nativo mas Trichoderma harzianum nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). Todos los tratamientos no tuvieron diferencias estadísticas... 44
- Figura 26.** Contenido de Magnesio en ppm en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos, Bs N= Bacillus subtilis nativo, ThC= Trichoderma harzianum comercial, BsN= Bacillus subtilis nativo, Bsc= Bacillus subtilis comercial, Bs N + ThN= Bacillus subtilis nativo mas Trichoderma harzianum nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). 45
- Figura 27.** Contenido de Hierro en ppm en la lámina foliar de caña de azúcar proveniente de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos, Bs N= Bacillus subtilis nativo, ThC= Trichoderma harzianum comercial, BsN= Bacillus subtilis nativo, Bsc= Bacillus subtilis comercial, Bs N + ThN= Bacillus subtilis nativo mas Trichoderma harzianum nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). Los tratamientos BsN, BsC, ThC y ThN+BsN resultaron ser estadísticamente superiores al resto de los tratamientos. 46
- Figura 28.** Contenido de Cobre en ppm en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos. Bs N= Bacillus subtilis nativo, ThC= Trichoderma harzianum comercial, BsN= Bacillus subtilis nativo, Bsc= Bacillus subtilis comercial, Bs N + ThN= Bacillus subtilis nativo mas Trichoderma harzianum nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). 47
- Figura 29.** Contenido de Zinc en ppm en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos. Bs N= Bacillus subtilis nativo, ThC= Trichoderma harzianum comercial, BsN= Bacillus subtilis nativo, Bsc= Bacillus subtilis comercial, Bs N + ThN= Bacillus subtilis nativo mas Trichoderma harzianum nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). 48
- Figura 30.** Densidad (peso en gramos) del área radicular en plantas de caña de azúcar proveniente del cultivo de tejidos. Comparación de medias de peso fresco (PF) y peso seco (PS) en función a la aplicación de 6 tratamientos, Bs N= Bacillus subtilis nativo, ThC= Trichoderma harzianum comercial, BsN= Bacillus subtilis nativo, BsC= Bacillus subtilis comercial, Bs N + ThN= Bacillus subtilis nativo mas Trichoderma harzianum nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). 49

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La caña tiene un elevado contenido de sacarosa, por lo tanto es de gran interés para el sector agrícola, de alimentos y farmacéutico. Además se puede obtener de esta la materia prima para varios derivados, algunos de estos destinados a la alimentación animal y adicionalmente aporta a la economía de muchos países tropicales. Entre los ciclos azucareros 2004/05 y 2014/15, la producción mundial de azúcar creció a una tasa promedio anual de 2.2 por ciento y en el periodo 2012/13 reportó su nivel máximo histórico en 177.6 millones de toneladas (FIRA, 2015). La producción de azúcar durante el ciclo 2014/15 alcanzó 174.3 millones de toneladas, lo que representa la tercera mejor cosecha de la historia. En México, la producción de azúcar correspondiente a la zafra 2014/15 cerró en 5.9 millones de toneladas (peso comercial), lo que representó una disminución a tasa anual de 0.6 por ciento. Por el lado de la demanda, de acuerdo con el estimado del balance azucarero nacional (CONADESUCA, 2015), la estructura durante 2014/15 fue la siguiente: consumo total, 4.58 millones de toneladas; y exportaciones, 1.48 millones de toneladas.

En México, en el año 2017 con una superficie cultivada de 822,897 hectáreas, cuya producción alcanzó en promedio de 56,007,311 millones de toneladas de caña de azúcar. El estado de Veracruz ocupó el primer lugar a nivel nacional en el cultivo de caña de azúcar, aportando el 34.51% de la producción total nacional y de la superficie total cosechada (CONADESUCA, 2017).

Uno de los retos que enfrenta la agroindustria de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) para ser más competitiva es aumentar su productividad y disminuir costos de producción, por lo que es necesario introducir adelantos científicos y tecnológicos en todos los eslabones de la cadena de valor. A través del cultivo *in vitro*, la biotecnología permite producir plantas con pureza genética y calidad fitosanitaria que aseguran mayor vigor del cultivo y amacollamiento en campo (Carrillo *et al.* 2008). Debido a la importancia de la caña de azúcar el cultivo de tejidos vegetales es usado principalmente para cultivar de forma aséptica tejidos, órganos, células o protoplastos en un medio artificial con temperatura e iluminación controlada para el crecimiento (Carrillo *et al.* 2008). Los métodos biotecnológicos en plantas mejoran el esquema de selección, para obtener una infinidad de plantas idénticas a la planta madre libre de virus y enfermedades por medio de la variación somaclonal (Cortegaza, 2013).

Por ello, las técnicas *in vitro* para la micropropagación masiva de plantas sanas a través de procesos de organogénesis o embriogénesis somática resultan determinantes para el establecimiento de programas de mejoramiento y producción masiva de semilla certificada. La micropropagación permite una mayor tasa de multiplicación de plantas que se propagan por métodos asexuales. El tiempo medio de generación también se reduce debido a que el proceso puede continuar durante todo el año en condiciones controladas de laboratorio (Cortegaza, 2013). Sin embargo, actualmente la producción de caña se enfrenta a diversos factores que impactan de manera negativa en la productividad de este cultivo siendo ampliamente atacado por un sin número de agentes fitopatógenos, sea el caso de plántulas propagadas *in vitro* o de manera convencional mediante semilla vegetativa por medio de tallos (Scortecci *et al.* 2012).

La aclimatación es una etapa muy importante en el sistema de micropropagación de plantulas de caña porque de esta depende la eficiencia del proceso y la calidad final de las plantas producidas *in vitro* (Díaz *et al.* 2004).

La diseminación de enfermedades a través de semilla agámica (por trozos de tallo o estacas) constituye el principal vía de transferencia de enfermedades y plagas al cultivo de caña o planta (plantilla). Si a esto se le suma el hecho de que la caña de azúcar es un cultivo semiperenne, cobra importancia toda alternativa que contribuya a la obtención de material inicial limpio desde el punto de vista sanitario. Actualmente no existen investigaciones dedicadas a tratar el daño ocasionado de estar en condiciones totalmente asépticas a un ambiente donde existe un sinnúmero de microorganismos fitopatógenos que merman la producción y el desarrollo óptimo de las plantas provenientes de cultivo *in vitro*. De acuerdo a lo anterior, el propósito de esta investigación fue evaluar los efectos de raíz, tallo y hojas con la asociación de agentes microbianos en plantas micropropagadas *in vitro*, de esta manera, lograr dilucidar la aplicabilidad de la co-inoculación de dos especies de microorganismos antagonistas, con un objetivo común, el control o la regulación biológica de fitopatógenos y, como efecto conjunto y paralelo, la estimulación del crecimiento vegetal y la zona meristemática de *Saccharum* spp var. Mex 69-290.

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar los agentes microbianos antagonistas, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en relación con el desarrollo de la caña de azúcar de cultivo de tejidos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar evaluación y análisis comparativo de las vitroplantas de caña de azúcar var. Mex 69-290 con y sin agentes microbianos antagonistas, *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en relación a su desarrollo (supervivencia), peso seco de raíz y elementos esenciales en hojas.

2.1.2. HIPÓTESIS

La aplicación de agentes antagonistas como el hongo *Trichoderma harzianum* y la bacteria *Bacillus subtilis* a plantas propagadas *in vitro*, les permitirá mayor supervivencia en un ambiente no controlado, mayor desarrollo foliar y radicular.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) es un cultivo que se produce en más de 130 países y territorios, sobresaliendo Brasil (39% de la producción), La India (19%), China (7%), Tailandia (6%), Pakistán (3%), México (3%), el 23% restante de la producción corresponde a 94 países del resto del mundo (FAOSTAT, 2015). A nivel global la capacidad productiva de este cultivo oscila de 40 a 150 t ha⁻¹ de caña en fresco y de 3.5 a 15 t ha⁻¹ de azúcar en fábrica (Infocaña, 2016). Con 55 ingenios en operación en 2013, la producción de caña de azúcar para la zafra 2016/2017 en México se reportan datos de la actividad productiva en 50 ingenios (CONADESUCA, 2016). Según proyecciones oficiales, la actual superficie cultivada podría crecer cerca de 5 millones de hectáreas (FIRA, 2015). El Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar (CONADESUCA) menciona que el tercer estimado de producción de azúcar para la zafra 2015/16, se ubicó en 6.18 millones de toneladas, lo que representaría un aumento anual de 3.3%. La estimación para el consumo nacional aparente en 4.3 millones de toneladas, es decir, una reducción de 2.5% con respecto al ciclo previo. Por su parte, el volumen de las exportaciones de azúcar mexicana a Estados Unidos se ajustó a la baja en 200,000 toneladas con respecto al ciclo previo; lo anterior, de acuerdo con el reporte de oferta y demanda de abril para ese país. Es decir, de las 1.3 millones de toneladas autorizadas en el cupo previo, se ajustó a 1.1 millones de toneladas. Los rendimientos promedios del país oscilan alrededor de las 72 t ha⁻¹ de caña, mientras que el promedio mundial es superior a las 80 t ha⁻¹ (CONADESUCA, 2016).

Cuadro 1. Producción mundial de caña (ciclo 2015/16).

	Producción Mundial Ciclo 2015/16(millones de ton)	Participación (%)	
1	Brasil	36	22
2	India	25.5	15.6
3	Tailandia	9.7	5.9
4	China	8.9	5.4
5	EUA	7.5	4.6
6	México	6.18	3.8
7	Pakistán	5.33	3.2
8	Rusia	5.2	3.2
9	Australia	4.8	2.9
10	Francia	4	2.4
	Los demás	50.71	31
	TOTAL MUNDIAL	163.91	100

Fuente: ISO. Quarterly Market Outlook-February 2016

3.2. La micropropagación

La Biotecnología Vegetal tiene como una de sus bases al cultivo de tejidos vegetales (CTV) que consiste en una serie de técnicas que permiten el establecimiento, conservación, manipulación y desarrollo, bajo condiciones artificiales y controladas, de células, tejidos u órganos vegetales. Entre las aplicaciones del CTV se puede mencionar a la micropropagación. Se le llama micropropagación o clonación *in vitro* a la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de CTV. Este sistema propagación de plantas ofrece ventaja como son: sanidad vegetal (plantas libre de enfermedades), homogeneidad genética (líneas clonales) y revigorización (rejuvenecimiento *in vitro*). Estas ventajas hacen a la propagación *in vitro* una práctica comercial rentable con alto valor agregado (Salgado-García *et al.*, 2013).

3.2.1. Etapas de la micropropagación

En la micropropagación comercial pueden identificarse cinco etapas bien definidas: fase 0: selección de la madre, fase I: establecimiento de los cultivos *in vitro*, fase II: multiplicación, fase

III: elongación y enraizamiento y fase IV: aclimatización. A continuación se describe cada una de estas (Behera y Sahoo, 2009; Khan *et al.*, 2008; Zuñiga y Adrian, 2012).

3.2.2. Fase 0: Selección de la madre

En esta etapa se incluyen dos aspectos fundamentales: la selección y crecimiento de la planta madre bajo condiciones sanitarias. El objetivo de esta etapa es mejorar la eficiencia en el establecimiento (implantación) y desarrollo posterior de los cultivos *in vitro*. Para la mayoría de las plantas micropropagadas, el material inicial es una planta élite seleccionada por características genóticas y fenotípicas que deben corresponder al clon o variedad a micropropagar. Por ello, uno de los cuidados especiales que se deben tener al iniciar el proceso es la selección del material inicial de partida (explante), debiendo asegurar que este provenga de una correcta selección individual. El crecimiento de la planta madre bajo condiciones sanitarias reduce notablemente los riesgos de contaminación. El estado fisiológico de cada planta que dona el explante es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, reportándose diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales cuando los tejidos provienen de plantas con diferentes edades fisiológicas. Generalmente se utilizan plantas en estado de crecimiento activo que muestren un desarrollo sano y vigoroso (Behera y Sahoo, 2009; Khan *et al.*, 2008).

3.2.3. Fase 1: Establecimiento de los cultivos *in vitro*

La iniciación de los cultivos *in vitro* consiste básicamente en la elección del explante y la esterilización del mismo para iniciar el cultivo axénico. El objetivo de esta etapa es establecer cultivos axénicos y fisiológicamente viables para posteriormente iniciar el proceso de multiplicación.

Para la elección del explante debe tomarse en cuenta el estado de desarrollo de la planta madre, la edad y tamaño del material vegetal inicial. Los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a establecer, mejor será la respuesta *in vitro*.

La superficie de los tejidos de las plantas constituyen hábitats para los microorganismos, estos pueden alojarse en estomas, lenticelas, tricomas o cualquier otra estructura, lo cual dificulta en extremo la eliminación de los mismos. Los contaminantes del cultivo de tejidos pueden causar grandes pérdidas en etapas posteriores de la micropropagación, de ahí la importancia de su eliminación desde la fase de establecimiento, donde los daños son menores debido al menor volumen de explantes que se manipulan. Los desinfectantes más comúnmente utilizados son el hipoclorito de sodio (NaClO), hipoclorito de calcio (CaClO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), etanol y bicloruro de mercurio (HgCl₂) (Zuñiga y Adrian, 2012; Behera and Sahoo, 2009; Khan *et al.*, 2008).

3.2.4. Fase 2: Multiplicación

Es considerada la etapa más importante del proceso donde se debe garantizar la propagación de los brotes y la estabilidad genética de las plantas producidas. El objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de brotes a partir de los propágulos establecidos.

En esta etapa los brotes son separados en condiciones estériles y cultivados nuevamente en medio de cultivo para inducir nuevos brotes, operación que se repite hasta lograr la cantidad de plantas deseada. Para garantizar la máxima estabilidad genética de las plantas obtenidas *in vitro*, los brotes deben multiplicarse durante un número definido de subcultivos manteniendo un coeficiente de propagación estable a través del tiempo. A medida que aumenta el número de subcultivos existe una tendencia a incrementar el coeficiente de multiplicación. Sin embargo, después de un número determinado de “n” subcultivos, el coeficiente de multiplicación es afectado, con tendencia a disminuir, ocasionando la aparición de variaciones genéticas *in vitro*, también llamadas variaciones somaclonales (Zuñiga y Adrian, 2012; Behera and Sahoo, 2009; Khan *et al.*, 2008).

3.2.5. Fase 3: Elongación y enraizamiento

En esta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen hasta desarrollar un sistema radicular y una altura adecuada que les permite ser transferidos a un sustrato en condiciones de invernadero para su aclimatización.

Generalmente en esta fase es necesaria la adición de auxinas y/o giberelinas. El rol de las auxinas es promover la formación de raíces. Mientras que, las giberelinas (GAs) promueven la elongación las plántulas. Estos reguladores del desarrollo pueden ser utilizados de forma individual o en combinación. Cuando las plantas han alcanzado una longitud adecuada y cuentan con un sistema radicular profuso, estarán listas para iniciar la siguiente fase (Zuñiga y Adrian, 2012; Behera and Sahoo, 2009; Khan *et al.*, 2008).

3.2.6. Fase 4: Aclimatación

Los objetivos primarios de esta fase son lograr la sobrevivencia de las plantas al momento del trasplante y el inicio del crecimiento *ex vitro*. Durante esta etapa se produce un retorno gradual de las plantas a sus características morfológicas normales, después de las etapas *in vitro*. La eficiencia en la **aclimatación** es trascendental para la propagación comercial, pues del resultado de esta dependerá en gran medida la **eficiencia total del proceso** y la calidad final de las plantas. Es la fase final del proceso y por tanto su meta es lograr plantas listas para su trasplante definitivo a campo, vivero, sombreadero ó invernadero (Behera y Sahoo, 2009; Khan *et al.*, 2008).

Previo a la aclimatación, las vitroplantas son acondicionadas en el laboratorio, y consiste en la extracción de las mismas de los frascos, lavado con agua corriente para eliminar restos del medio de cultivo (y prevenir futuras infecciones), separadas y clasificadas individualmente en 4 tamaños (<3 cm; 3-5 cm; 5-7 cm y >7cm). Finalmente son colocadas en una solución con fungicidas durante 24 horas. Durante la aclimatación y desde el punto de vista fisiológico, la planta deja el comportamiento heterótrofo que tenía *in vitro*, para adquirir un ritmo fotosintético que le permita una vida autótrofa, regulando a su vez el balance hídrico en concordancia con el ambiente externo. Esto se debe a que las condiciones *in vitro* provocan cambios fisiológicos, morfológicos y como se dijo, a veces genéticos, que conducen por ejemplo a una baja actividad fotosintética,

escasa funcionalidad de los estomas, formación de grandes espacios intercelulares y ausencia de ceras en la cutícula, lo cual, debe ser revertido durante esta etapa de aclimatación para que las plantas puedan crecer en condiciones de campo (Behera y Sahoo, 2009; Khan *et al.*, 2008).

3.3. Alternativas para la conservación de recursos genéticos en caña de azúcar

De acuerdo con el Convenio sobre Diversidad Biológica (CDB, 2010), el término de recursos genéticos (RG) se refiere a todo aquel material de origen vegetal, animal o microbiano que contiene genes con valor actual o potencial. Los objetivos del CDB son: conservación de la biodiversidad, uso sostenible de sus componentes y participación justa y equitativa de los beneficios resultantes de la utilización de los RG. Estos recursos forman parte de la diversidad biológica, conocida como biodiversidad. Instituciones como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2015) menciona que los RG de las plantas cultivadas y animales domésticos constituyen la base biológica de la seguridad alimentaria mundial; y coinciden con ésta, Bioversity International (antes Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos-IPGRI), organismo internacional autónomo, de carácter científico, que busca la conservación y el aprovechamiento de la agrobiodiversidad, y el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) que surge como parte de la estrategia nacional para el resguardo de la seguridad agroalimentaria y ambiental, al salvaguardar de forma apropiada y sistematizada los recursos genéticos más importantes del país, los recursos genéticos de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) se pueden agrupar, de acuerdo a su uso como germoplasma, en nuevas variedades, variedades caducas, cepas reproductoras, selecciones locales y formas silvestres, actualmente existen diferentes métodos de conservación de germoplasma que pueden ser utilizados en los programas de mejora genética (CNRG, 2013).

3.4. Siembra de caña *in vitro* en México

En México la mayor potencialidad para expandir esta superficie de plantas provenientes de cultivo *in vitro* se encuentra en los estados de Chiapas, Jalisco, Morelos y Puebla, en tanto que habría que replantear la operación de los ingenios que se ubican en las entidades de Campeche, San Luis Potosí y Tabasco, debido a su menor productividad, asociada a limitantes de índole técnico-agronómico, ambiental y socioeconómico (Sentíes-Herrera, 2013). Es de destacar que las

ganancias relativas observadas en los últimos años han sido debidas a factores relacionados con subsidios gubernamentales (8% del total de subsidios a la agricultura nacional), y a algunos esfuerzos recientes por incrementar su productividad a través de apoyos en capacitación, digitalización y sistematización de procesos, y modernización del sistema productivo tanto en campo como en fábrica. Sin embargo, no ha habido una estrategia integral nacional para afrontar estos desafíos y aprovechar las oportunidades que ofrece el sector. Uno de los cimientos más sólidos para esta encomienda es la reactivación del programa de mejoramiento genético a escala nacional (Sentíes-Herrera, 2013).

3.4.1. La restringida base genética de caña de azúcar en México

En términos de materiales genéticos, en México la generación de nuevas variedades de caña de azúcar ha mostrado una caída en los últimos 30 años, y la producción actual de caña de azúcar se sustenta en solo tres genotipos: Mex 69-290, Mex 79-431 y CP 72-2086 que en conjunto ocupan más del 70% de la superficie destinada a este cultivo en el país, lo que hace vulnerable al sistema de producción (MAM, 2013; Sentíes-Herrera *et al.*, 2014).

Ante esta situación, a partir de 2009 el Colegio de Postgraduados Campus Córdoba inició la implementación de un novedoso programa de selección e intercambio de variedades, con el apoyo y colaboración de los diferentes Campus del Colegio de Postgraduados, de ingenios de la región como El Potrero, San Miguelito y Central Motzorongo, así como con el Centro de Investigación y Desarrollo de la Caña de Azúcar (CIDCA).

En sus fases iniciales, este programa contó con apoyo de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) a través del Programa Nacional de la Agroindustria de la Caña de Azúcar (PRONAC), y actualmente se encuentra subsidiado por el propio Campus Córdoba (Sentíes-Herrera, 2013).

3.5. Microorganismos de control biológico y su importancia en el crecimiento vegetal

Muchas de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal utilizadas como estimulantes de la disponibilidad de los fertilizantes están presentes en el suelo (Reed *et al.* 2015).

Las bacterias con capacidad de promover el crecimiento de las plantas “Plant Growth Promoting Rhizobacteria” (PGPR) constituyen un grupo heterogéneo que incluye microorganismos de los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, ***Bacillus***, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Rhizobium*, *Erwinia*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* y *Flavobacterium* (Khan *et al.* 2009; Sharma *et al.* 2013; Ahemad y Kibret 2014; Reed *et al.* 2015). Las PGPR ejercen efectos beneficiosos sobre el crecimiento de las plantas a través de mecanismos directos e indirectos. Mecanismos directos implican la síntesis de sustancias o de modulación a nivel enzimático, lo que facilita la absorción de ciertos nutrientes, la solubilización de fosfatos minerales (Ahemad *et al.* 2008; Malboobi *et al.* 2009), la fijación biológica de nitrógeno (Peix *et al.* 2003; Caballero-Mellado *et al.* 2007; Jackson *et al.* 2008) y la síntesis de hormonas vegetales tales como el ácido giberélico, citoquininas, etileno, y ácido acético. Mecanismos indirectos incluyen PGPR disminuir o prevenir los efectos destructivos de uno o más fitopatógenos, por la producción de antibióticos (Richardson *et al.* 2009) o sideróforos (Reed *et al.* 2015). Los sideróforos producidos por PGPR tienen una alta afinidad con el hierro III de la rizósfera, y en consecuencia, retener una mayor parte del hierro disponible, y la inhibición de la proliferación de hongos fitopatógenos (Laslo *et al.* 2012).

Por otra parte, el hongo del género *Trichoderma* es importante para la vida humana y la funcionalidad de un ecosistema, degradador de la materia orgánica, esencial en la recirculación de nutrientes en el ambiente. Algunos miembros de este género tienen asociaciones simbióticas con plantas, leguminosas, **gramíneas**, compuestas, solanáceas y otras, mientras otros son utilizados como controladores biológicos contra organismos patógenos como *Fusarium* y *Rhizoctonia*, además la producción de enzimas industriales como los pigmentos de antraquinona y otros (Druzhinina & Kubicek 2005) y metabolitos secundarios (MS) como antibióticos y **promotores del crecimiento de plantas** (PGP: Plant Growth Promoting), ideales para la agricultura (Harman *et al.* 2004; Vinale *et al.* 2006; Vinale *et al.* 2008; Vinale *et al.* 2009; Druzhinina *et al.* 2011). *Trichoderma* es uno de los hongos que está presente en todo tipo de suelos agrícolas y ecosistemas, su versatilidad, adaptación y fácil manipulación (Fernández-Larrea 2001) ha permitido su uso por más de 70 años como antagonista para el control o regulación de enfermedades en plantas producidas por hongos en el mundo (Druzhinina *et al.* 2011).

3.6. Aspectos generales de *Trichoderma*

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, son capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Las especies de *Trichoderma* se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos. No obstante, se han realizado pocos estudios acerca de la sobrevivencia, establecimiento y proliferación de este antagonista en la rizósfera de la planta (Duttamajumder, 2008).

El género *Trichoderma* es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico con una amplia gama de fitopatógenos (Fernández, 2001). *Trichoderma* se ubica taxonómicamente (Singh *et al.* 2009) en:

Reino: Fungi.

División: Mycota

Subdivisión: Eumycota

Clase: *Hyphomycetes*.

Orden: Moniliales.

Familia: Moniliaceae.

Género: *Trichoderma*.

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa (Harman, 2011; Shores *et al.* 2010). El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman

anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas (Rifai, 1969). Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos (Herman, 2003). Además de los conidióforos, se pueden producir fiálides que emergen directamente del micelio.

3.6.1. Mecanismos de acción de *Trichoderma*

Los agentes de control biológico (BCA, por sus siglas en inglés) más comunes de la género *Trichoderma* son cepas de *T. virens*, *T. viride* y, por encima de todo, *T. harzianum*, que es un agregado de especies que incluye diferentes cepas utilizadas como BCA de fitopatógenos y hongos de vectores virales (Grondona *et al.*, 1997). Caracterización molecular y análisis filogenético han permitido que cepas de *T. harzianum* originalmente identificado como la misma especie se asignaran a diferentes especies agrupadas en secciones y grupos distintos (Hermosa *et al.*, 2000).

El éxito de cepas de *Trichoderma* como BCA se debe a su alta capacidad reproductiva, la capacidad de sobrevivir en condiciones muy desfavorables, la eficiencia en la utilización de nutrientes, la capacidad de modificar la rizósfera, fuerte agresividad contra hongos fitopatógenos, y la eficiencia en la promoción de crecimiento de las plantas y de los mecanismos de defensa. Estas propiedades han hecho el género *Trichoderma* esté presente en cualquier hábitat y en altas densidades de población (Vinale *et al.* 2008). *Trichoderma* como BCA de los hongos *Ascomycetes*, *Deuteromycetes* y *Basidiomycetes*, se encuentran principalmente en el suelo aunque también se les encuentra el aire (Monte, 2001). *Trichoderma* es más eficiente en suelos ácidos que alcalinos.

3.7. Aspectos generales de *Bacillus*

El género *Bacillus* fue descrito por primera vez por Cohn (1872) y comprende un grupo de especies filogenética y fenotípicamente heterogéneas. Incluye más de 100 especies (Euzeby, 2006) y sus miembros se consideran ubicuos. En una etapa temprana de la clasificación de las especies del género *Bacillus* se tienen en cuenta dos características fundamentales: el crecimiento aerobio,

la respuesta positiva a la tinción de Gram, la forma bacilar y la formación de endospora. Esto hace que exista una gran cantidad de especies de este género ocupando una gran variedad de hábitats. Debido a esto, la heterogeneidad en la fisiología, ecología y la genética dificulta la clasificación del género o la generalización sobre éste (Ahmad *et al.*, 2008).

Sobre la base de estudios moleculares de la secuencia del RNAr 16S, este género se ha subdividido en cuatro grupos. El primero pertenece a *Bacillus sensu stricto* en el cual se incluye *Bacillus subtilis* y otras 27 especies (Santoyo *et al.*, 2012).

El segundo, también conocido como *sensu lato*, incluye bacilos formadores de esporas redondeadas, en el que se destacan las especies: *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis*, y unidos a estos se encuentran algunos taxos asporógenos como *Caryphanon*, *Exiguobacterium*, *Kurtia* y *Planococcus* debido a que presentan cierta similitud con *Bacillus subtilis*. Por su parte, el grupo 3 está formado por 10 representantes, dentro de los que se encuentra: *B. polymyxa* y *B. macerans*, los cuales se han reclasificado en un nuevo género, *Paenibacillus* (Santoyo *et al.*, 2012). El grupo 4, se encuentra formado por especies que han sido reclasificadas en dos nuevos géneros: *Aneuribacillus* y *Brevibacillus* (Santoyo *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha creado un nuevo género (*Virgibacillus*) en el que se ubicó la especie *B. panthotenicus*. Finalmente, se han descrito nuevas especies del género aisladas de diversos ecosistemas que incluyen a *B. mojavenensis* y *B. vallismortis*, *B. ehimensis* y *B. chitinolyticus*, *B. infernus*, *B. carboniphilus* (Flujita *et al.*, 1996) y *B. horti* (Arkhipova *et al.*, 2007).

El género *Bacillus* pertenece a la familia I *Bacillaceae*, del orden I *Bacillales* de clase tres *Bacilli*, del *fillum* BXIII *firmicutes* del Dominio bacteria. En la primera edición del género es claramente diverso desde el punto de vista fenotípico y genotípico. La diferenciación entre especies del género *Bacillus* se centró en los resultados en la fermentación de lactosa, sorbitol, manitol, melobiosis, hidrólisis de la urea, y descarboxilación de la lisina (Anderson *et al.*, 2003).

Más recientemente, los datos de la secuencias de RNA se han empleado para dividir géneros de *Bacillus* en al menos cinco líneas diferentes. Entre las especies más representativas del género *Bacillus* se encuentran *B. alkalophilus*, *B. anthracis*, *B. azotoformans*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. insolitus*, *B. lincheniformis*, *B. polymyxa* y *B. thuringiensis* entre otros (Ahmed y Hasnain, 2010).

Bacillus subtilis

División: *Firmicutes*

Familia: *Bacillaceae*

Género: *Bacillus*

Especie: *Bacillus subtilis*

Es una bacteria Gram positiva, produce endospora las que son termo resistentes y también resiste factores físicos perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos, produce enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuente de carbono y electrones, producen antibióticos como la bacitricina, polimixina, gramicidina y circulina, fermentan la caseína y el almidón, vive dentro de los límites de 55 a 70 °C. Es un gran controlador biológico, *Bacillus subtilis* promueve el desarrollo de las plantas y previene las enfermedades del suelo causadas por *Sclerotium rolfii*, *Fusarium* spp., *Verticillium* spp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium* spp., y el nematodo nodulador de raíces (*Meloidogyne* spp.) y *Rhizoctonia solani*, agente causal de la enfermedad denominada “mal del tallito” del algodónero (Calderón *et al.*, 2002).

3.7.1. Mecanismos de acción de *Bacillus*

La promoción del crecimiento vegetal por parte de las especies del género *Bacillus* puede ocurrir de forma directa o indirecta. Un efecto directo sobre la promoción del crecimiento vegetal se observa en bacterias rizosféricas que tienen la capacidad de llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización de minerales como el fósforo y la producción de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal. Por su parte, la forma indirecta de promoción del crecimiento vegetal está relacionada con la producción de sustancias que actúan como antagonistas de patógenos o induciendo resistencia en las plantas (Choudhary *et al.*, 2009).

Bacillus es un género con diferentes especies que pueden tener diversas características, ideales como agente de control biológico. Otra característica de *Bacillus* es su capacidad de inducir

en la planta la Respuesta Sistémica Inducida (RSI). La RSI es el mecanismo mediante el cual la planta activa sus sistemas de defensa, inducido por algunas bacterias ante la infección de un patógeno. Algunos autores comparan la RSI con el sistema de resistencia adquirida (SRA), donde no involucra la presencia de bacterias. Sin embargo, fenotípicamente las respuestas pueden ser similares, aunque los mecanismos de inducción y respuesta por parte de la planta son diferentes (Compant *et al.*, 2005). En el caso del género *Bacillus*, es interesante resaltar la diversidad de especies que pueden inducir la SRI en plantas, por ejemplo *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, y *B. sphaericus* (Santoyo *et al.*, 2012). El efecto benéfico incluye la protección de la planta ante infecciones por diversos patógenos como hongos, bacterias, virus y nematodos (Kloepper *et al.*, 2004). Algunos lipopéptidos como surfactina y fengicina que son producidos por *B. subtilis* también pueden inducir RSI en plantas (Ongena *et al.*, 2007).

Como se explicó, la bacteria *B. subtilis* inhibe directamente el desarrollo de hongos fitopatógenos mediante la excreción de sustancias con propiedades antifúngicas; a su vez, favorece el desarrollo de la planta hospedera por el aumento de la disponibilidad de nitrógeno y fósforo en los suelos agrícolas, mediante la degradación de urea y la solubilización de fosfato de calcio. Tales propiedades le permiten incrementar los nutrientes en el ambiente de los cultivos, y le confieren ventajas en el control biológico de enfermedades causadas por agentes patógenos oportunistas, asociadas a deficiencias nutricionales (Orberá *et al.*, 2011).

3.8. Elementos esenciales

Los elementos esenciales son aquellos que tienen una función conocida dentro del metabolismo de la planta, en ausencia de éstos se presentan síntomas visuales de deficiencia, que pueden ser corregidos cuando son abastecidos en cantidades que requieren las plantas. Son clasificados en macronutrientes y micronutrientes, de acuerdo a la cantidad que son requeridos por la planta: los macronutrientes son requeridos en cantidades mayores que los micronutrientes. Los macronutrientes y la forma iónica en que son absorbidos por la planta son: Nitrógeno (NH_4^+ , NO_3^-), Fósforo (H_2PO_4^-), Potasio (K^+), Calcio (Ca^{+2}), Magnesio (Mg^{+2}) y Azufre (SO_4^{-2}). Los micronutrientes y las formas iónicas en que éstos son preferentemente

absorbidos por las plantas son: Hierro (Fe^{2+} y Fe^{3+}), Cobre (Cu^{+2}), Zinc (Zn^{+2}), Manganeseo (Mn^{+2}), Boro (H_3BO_3), Cloro (Cl^-), Níquel (Ni^{+2}) y Molibdeno (MoO^{-4}). Carbono (C^{+2}), Hidrógeno (H^{+1}) y Oxígeno(O^{-2}) que se asimilan a través del agua, transpiración y fotosíntesis, también son elementos esenciales para la planta. No obstante, no son incluidos en la clasificación antes mostrada por ser obtenidos de la atmósfera o del agua en el caso específico del H y del O (Alcántar y Trejo-Téllez, 2007).

3.8.1. La nutrición de la caña de azúcar

De los factores que influyen sobre el crecimiento y producción de plantas cultivadas, la nutrición vegetal, es sin lugar a dudas, uno de los que pueden ser más determinantes. Esta disciplina se ocupa de estudiar los procesos involucrados en la absorción y aislamiento de nutrimentos por las plantas superiores, así como de los factores que afectan y su relación con la producción y calidad de las cosechas. La nutrición vegetal da respuesta a una serie de interrogantes que frecuentemente se plantean en relación a los requerimientos nutricionales de las distintas especies de interés agrícola (Pereyra-Irujo *et al.*, 2007).

Los nutrientes que son requeridos por la caña de azúcar se clasifican en macronutrimentos y micronutrimentos, de acuerdo a la cantidad que son requeridos por la planta: los macronutrimentos son requeridos en cantidades mayores que los micronutrimentos. Los macronutrimentos y la forma iónica en que son absorbidos por la planta son: Nitrógeno (NH_4^+ , NO_3), Fósforo (H_2PO_4^-), Potasio (K^+), Calcio (Ca^{+2}), Magnesio (Mg^{+2}) y Azufre (SO_4^{-2}). Los micronutrimentos y las formas iónicas en que éstos son preferentemente absorbidos por las plantas son: Hierro (Fe^{2+} y Fe^{3+}), Cobre (Cu^{2+}), Zinc (Zn^{2+}), Manganeseo (Mn^{2+}), Boro (H_3BO_3), Cloro (Cl^-), Níquel (Ni^{2+}) y Molibdeno (MoO^{4-}). Carbono (C), Hidrógeno (H) y Oxígeno(O) también son elementos esenciales para la planta. No obstante, no son incluidos en la clasificación antes mostrada por ser obtenidos de la atmósfera o del agua en el caso específico del H y del O (Alcántar y Trejo-Téllez, 2007).

3.9. Características de la cepa comercial *Trichoderma harzianum* “PHC® T-22®”

PHC® T-22® es un fungicida biológico preventivo para el control de enfermedades de un gran número de especies vegetales. El ingrediente activo es un microorganismo benéfico, *Trichoderma harzianum* Cepa T-22 (KRL-AG2). Al ser aplicado al suelo mediante sistema de goteo, drench y sprinkle, PHC® T-22® se desarrolla rápidamente, dando protección a la raíz contra patógenos como *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Cylindrocladium*, *Thielaviopsis*, *Verticillium* y *Sclerotinia sclerotiorum*, PHC® T-22® puede utilizarse solo o en combinación con fungicidas químicos comerciales.

La Cepa T-22 ha sido desarrollada por la Universidad de Cornell mediante una cruce de dos cepas de *Trichoderma harzianum* provenientes de regiones de climas y suelos contrastante, lo cual le confiere propiedades sobresalientes de adaptación a un amplio rango de especies (probada en más de 2000 especies de plantas silvestres y cultivadas), suelos (de arenosos a arcillosos), climas (fríos-templados y cálido húmedos) y pHs (4-8) (Boyera *et al.*, 2009).

3.9.1. Modo de acción

PHC® T-22® inhibe el crecimiento de hongos patógenos del suelo mediante procesos de competencia natural formando una coraza alrededor de la raíz de la planta y procesos de micoparasitismo necrotrófico de hongos parásitos (Harman *et al.*, 2004).

3.9.2. Beneficios

- Previene patógenos de la raíz (*Pythium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Cylindrocladium*, *Thielaviopsis* y *Sclerotinia sclerotiorum*).
- Previene enfermedades dando protección a la raíz.
- Promueve el crecimiento de pelos absorbentes y raíces alimenticias mejorando la nutrición y la absorción de agua.
- El ingrediente activo libera compuestos que incrementan la disponibilidad de nutrientes para la planta.
- Disminuye o elimina la dependencia de fumigantes químicos.

- Está exento de tolerancia por la EPA y no tiene restricciones en tiempo para reentrar a las superficies tratadas.
- Ideal para programas de producción orgánica ya que está citado en las listas de la Organic Materials Review Institute (OMRI).
- No se ha registrado ningún efecto fitotóxico.
- Puede combinarse con fungicidas químicos comerciales (Harman *et al.*, 2004).

3.10. Características de la cepa comercial *Bacillus subtilis* “Serenade® MAX™”

Serenade contiene la bacteria benéfica *Bacillus subtilis* (cepa QST 713) que previene y cura enfermedades foliares de la planta causadas por hongos patógenos de las clases *Deuteromycetes*, *Oomycetes* y *Ascomycetes*, así como patógenos bacterianos como *Erwinia*, *Xanthomonas* y *Pseudomonas*. El producto se presenta en polvo (Serenade^{MR} MAX) y líquido (Serenade^{MR} ASO) (Bayer, 2018).

3.10.1. Beneficios

Serenade forma una capa protectora de toxinas naturales alrededor de la superficie de la planta inhibiendo la unión del patógeno al tejido de la planta. La capa consiste de tres grupos de lipopéptidos que detienen la germinación de las esporas y perforan las membranas de su micelio y tubos germinativos de los fitopatógenos. *B. subtilis* también induce la resistencia sistémica natural de las plantas contra patógenos bacterianos y fungosos (Bayer, 2018).

3.11. Relación de vitroplantas de caña de azúcar y microorganismos benéficos en lo innovador y agroalimentario

Ante la crisis alimentaria que afecta hoy a todo el planeta, las respuestas que surgen desde los organismos internacionales y los países más enriquecidos, se encuentran muy lejos de ser adecuadas. No se identifican las causas reales y tampoco se escucha a los principales afectados

(SAGARPA, 2016). Desde el Sur al Norte, éstos han demostrado, tener la capacidad de encarar el problema formulando propuestas concretas. Aprovechando el tema de la crisis alimentaria como hilo conductor, resulta posible analizar y entender más a profundidad al actual sistema **agroalimentario** y sus repercusiones. Resalta también con más fuerza y claridad el paradigma de la soberanía alimentaria como una respuesta al mundo rural y en el ámbito alimentario. Es en este escenario donde lograr una agricultura competitiva y sustentable es una tarea fundamental para todos los productores y la innovación desempeña un rol estratégico (SAGARPA, 2016). Está investigación contempla el factor innovador ya que unifica la combinación de dos temas relevantes del sector azucarero, la utilización de agentes microbianos que estimulan el crecimiento vegetal, la absorción de nutrientes y su aplicación en plantas provenientes de cultivo *in vitro*. Es indispensable realizar este tipo de investigaciones ya que ayudan a mejorar aspectos de calidad, producción, conservación de la progenie, aumentar su resistencia a factores bióticos y abióticos entre otras, mejorando la producción para que demanda el sector de alimentario y de la industria.

La **innovación** es literalmente acción y efecto de innovar o revolucionar un producto. Asimismo, en el uso coloquial y general, el concepto se utiliza de manera específica en el sentido de nuevas propuestas, inventos y su implementación económica. En el sentido estricto, se dice que de las ideas sólo pueden resultar innovaciones luego de que ellas se implementan como nuevos productos, servicios o procedimientos, que realmente encuentran una aplicación exitosa, imponiéndose en el mercado a través de la difusión. La innovación tecnológica es la introducción de nuevos productos y servicios, nuevos procesos, nuevas fuentes de abastecimiento y cambios en la organización industrial, de manera continua y orientados al cliente, consumidor o usuario (SAGARPA, 2016).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación geográfica del experimento

El experimento se llevó a cabo en el Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, ubicado a 18° 51' 25.279" Latitud Norte, 96° 51' 38.512", Longitud Oeste, carretera Federal Córdoba-Veracruz Km. 348.5, su clima es templado-regular con una temperatura promedio de 18 °C; su precipitación pluvial media anual es de 1 mil 807.3 mm, perteneciente a la Microrregión de Atención Prioritaria (MAP) Zona Centro (INAFED, 2010).

4.2. Material vegetal

Se emplearon plántulas de caña de azúcar micropropagadas *in vitro*, variedad MEX 69-290 (**figura 1**) de tres meses de edad, proporcionadas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba.



Figura 1. Plántulas de caña de azúcar variedad MEX 69-290 de cultivo *in vitro*. A) Plántula en charola y B) plántula en forma individual (cepellón).

4.3. Microorganismos nativos

Los agentes microbianos nativos *Trichoderma harzianum* (Th) y *Bacillus subtilis* (Bs) (**Figura 2**), fueron proporcionados por el laboratorio de Biotecnología Microbiana Aplicada

(BIOMA) del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. La metodología utilizada se basó en las técnicas del mismo laboratorio para la obtención de subcultivos de los mismos.

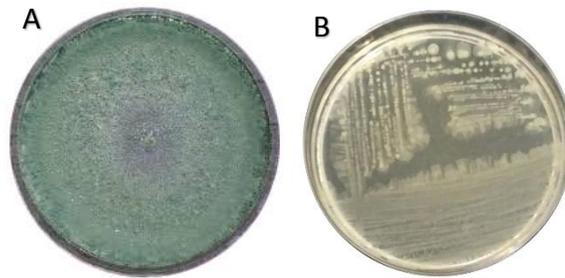


Figura 2. Aislamientos nativos, A) el hongo *Trichoderma harzianum*, y B) la bacteria *Bacillus subtilis*.

4.4. Microorganismos de productos comerciales

Los microorganismos de los productos comerciales con la bacteria *Bacillus subtilis* (Serenade® MAX) se describe en la etiqueta con una concentración de 7.3×10^9 UFC/g, formulado en polvo humectable. En el caso del hongo *Trichoderma harzianum* (cepa T-22®) de la empresa Plant Health Care (PHC) se describe con una concentración de 1×10^7 UFC/g, formulado en polvo humectable (**Figura 3**), fueron adquiridos bajo pedido, y mantenidos los productos a 4 °C.



Figura 3. Productos biológicos comerciales, A) **PHC® T-22®** con unidades infectivas del hongo *Trichoderma harzianum*, y B) la bacteria *Bacillus subtilis* del producto comercial “**Serenade® MAX™**”.

Los productos fueron evaluados igualando concentraciones tanto del inóculo del hongo *Trichoderma harzianum* nativo y comercial a 1×10^7 UFC/g para ambos casos, y en el caso de la bacteria *Bacillus subtilis* nativa y comercial fue de 7.3×10^9 UFC/g, la formulación de cada producto (comercial-nativo) se realizó con base en las recomendaciones de la etiqueta o ficha técnica de cada uno de los productos comerciales (**SERENADE y T-22**).

Sustratos

Se emplearon dos sustratos:

1. Agrolita.
2. Suelo, proveniente del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba.

Los sustratos (**Figura 4**) fueron depositados en bolsas de polietileno de alto calibre (120 x 70 cm), para posteriormente ser esterilizados en una autoclave (CP 66642) de 200 litros de capacidad, a 1 atm de presión y 121 °C. Se realizó la mezcla Suelo-Agrolita, relación 2:1, respectivamente.



Figura 4. Sustratos: Agrolita y suelo.

4.5. Siembra de plántulas propagadas *in vitro* en invernadero

Las plántulas se sembraron en bolsas de polietileno color negro con capacidad de 6 L (**Figura 5**), fueron distribuidas en una superficie de 105 m² del invernadero. El trasplante se realizó utilizando sustrato estéril y homogenizado antes mencionado suelo: agrolita, se etiquetaron de acuerdo al tratamiento y bloque correspondiente.



Figura 5. Trasplante de plántulas de caña de charola a macetas. A) Siembra de plántulas de caña variedad MEX 69-290, y B) macetas con la plántula etiquetadas.

4.6. Tratamientos evaluados en plántulas de caña micropropagadas

Se evaluaron seis tratamientos, la unidad experimental fue igual a una planta. Los tratamientos se presentan a continuación: (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Tratamientos evaluados en caña de azúcar proveniente de cultivo de tejidos, (N) Nativo, (C) Comercial.

<i>No.</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Rep.</i>	<i>UFC</i>	<i>Elementos Esenciales (nutrientes)</i>	<i>Densidad Raíz</i>
1	<i>T. harzianum.</i> (N)	5	UFC/g	Macro y micro	G
2	<i>T. harzianum.</i> (C)	5	UFC/g	Macro y micro	G
3	<i>Bacillus subtilis</i> (N)	5	UFC/ml	Macro y micro	G
4	<i>Bacillus subtilis</i> (C)	5	UFC/ml	Macro y micro	G
5	<i>T. harzianum.</i> (N) <i>Bacillus subtilis</i> (N)	5	UFC/ml UFC/g	Macro y micro	G
6	Testigo absoluto	5	UFC/ml UFC/g	Macro y micro	G

4.7. Diseño experimental Bloques completos al Azar (DBCA)

Se consideraron tres fuentes de variabilidad: el factor de tratamiento, el factor de bloque y el error aleatorio. El uso de este diseño experimental se recomienda cuando el suelo presenta un gradiente de variación definido y uniformidad.

- Los bloques se trazaron en sentido perpendicular al gradiente de variación, que en este caso para este experimento los gradientes de variación fueron luminosidad y temperatura (Figura 6).
- Cada bloque presentó los seis tratamientos que se evaluaron en el experimento.

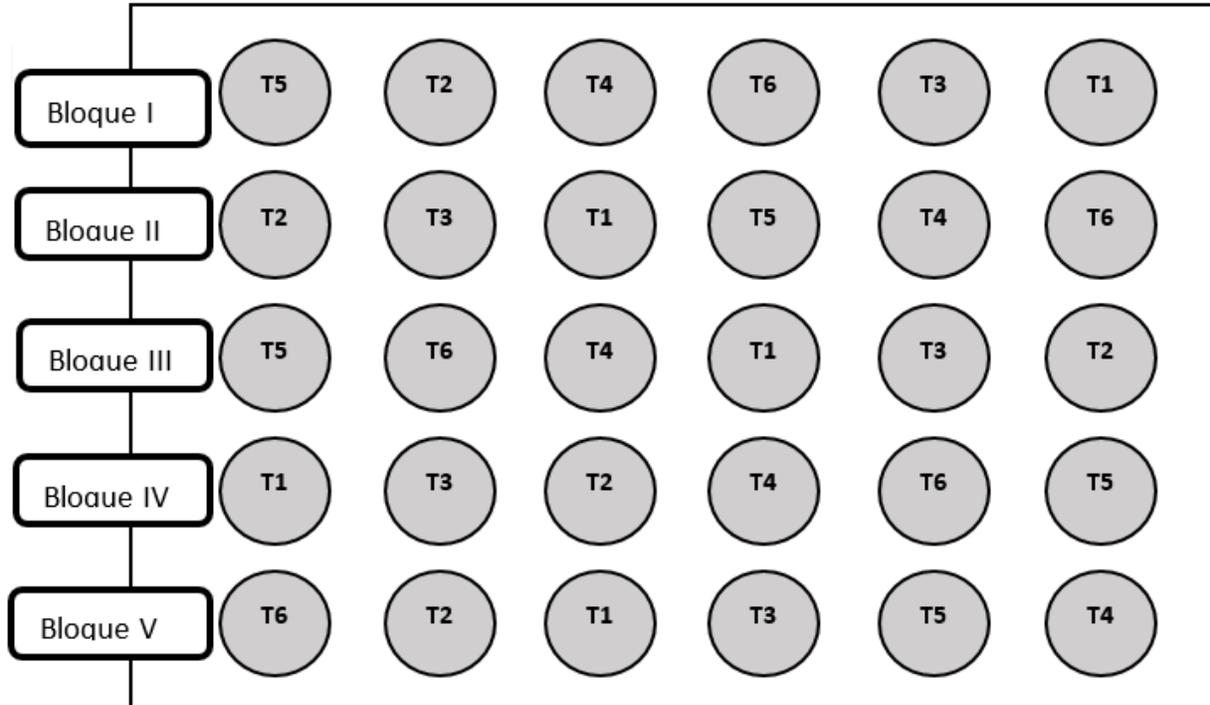


Figura 6. Distribución de tratamientos en invernadero.

4.7.1. Modelo estadístico

El modelo que se utilizó fue un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA), con la finalidad de minimizar el efecto de la luminosidad heterogénea en el invernadero a través del bloque. El análisis de los datos y la comparación de medias se realizó con la prueba LSD de Fisher a un nivel de significancia del 5%, en el paquete estadístico SAS versión 9.3 (Statistical Analysis System). El modelo estadístico para este diseño estuvo dado por;

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \gamma_j + tiempo_k + (\tau * tiempo)_{ik} + \epsilon_{ijk}; \begin{matrix} i = 1, 2, \dots, t \\ j = 1, 2, \dots, b \\ k = 1, 2, \dots, 6 \end{matrix}$$

donde Y_{ijk} es la variable respuesta del i –"ésimo tratamiento" en el k –"ésimo tiempo" j -"ésimo bloque"; μ es la media global; τ_i es el efecto fijo debido al tratamiento i ; γ_j es el efecto fijo debido al bloque j ; $tiempo_k$ es el efecto fijo debido al tiempo k ; $(\tau * tiempo)_{ik}$ es el efecto de la interacción; ϵ_{ij} es el error aleatorio, el cual se asume independiente e idénticamente distribuido con media cero y varianza común $[N(0, \sigma^2)]$.

4.8. Inoculación con *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* en la rizósfera de caña de azúcar de cultivo de tejidos

Una vez establecido el diseño experimental, se procedió a la inoculación de los microorganismos a nivel del cuello de la planta (**Figura 7**), para esta aplicación se utilizaron tubos tipo Falcon® estériles, se aforaron hasta 50 ml con cada uno de los agentes microbianos respectivamente, inundando la zona de división celular de las plantas (raíces), con el fin de que los microorganismos aplicados tuvieran contacto con las raíces primarias, secundarias y terciarias de las plántulas. Se determinó la cantidad de solución necesaria en cada chorro para asegurar que la humedad llegará a la raíz de la planta.

Calibración: (Ejemplo: 100 ml), se multiplico este volumen por el número total de plantas.

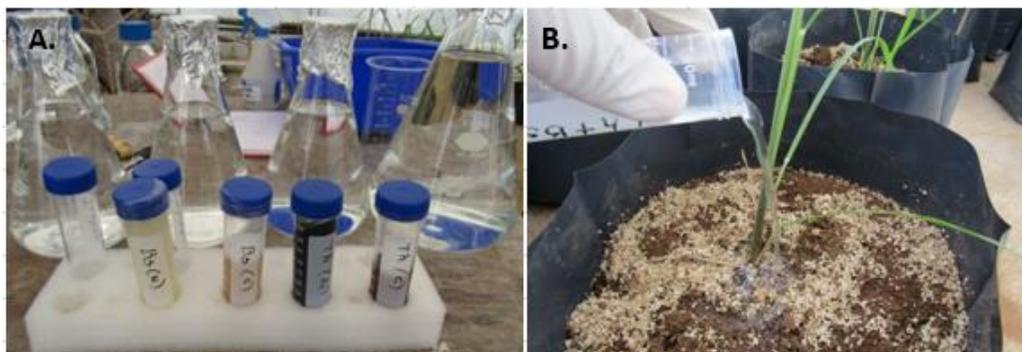


Figura 7. Inóculos y plantas con los tratamientos con *T. harzianum* (Th) y con *B. subtilis* (Bs). A) inóculos preparados con los microorganismos Th y Bs, y B) aspecto de plantas en maceta inoculadas.

4.8.1. Evaluación del desarrollo (supervivencia) de Th y Bs nativo y comercial en plántulas de caña provenientes de cultivo de tejidos.

Previo a la inoculación con los microorganismos, se realizó el primer muestreo (tiempo 0), y muestreos posteriores (tiempo 1, 2, 3, 4 y 5) después de la misma, con el fin de determinar que la concentración aplicada estuviera presente durante el tiempo y que estos tuvieran crecimiento gradual ascendente.

4.8.2. Toma de muestra de suelo de tratamientos

El muestreo en tiempo cero (t_0) se realizó ocho días previos a la fecha de la inoculación, con un sacabocado de 1 cm de diámetro, se obtuvo en promedio de 10 g de suelo por tratamiento (**Figura 8**). Transcurridos 15 días (2 semanas) después de la inoculación, se realizó el segundo muestreo (tiempo 1 $-t_1$) y así sucesivamente, los muestreos estuvieron calendarizados por un lapso de 15 días entre cada toma de muestra.



Figura 8. Toma de muestras, A) Muestreo con sacabocados, y B) muestra tomada en tubo.

4.8.3. UFC de muestra de suelo por tratamiento

El procesamiento de las muestras se realizó homogenizando el suelo y tomando una submuestra de 10 g, colocada en 90 ml de agua destilada estéril, agitando de 20-30 min. Posteriormente, se tomó una alícuota de 1 ml que se diluyó en tubo de ensayo con 9 ml de Tween 20 al 0.03% estéril, de la dilución obtenida (-1) se realizó el mismo procedimiento hasta que obtener la dilución (-5). De las diluciones (-3 y -5) se tomó 1 ml que se depositó en medio de cultivo estéril agar nutritivo (AN) para el caso de Bs y en el caso de Th se sembró en papa dextrosa

agar (PDA). Se utilizaron las diluciones -3 y -5 por triplicado para Bs 7.3×10^9 UFC/g y para Th 1×10^7 UFC/g, fue colocado 0.1 ml de la dilución correspondiente en el centro de cada caja Petri con una micropipeta Eppendorf® estéril. Para distribuir de manera homogénea el inóculo sobre el medio de cultivo, se utilizó una varilla de vidrio estéril (en forma de escuadra o “L”) haciendo movimientos giratorios de manera perpendicular al medio de cultivo hasta la completa incorporación del inóculo en el medio; se cuidó que el inóculo se absorbiera antes de incubar (se esperó aproximadamente 10 min). El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se inoculó e incorporó al medio de cultivo a las cajas, no excedió los 20 min. Se incubaron 24 h a 25 °C, las cajas inoculadas con *T. harzianum* y 19 horas de incubación las cajas Petri en posición invertida para *Bacillus subtilis* a 37 °C. Después de la incubación, se contaron todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de mohos y levaduras) utilizando un contador de colonias.

4.9. Análisis foliar de macro y micronutrientes de caña.

Para este análisis se tomó como unidad experimental una planta, fueron tomadas muestras representativas de cada una, se tomó la parte media de la hoja madura, aproximadamente 15 g de peso fresco (**Figura 9**).



Figura 9. Toma de muestra de la hoja de caña de azúcar para análisis nutrimental por tratamiento.

Cada muestra se pesó en una báscula digital (SCIENTECH® modelo SA210,U.S.A) y posteriormente al pesado se pusieron a secar por unidad experimental durante 72 h a 70 °C en bolsas de papel Kraft; en un horno de secado (TERLAB® modelo TE-H68D, serie 090325) (**Figura 10**). Después del secado se determinó el peso de la biomasa seca.

La concentración de N fue determinada mediante la técnica Semimicro-Kjendahl descrita por Alcántar y Sandoval (1999). La concentración de P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Zn, Mn, B y Na de la hoja de caña fue determinado en el extracto proveniente de la digestión húmeda diácida (Alcántar y Sandoval, 1999), utilizando un equipo (Agilent® 725 Series ICP-OES) de espectrometría de emisión e inducción por plasma. Las acumulaciones se estimaron considerando las concentraciones de cada elemento y el peso de biomasa seca correspondiente.



Figura 10. Secado de tejido vegetal a 70 °C en horno de secado (TERLAB®).

4.10. Análisis de la zona radicular en plantas provenientes de cultivo de tejidos (peso seco de raíces).

Para la evaluación del sistema radicular de cada planta por tratamiento se determinó la densidad (peso seco y fresco en gramos), se tomó la raíz de una planta por tratamiento y se realizó el lavado de las raíces para eliminar los restos de suelo o materiales extraños a la raíz, cabe mencionar que este análisis fue destructivo (**Figura 11**).



Figura 11. Lavado y distribución de raíces en el plano con base en el diseño experimental.

Una vez realizado el proceso de lavado de las raíces se orearon y se pesaron cada una de éstas en una báscula digital (SCIENTECH® modelo SA210) y obtenido el peso fresco inicial de cada muestra, fueron colocadas en el horno de secado (TERLAB® modelo TE-H68D, serie 090325) a 70 °C durante 72 horas en lapsos de tres horas hasta que todas las muestras alcanzaran peso constante, para posteriormente obtener el peso seco de cada muestra (**Figura 11**).



Figura 12. Secado de raíz a 70 °C en horno de secado (TERLAB® modelo TE-H68D, serie 090325).

4.11. Análisis estadístico

Con los resultados de las tres variables respuesta (UFC/g-ml, EE y desarrollo de raíz) obtenidos en esta investigación se realizaron análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD de Fisher, $P \leq 0.05$) a un nivel de significancia del 95%, utilizando el programa estadístico SAS® versión 9.3 (Statistical Analysis System).

5. RESULTADOS

5.1. Evaluación del desarrollo (supervivencia) de *Th* y *Bs* nativo y comercial en plántulas de caña provenientes de cultivo de tejidos.

Los análisis microbiológicos sobre la cuantificación de UFC/g⁻¹ de *T. harzianum* nativo, comercial y en combinación con *B. subtilis* nativo realizados a los 8 (tiempo 1), 23 (tiempo 2), 38 (tiempo 3), 53 (tiempo 4) y 68 (tiempo 5) días después de la siembra, se encontró que *T. harzianum* nativo y la combinación del mismo con *B. subtilis* nativo, presentaron un mayor número de colonias totales con una media de 8.17×10^{12} UFC g⁻¹ y 4.18×10^{12} UFC g⁻¹, respectivamente, siendo estadísticamente superiores al resto de los tratamientos ($p = 0.0001$); no así con respecto a la cepa comercial (T-22) de *T. harzianum* y al testigo que presentaron nulo crecimiento durante las evaluaciones desde el inicio hasta el día 68 (Figura 13).

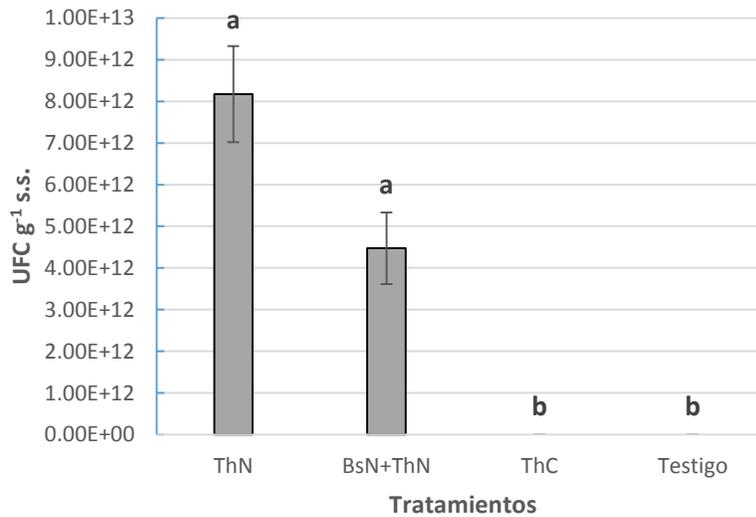


Figura 13. Unidades formadoras de colonias (UFC x 10¹² g⁻¹) de suelo seco (s.s.) de macetas con plantas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos. ThN= *Trichoderma harzianum* nativo, BsN + ThN= *Bacillus subtilis* nativo más *Trichoderma harzianum* nativo, ThC= *Trichoderma harzianum* comercial y T= Testigo. Letras iguales indican que son estadísticamente iguales entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$).

5.1.1. Tiempo

Con respecto al tiempo, ocho días previos a la siembra se realizó el primer muestreo (Tiempo 0), este presentó nulo desarrollo en la caja Petri por presencia de colonias, esto se debe a que nuestro sustrato se esterilizó antes de la siembra de plantas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos, con esto se corroboró el estado inicial del sustrato con cero colonias de los inóculos (Th y Bs nativo y comercial) donde se sembró la plántula de caña de cultivo de tejidos, y no así para el segundo, tercero, cuarto, quinto y sexto muestreo (tiempo 1, 2, 3, 4 y 5), que fueron realizadas inoculaciones cada 15 días (2 semanas) entre cada muestreo después de la inoculación, la diferencia entre densidad de UFC/g de suelo entre cada tiempo fue más notoria para el segundo muestreo (tiempo 1) con una carga de 7.62×10^{12} UFC g^{-1} , seguido del muestreo 5 (tiempo 4) por el número de UFC/g con 4.13×10^{12} UFC g^{-1} , muestreo 4 (tiempo 3) con 2.53×10^{12} UFC g^{-1} , muestreo 3 (Tiempo 2) con 1.53×10^{12} UFC g^{-1} y el último muestreo (Tiempo 5) con 1.46×10^{12} UFC g^{-1} , mencionados de mayor a menor respectivamente, siendo estadísticamente iguales entre sí, pero estadísticamente diferentes ($p = 0.008$) con respecto al tiempo 1 (Figura 14).

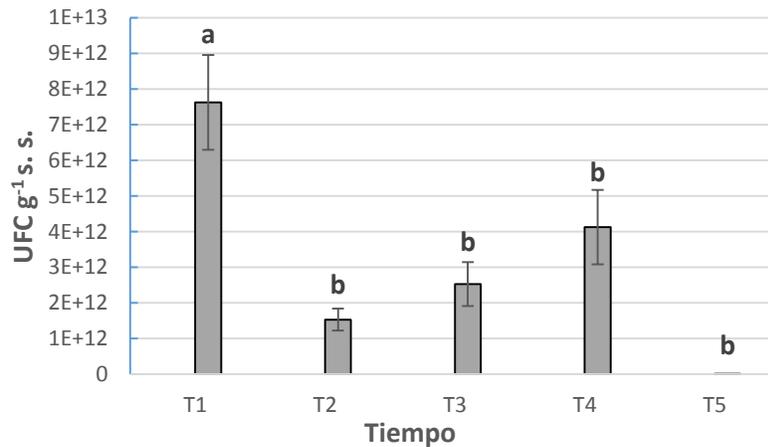


Figura 14. Unidades formadoras de colonias (UFC $\times 10^{12}$ g^{-1}) de suelo seco (s.s.) durante el desarrollo de los tratamientos con *T. harzianum* en plantas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos. T1= Tiempo uno, T2= Tiempo dos, T3= Tiempo 3, T4= Tiempo cuatro y T5= Tiempo 5. Letras iguales indican que son estadísticamente iguales (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$).

5.1.2. Comportamiento de la interacción tratamientos por tiempo (1, 2, 3, 4 y 5)

Por otra parte el comportamiento que tuvieron los tratamientos en relación con el tiempo dio como resultado que el tratamiento *T. harzianum* nativo resultó con 2.19×10^{13} UFC g^{-1} , muy

por encima de los demás tratamientos ($p = 0.02$), no obstante tuvo una disminución en el Tiempo 2 con 1.11×10^{12} UFC g^{-1} , presentando una diferencia estadística significativa respecto al Tiempo 1, pero volviendo a presentar un desarrollo en el tiempo 2 y 4 con 8.69×10^{12} UFC g^{-1} y 9.16×10^{12} UFC g^{-1} , respectivamente. El tratamiento con *T. harzianum* comercial no tuvo desarrollo alguno en ninguno de los cinco tiempos posteriores a la siembra de las plantas. En cambio, la combinación de los tratamientos *B. subtilis* nativo y *T. harzianum* nativo tuvo un desarrollo positivo, ya que *T. harzianum* nativo demostró mejor adaptación en el tiempo 1 con 8.59×10^{12} UFC g^{-1} , no obstante hubo una reducción en el tiempo 2 con 5.03×10^{12} UFC g^{-1} de *T. harzianum* nativo, así mismo para el tiempo 3 con 1.41×10^{12} UFC g^{-1} de *T. harzianum* nativo, repuntando mayor crecimiento en el tiempo 4 con 7.35×10^{12} UFC g^{-1} y disminuyendo considerablemente en el tiempo 5 con 2.61×10^{12} UFC g^{-1} de *T. harzianum* nativo pero siendo estadísticamente iguales los tiempos 1, 2, 3 y 4 y presentando diferencia estadística con respecto al tiempo 5. El testigo presentó nulo crecimiento en todos los tiempos (Figura 15).

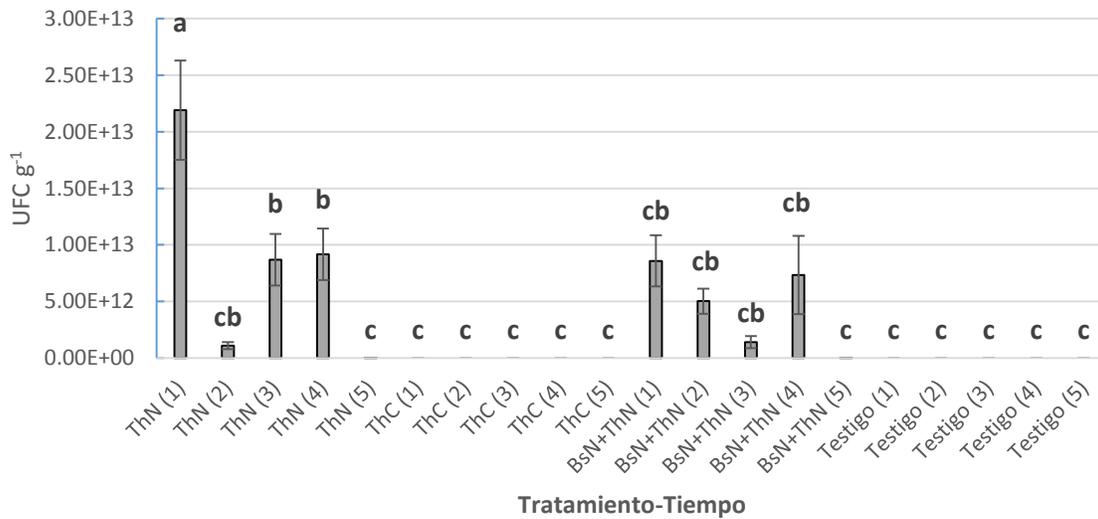


Figura 15. Unidades formadoras de colonias (UFC x 10^{12} g^{-1}) de suelo seco (s.s.) durante el desarrollo de los tratamientos con *T. harzianum* respecto al tiempo en plantas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos. ThN= *Trichoderma harzianum* nativo, ThC= *Trichoderma harzianum* comercial, BsN + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo, T= Testigo y (1...5)=Tiempos. Letras distintas indican diferencias mínimas significativas (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$).

5.2. Cuantificación de *Bacillus subtilis* en la rizósfera de las plantas de caña de azúcar de cultivo de tejidos

Los análisis microbiológicos sobre la cuantificación de UFC/g de *B. subtilis* nativo y *B. subtilis* comercial y la combinación de *B. subtilis* nativo con *T. harzianum* nativo realizados a los 8 (tiempo 1), 23 (tiempo 2), 38 (tiempo 3), 53 (tiempo 4) y 68 (tiempo 5) días después de la siembra, se encontró que el tratamiento *B. subtilis* nativo con media de 7.36×10^5 UFC g^{-1} , y *B. subtilis* en combinación con la cepa nativa *T. harzianum* fue de 6.5×10^5 UFC g^{-1} , la cepa comercial *B. subtilis* “Serenade® MAX™” con media 5.03×10^5 UFC g^{-1} , son estadísticamente iguales siendo las mejores ($p = 0.1$), no así con respecto al testigo con 4.09×10^5 UFC g^{-1} que fue estadísticamente inferior al resto de los tratamientos (Figura 16).

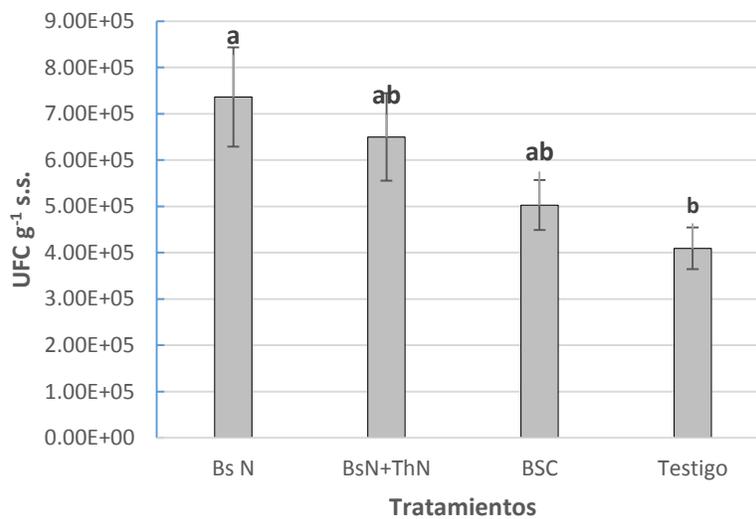


Figura 16. Unidades formadoras de colonias (UFC $\times 10^5$ g^{-1}) de suelo seco (s.s.) durante el desarrollo de los tratamientos con *B. subtilis* en plantas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos. BsN= *Bacillus subtilis* nativo, BsN + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo, BsC= *Bacillus subtilis* comercial y T= Testigo. Letras distintas indican diferencias mínimas significativas (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$).

5.2.1. Tiempo

Con respecto al tiempo, ocho días previos a la siembra se realizó el primer muestreo (Tiempo 0), la cual presentó un desarrollo en caja con media de 2.17×10^5 UFC g^{-1} , el segundo muestreo que se realizó 15 días posteriores a la inoculación, presentó una media de 1.70×10^6 UFC g^{-1} , no así para el tercer, cuarto, quinto y sexto muestreo (tiempo 2, 3, 4 y 5), con un tiempo entre muestreos de 15 días (2 semanas), la diferencia entre densidad de UFC/g entre cada tiempo fue

notoria disminuyendo considerablemente para el tercer muestreo (tiempo 2) con una carga microbiana de 3.62×10^5 UFC g^{-1} , para el cuarto muestreo (tiempo 3) hubo una reactivación de los microorganismos con una media de 9.21×10^5 UFC g^{-1} , el quinto muestreo (tiempo 4) con 1.88×10^5 UFC g^{-1} , el sexto muestreo (Tiempo 5) con media de 6.51×10^4 UFC g^{-1} , siendo estadísticamente superior el muestreo 2 (Tiempo 1) en comparación con el resto de los tiempos ($p = 0.001$), siendo el muestreo 1, 3, 5 y 6 (Tiempo 0, 2, 4 y 5) los que presentaron menor número de microorganismos (Figura 17).

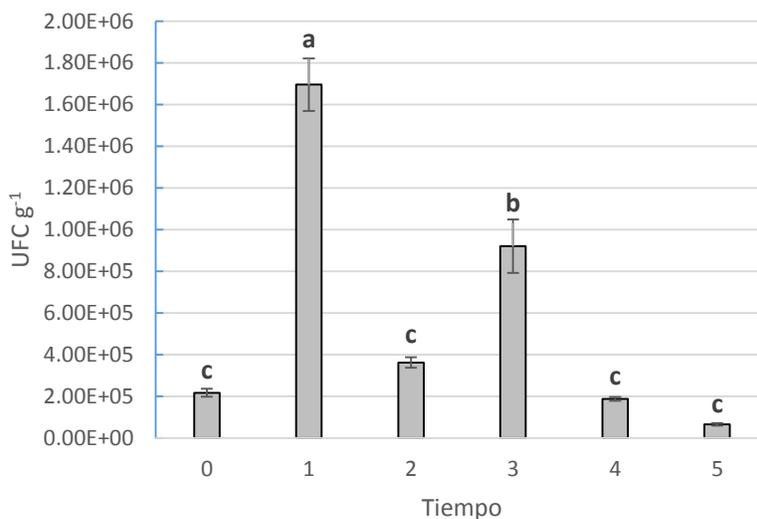


Figura 17. Unidades formadoras de colonias (UFC $\times 10^5$ g^{-1}) de suelo del desarrollo en general de los tratamientos/tiempo en plantas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos, en cada figura con letras distintas indican diferencias mínimas significativas (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). T0= Tiempo cero, T1= 23 días, T2= 38 días, T3= 53 días, T4= 68 días y T5= 83 días.

5.2.2. Comportamiento de la interacción tratamientos por tiempo (0, 1, 2, 3, 4 y 5)

Por otra parte el desarrollo de los tratamientos respecto al tiempo tuvo como resultado que el tratamiento *B. subtilis* nativo en el tiempo 1, tuvo un mayor número de UFC/g siendo estadísticamente diferente ($p = 0.001$) con media de 3.02×10^6 UFC g^{-1} , muy por encima de los demás tratamientos, no obstante seguido del tratamiento *B. subtilis* nativo-*T. harzianum* nativo en el Tiempo 3, tuvo una disminución con 1.97×10^6 UFC g^{-1} , presentando una diferencia estadística significativa respecto al tratamiento *Bacillus subtilis* nativo en el tiempo 1, siendo el mismo tiempo el que presentó mayor carga microbiana ya que *Bacillus subtilis* comercial presento una media de 1.59×10^6 UFC g^{-1} , el testigo con media de 1.15×10^6 UFC g^{-1} , *Bacillus subtilis* Comercial con

media de 5.10×10^5 UFC g^{-1} , haciendo mención que el tiempo 3 respecto a carga microbiana de los tratamientos fue el segundo mejor tiempo presentando *Bacillus subtilis* nativo una media de 7.17×10^5 UFC g^{-1} , el *Bacillus subtilis* comercial con media de 5.10×10^5 UFC g^{-1} y el testigo con media de 4.89×10^5 UFC g^{-1} , seguido del tiempo dos con los tratamientos *Bacillus subtilis* comercial, Testigo y el tratamiento *B. subtilis* nativo-*T. harzianum* nativo, con medias 4.09×10^5 UFC g^{-1} , 4.06×10^5 UFC g^{-1} y 4.05×10^5 UFC g^{-1} respectivamente, siendo el resto de los tiempos estadísticamente inferiores respecto a las medias obtenidas (Figura 18).

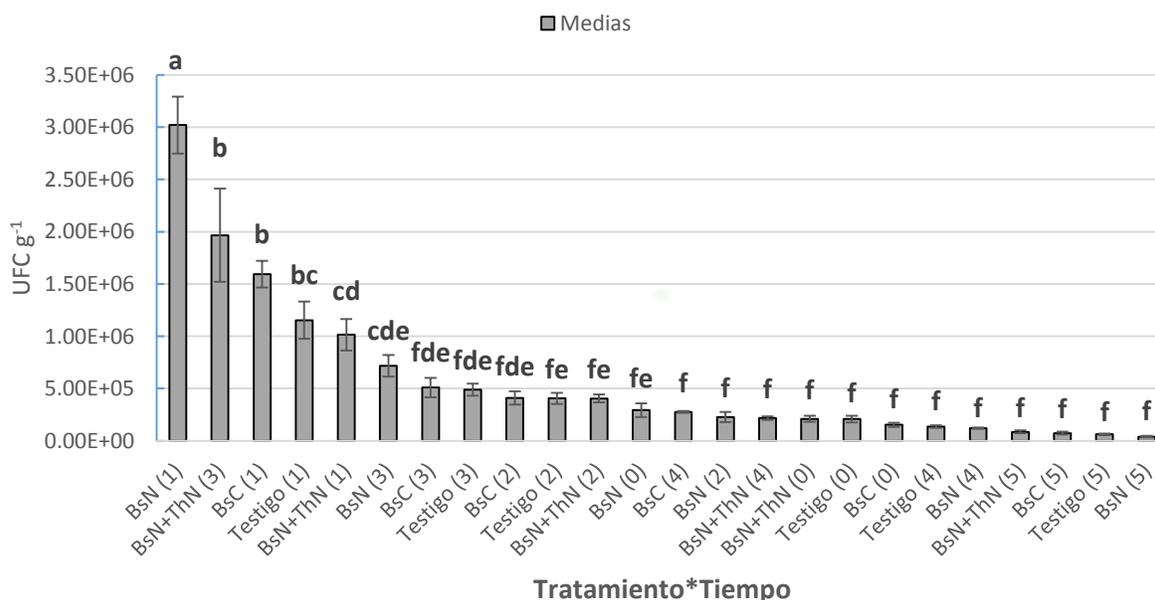


Figura 18. Unidades formadoras de colonias (UFC $\times 10^{12} g^{-1}$) de suelo seco (s.s.) respecto al tiempo en plantas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos, en cada figura promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). Bs N= *Bacillus subtilis* nativo, Bs N + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo, Bsc= *Bacillus subtilis* comercial, T= Testigo y (1...5)=Tiempos.

5.3. Análisis foliar de macro y micronutrientes de caña

Se realizaron análisis de elementos esenciales (EE) de las hojas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos, con la finalidad de saber si los tratamientos evaluados tuvieron efecto en dichas plantas, cabe mencionar que dicha evaluación se realizó una sola vez.

5.3.1. Nitrógeno foliar de caña

El contenido de nitrógeno (N) en hojas de los tratamientos evaluados tuvieron efecto similar con respecto al testigo, la concentración N para el tratamiento con *T. harzianum* nativo fue de 1.8186% y para *T. harzianum* comercial 1.855%, de igual manera con *B. subtilis* nativo 1.813% y *B. subtilis* comercial 1.967%, incluso la combinación de *T. harzianum* nativo con *B. subtilis* nativo fue de 1.694% y el testigo 1.764% sin diferencias estadísticas entre ellos ($p = 0.8$) (Figura 19).

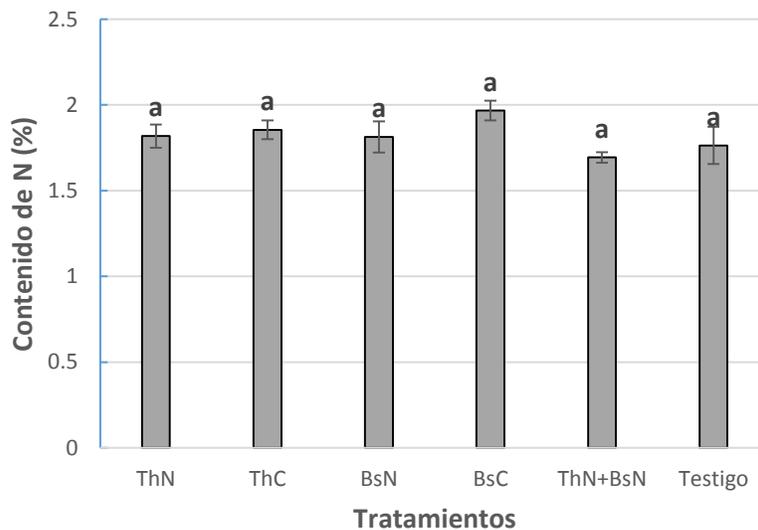


Figura 19. Contenido de nitrógeno en área foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos. ThC= *Trichoderma harzianum* nativo, ThC= *Trichoderma harzianum* comercial, BsN= *Bacillus subtilis* nativo, BsC= *Bacillus subtilis* comercial, Bs N + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$).

5.3.2. Fósforo foliar de caña

El contenido de fósforo (P) en hojas de los tratamientos evaluados tuvieron efecto similar con respecto al testigo, la concentración en presencia de *T. harzianum* nativo fue de 1454.41 ppm y para *T. harzianum* comercial con 1427.03 ppm; de igual manera se encontró con *B. subtilis* nativo 1460.28 ppm y *B. subtilis* comercial con 1462.09 ppm incluso la combinación *T. harzianum* nativo con *B. subtilis* nativo fue de 1533.542 ppm y el testigo con 1422.764 ppm, sin diferencias estadística entre ellos (Figura 20).

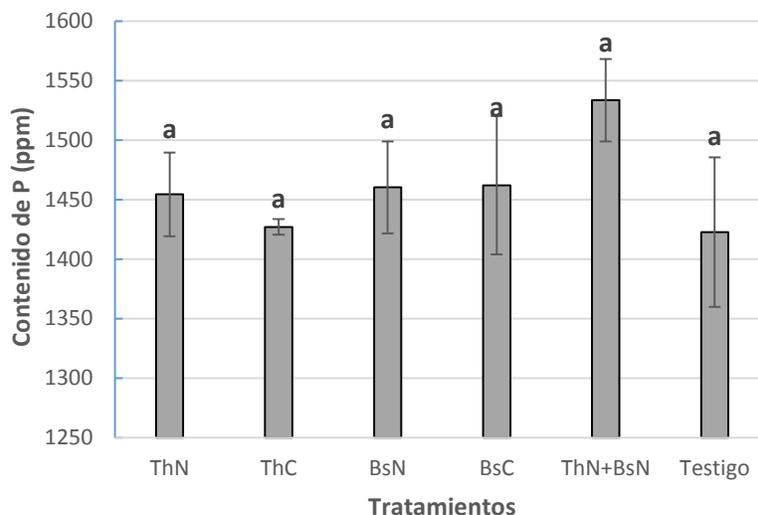


Figura 20. Contenido de Fósforo en ppm presente en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos: ThC= *Trichoderma harzianum* nativo, ThC= *Trichoderma harzianum* comercial, BsN= *Bacillus subtilis* nativo, BsC= *Bacillus subtilis* comercial, BsN= *Bacillus subtilis* nativo, BsN + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$).

5.3.3. Concentración de K

El contenido de potasio (K) en hojas de los tratamientos evaluados tuvieron efecto similar con respecto al testigo, la concentración de K para *T. harzianum* nativo fue de 7581.562 ppm, para *Trichoderma harzianum* comercial 8532.098 ppm, *B. subtilis* nativo 8040.95 ppm, *B. subtilis* comercial 8525.8 ppm, para *T. harzianum* nativo en combinación con *B. subtilis* nativo 8988.332 ppm y el testigo 7870.704 ppm no existiendo diferencia estadística entre ellos (Figura 21).

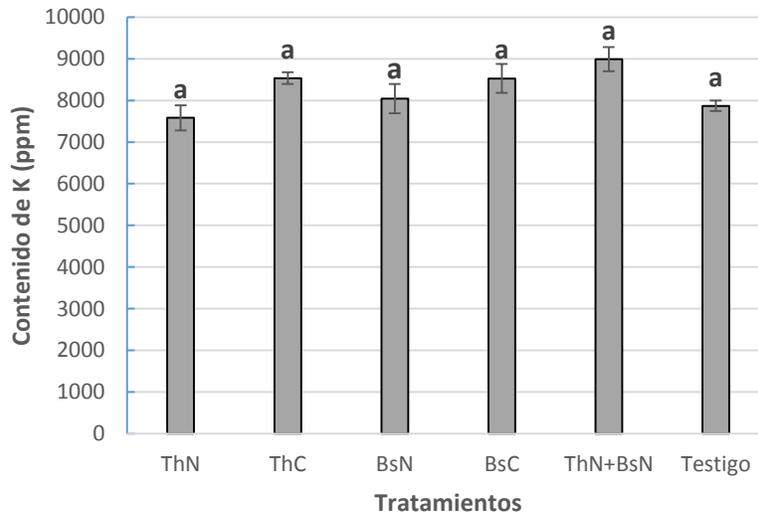


Figura 21. Contenido de potasio en ppm presentes en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos, Bs N= *Bacillus subtilis* nativo, ThC= *Trichoderma harzianum* comercial, BsN= *Bacillus subtilis* nativo, Bsc= *Bacillus subtilis* comercial, Bs N + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$).

5.3.4. Concentración de Mn

En cuanto al contenido de manganeso (Mn) en hojas, el tratamiento con *T. harzianum* nativo en combinación con *B. subtilis* nativo con una media de 143.196 ppm siendo estadísticamente superior al resto de los tratamientos ($p = 0.05$) y *B. subtilis* nativo con una media de 120.732 ppm, *Trichoderma harzianum* nativo fue de 96.448 ppm, para *Trichoderma harzianum* comercial 106.062 ppm, , *Bacillus subtilis* comercial 90.881 ppm, y el testigo 104.342 ppm, no existiendo diferencia estadística entre ellos (Figura 22).

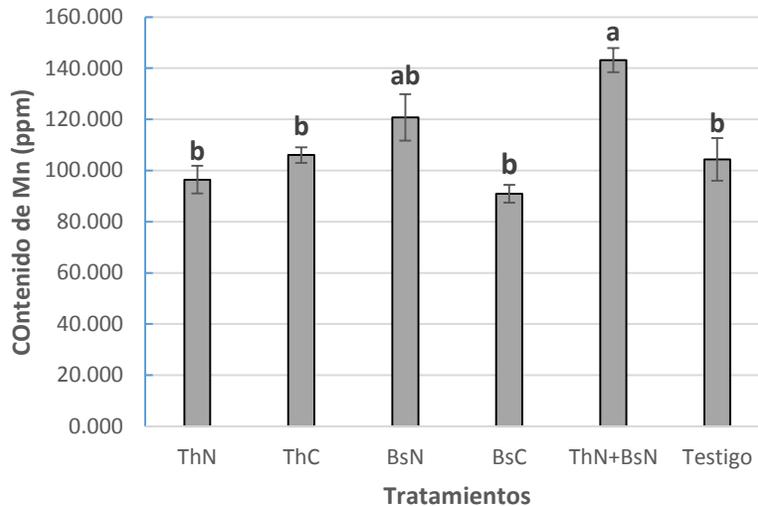


Figura 22. Contenido de Manganeso en ppm presente en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en la caña de azúcar en los 6 tratamientos, Bs N= *Bacillus subtilis* nativo, ThC= *Trichoderma harzianum* comercial, BsN= *Bacillus subtilis* nativo, BsC= *Bacillus subtilis* comercial, Bs N + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). Los tratamientos BsN y ThN+BsN fueron estadísticamente superiores al resto de los tratamientos.

5.3.5. Concentración de B

En cuanto al contenido de boro (B) en hojas, en los tratamientos evaluados tuvieron efecto similar con respecto al testigo, para *T. harzianum* nativo fue de 3.259 ppm, para *T. harzianum* comercial 3.373 ppm, *B. subtilis* nativo 3.375 ppm, *B. subtilis* comercial con una mayor concentración que el resto de los tratamientos de 14.628 ppm, para *T. harzianum* nativo en combinación con *B. subtilis* nativo 5.199 ppm y el testigo 3.507 ppm no existiendo diferencia estadística entre ellos (Figura 23).

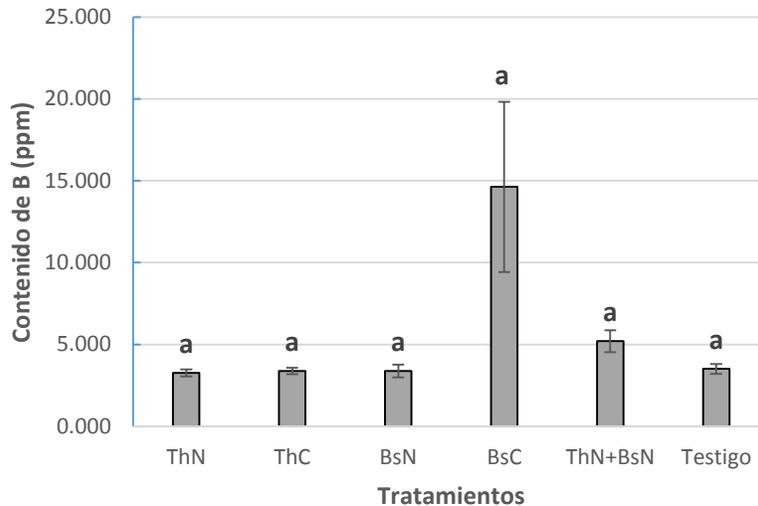


Figura 23. Contenido de Boro en ppm presente en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos, Bs N= *Bacillus subtilis* nativo, ThC= *Trichoderma harzianum* comercial, BsN= *Bacillus subtilis* nativo, Bsc= *Bacillus subtilis* comercial, Bs N + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). Todos los tratamientos no presentaron diferencias estadísticas.

5.3.6. Concentración de Na

El contenido de sodio en hojas, los tratamientos evaluados tuvieron efecto similar con respecto al testigo en presencia de *T. harzianum* nativo fue de 842.40 ppm, para *T. harzianum* comercial 884.13 ppm, *B. subtilis* nativo 823.33 ppm, *B. subtilis* comercial con una mayor concentración que el resto de los tratamientos de 2873.83 ppm, para *T. harzianum* nativo en combinación con *B. subtilis* nativo 862.16 ppm y el testigo 855.34 ppm no existiendo diferencia estadística entre ellos (Figura 24).

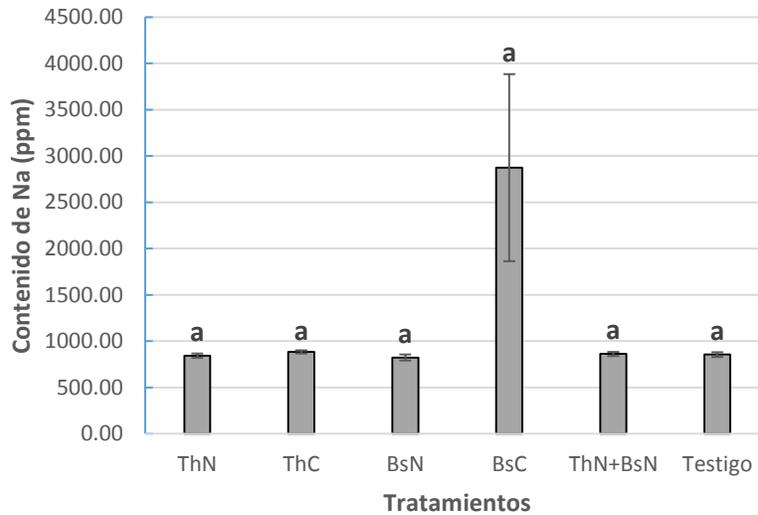


Figura 24. Contenido de Sodio en ppm presentes en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos, Bs N= *Bacillus subtilis* nativo, ThC= *Trichoderma harzianum* comercial, BsN= *Bacillus subtilis* nativo, Bsc= *Bacillus subtilis* comercial, Bs N + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). Todos los tratamientos no tuvieron diferencias estadísticas.

5.3.7. Concentración de Ca

En contenido de calcio (Ca) en hojas, los tratamientos evaluados tuvieron efecto similar con respecto al testigo, la concentración para *T. harzianum* nativo fue de 1775.752 ppm, para *T. harzianum* comercial 1719.754 ppm, *B. subtilis* nativo 2159.116 ppm, y *B. subtilis* comercial con una mayor concentración que el resto de los tratamientos de 2629.69 ppm, para *T. harzianum* nativo en combinación con *B. subtilis* nativo 1991.138 ppm y el testigo 1843.044 ppm no existiendo diferencia estadística entre ellos (Figura 25).

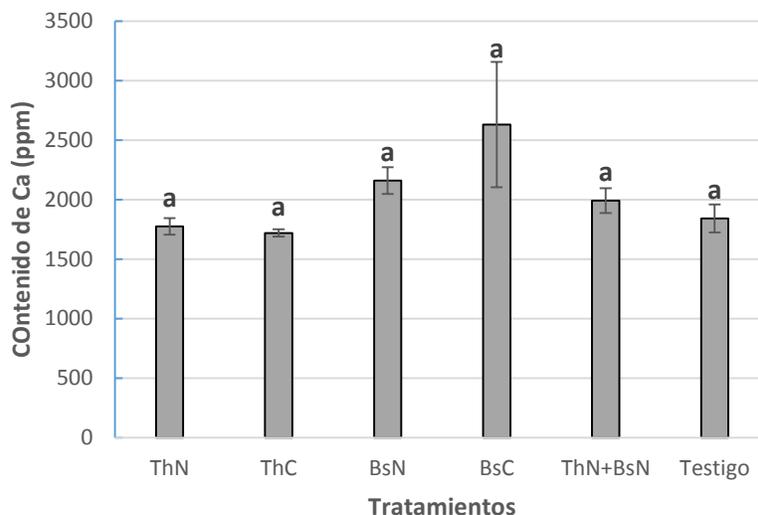


Figura 25. Contenido de Calcio en ppm en la lámina de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos, Bs N= *Bacillus subtilis* nativo, ThC= *Trichoderma harzianum* comercial, BsN= *Bacillus subtilis* nativo, Bsc= *Bacillus subtilis* comercial, Bs N + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). Todos los tratamientos no tuvieron diferencias estadísticas.

5.3.8. Concentración de Mg

El contenido de magnesio (Mg) en hojas, donde los tratamientos evaluados tuvieron efecto similar con respecto al testigo con la concentración de *T. harzianum* nativo fue de 1425.382 ppm, para *T. harzianum* comercial 1349.596 ppm, *B. subtilis* nativo con una mayor concentración que el resto de los tratamientos con media 1784.610 ppm, *B. subtilis* comercial con 1445.672 ppm, para *T. harzianum* nativo en combinación con *B. subtilis* nativo 1540.752 ppm y el testigo 1475.326 ppm, no existiendo diferencia estadística entre ellos.

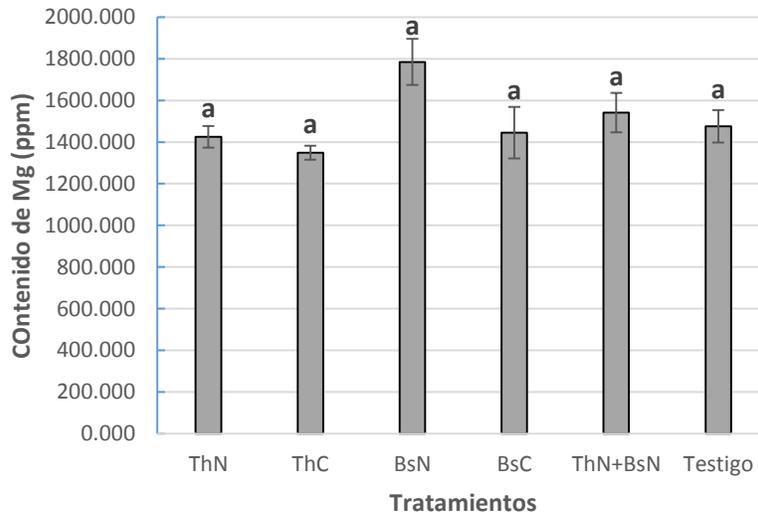


Figura 26. Contenido de Magnesio en ppm en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos, Bs N= *Bacillus subtilis* nativo, ThC= *Trichoderma harzianum* comercial, BsN= *Bacillus subtilis* nativo, Bsc= *Bacillus subtilis* comercial, Bs N + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$).

5.3.9. Concentración de Fe

El contenido de hierro (Fe) en hojas, donde *B. subtilis* nativo tuvo mejor efecto en la absorción de dicho elemento con una media de 135.7064 ppm, junto con *T. harzianum* comercial 88.848 ppm, *B. subtilis* comercial con media 112.2322 ppm y el testigo con 75.2372 ppm siendo más efectivos que el resto de los tratamientos, sin embargo *T. harzianum* nativo con 99.7386 ppm, *T. harzianum* nativo-*Bacillus subtilis* nativo 64.4228 ppm no tuvieron diferencia estadística entre ellos (Figura 27).

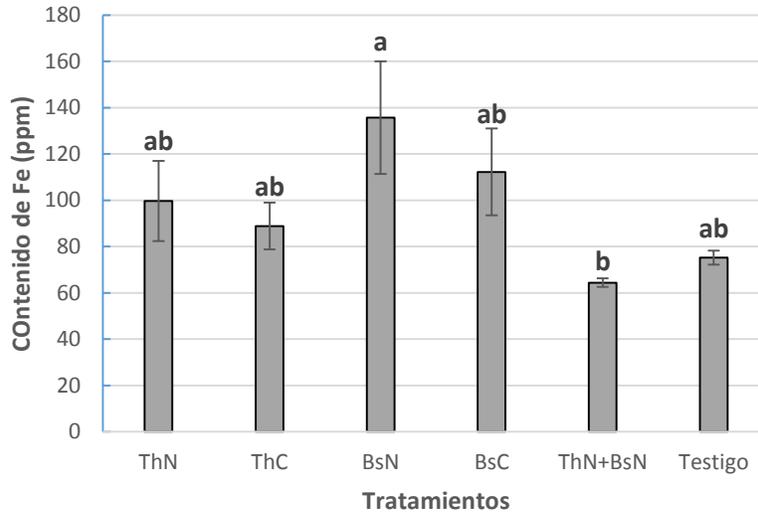


Figura 27. Contenido de Hierro en ppm en la lámina foliar de caña de azúcar proveniente de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos, Bs N= *Bacillus subtilis* nativo, ThC= *Trichoderma harzianum* comercial, BsN= *Bacillus subtilis* nativo, Bsc= *Bacillus subtilis* comercial, Bs N + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$). Los tratamientos BsN, BsC, ThC y ThN+BsN resultaron ser estadísticamente superiores al resto de los tratamientos.

5.3.10. Concentración de Cu

En el contenido de cobre (Cu) en hojas, los tratamientos evaluados tuvieron efecto similar con respecto al testigo, con *T. harzianum* nativo fue de 3.0236 ppm, para *T. harzianum* comercial 3.0458 ppm, *B. subtilis* nativo con 3.4152 ppm, *B. subtilis* comercial con una mayor concentración que el resto de los tratamientos 4.611 ppm, para *T. harzianum* nativo en combinación con *B. subtilis* nativo 3.5502 ppm y el testigo 3.192 ppm, no existiendo diferencia estadística entre ellos (Figura 28).

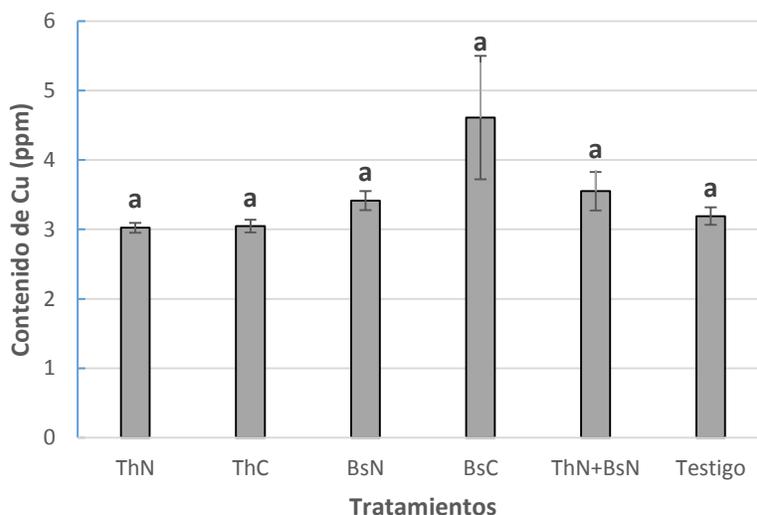


Figura 28. Contenido de Cobre en ppm en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos. Bs N= *Bacillus subtilis* nativo, ThC= *Trichoderma harzianum* comercial, BsN= *Bacillus subtilis* nativo, Bsc= *Bacillus subtilis* comercial, Bs N + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$).

5.3.11. Concentración de Zn

En el contenido de cobre (Cu) en hojas, los tratamientos evaluados tuvieron efecto similar con respecto al testigo, la concentración con presencia de *T. harzianum* nativo fue de 20.8272 ppm, para *T. harzianum* comercial 16.8356 ppm, *B. subtilis* nativo con 23.9104 ppm, *B. subtilis* comercial con una mayor concentración que el resto de los tratamientos 32.6024 ppm, para *T. harzianum* nativo en combinación con *B. subtilis* nativo 19.8024 ppm y el testigo 20.0576 ppm, no existiendo diferencia estadística entre ellos (Figura 29).

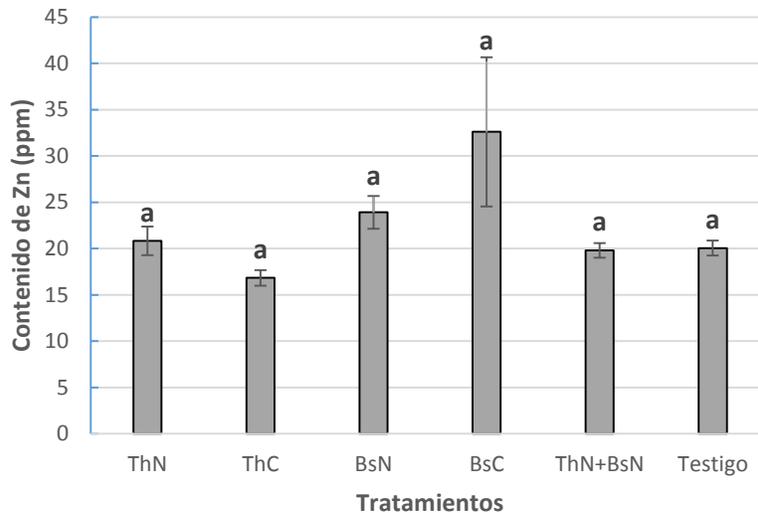


Figura 29. Contenido de Zinc en ppm en la lámina foliar de caña de azúcar de cultivo de tejidos en los 6 tratamientos. Bs N= *Bacillus subtilis* nativo, ThC= *Trichoderma harzianum* comercial, BsN= *Bacillus subtilis* nativo, Bsc= *Bacillus subtilis* comercial, Bs N + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$).

5.4. Determinación del desarrollo radicular en la rizósfera de caña de azúcar de cultivo de tejidos

Los análisis para la determinación del desarrollo radicular en caña de azúcar proveniente de cultivo de tejidos se realizaron con base en la densidad (peso en gramos), el análisis para peso fresco y peso seco se realizó una vez terminadas las evaluaciones antes mencionadas. Los resultados expresaron para peso fresco que *B. subtilis* nativo, *T. harzianum* nativo y *B. subtilis* comercial mejoraron el crecimiento de la zona meristemática de nuestras plantas obteniendo como media 11.544 g, 7.738 g y 7.179 g; respectivamente para cada tratamiento, siendo estadísticamente iguales, no así para *T. harzianum* comercial con media de 6.344 g y la combinación del mismo con *Bacillus subtilis* nativo con 3.592 g no encontrándose entre los mejores, pero siendo superiores al testigo con media 2.514 g (Figura 30).

Así mismo para peso seco en donde *B. subtilis* nativo, *T. harzianum* nativo y *B. subtilis* comercial de igual forma, mejoraron el crecimiento de la zona meristemática de nuestras plantas obteniendo como media 3.306 g, 2.845 g y 2.717 g respectivamente para cada tratamiento, siendo estadísticamente iguales, no así para *T. harzianum* comercial con media de 1.821 g y la

combinación del mismo con *B. subtilis* nativo con 1.871 g no encontrándose entre los mejores, pero siendo superiores al testigo con media de 0.982 g (Figura 30).

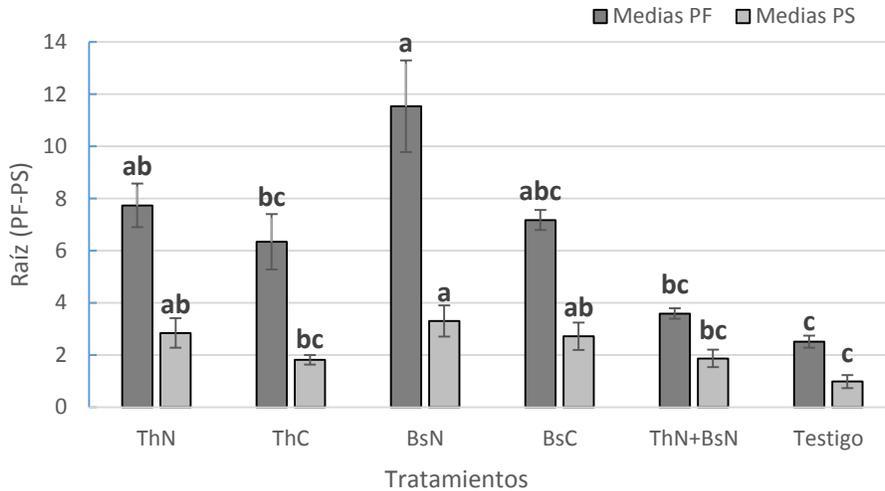


Figura 30. Densidad (peso en gramos) del área radicular en plantas de caña de azúcar proveniente del cultivo de tejidos. Comparación de medias de peso fresco (PF) y peso seco (PS) en función a la aplicación de 6 tratamientos, Bs N= *Bacillus subtilis* nativo, ThC= *Trichoderma harzianum* comercial, BsN= *Bacillus subtilis* nativo, BsC= *Bacillus subtilis* comercial, Bs N + ThN= *Bacillus subtilis* nativo mas *Trichoderma harzianum* nativo y T= Testigo. Promedios con diferentes letras son estadísticamente diferentes entre sí (LSD de Fisher, $p \leq 0.05$).

6. DISCUSIÓN

6.1. Cuantificación de *Trichoderma harzianum* en la rizósfera de plantas de caña de azúcar de cultivo de tejidos

Los valores de UFC g⁻¹ reportados en la figura 13 sugieren que *Trichoderma harzianum* nativo, y en combinación con *Bacillus subtilis* nativo tuvieron mayor adaptabilidad en la zona de raíz de las plantas provenientes de cultivo de tejidos.

Cabe mencionar que no se encuentra literatura relacionada a la aplicación de dichos microorganismos en plantas de caña provenientes de cultivo de tejidos, pero de acuerdo a lo reportado por Harman *et al.* (2004) donde menciona que semillas de maíz con *Trichoderma harzianum* cepa T-22, resultaron con la colonización de raíces pero con ninguna colonización en suelo, brotes y hojas. El aumento del crecimiento probablemente se debió a la estimulación directa de la planta. Lo que concuerda con esta investigación ya que los análisis se realizaron en suelo y no en planta, la cepa T-22 tuvo nulo crecimiento pero no se descarta que en planta hubo algún tipo de adaptabilidad siendo caso contrario a lo ocurrido con *Trichoderma harzianum* nativo.

Sin embargo, Durman *et al.* (2003), señalan que la competencia por sustrato o espacio depende de, si el mismo está libre de patógenos (sustrato estéril) o si hay una microbiota natural. En el primer caso, la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato. En cambio, en el segundo caso la velocidad de crecimiento, conjuntamente con otros de los mecanismos de acción del antagonista, es determinante para el control biológico del patógeno y la colonización del sustrato. A lo que sustenta a lo ocurrido en esta investigación, que *T. harzianum* comercial (cepa T-22) no desarrollo en el sustrato en la cual fue aplicado, puede deberse a factores bióticos ó abióticos que no le permitieron adaptarse a las condiciones del medio como luz, agua y temperatura.

Con respecto al tiempo el muestreo uno (Tiempo 0) presentó nulo desarrollo ya que en dicho momento no se llevaba aun la primer inoculación, la diferencia entre densidades de UFC/g⁻¹ de suelo entre cada tiempo fue más notoria para el segundo muestreo (tiempo 1) con una carga de 7.62×10^{12} UFC g⁻¹, no así para los muestreos posteriores donde fue disminuyendo de manera gradual. Lo que contradice a lo reportado por Fernández-Larrea (2001) donde menciona que *Trichoderma harzianum*, es uno de los hongos que está presente en todo tipo de suelos agrícolas y ecosistemas, que su versatilidad, adaptación y fácil manipulación permite que su uso por más de

70 años como antagonista para el control de enfermedades en plantas producidas por hongos en el mundo. A lo que se podría decir que los microorganismos evaluados en esta investigación su desarrollo no fue ascendente si no caso contrario por las condiciones en las que se desarrollaron, el que no recibieron las condiciones necesarios ni se monitorearon el tiempo completo que conlleva el ciclo de dicho cultivo, la cual por su fácil adaptabilidad pudiera ser que en una etapa avanzada o condiciones ambientales distintas, pudieran haber presentado una mayor adaptabilidad y desarrollo.

6.2. Cuantificación de *Bacillus subtilis* en la rizósfera de la planta de caña de azúcar de cultivo de tejidos

Los resultados sobre la cuantificación de UFC/g⁻¹ de *B. subtilis* nativo y *B. subtilis* comercial, se encontró que los tratamientos *B. subtilis* nativo con media de 7.36 x 10⁵ UFC g⁻¹), y *B. subtilis* en combinación con la cepa nativa *T. harzianum* fue de 6.5 x 10⁵ UFC g⁻¹, la cepa comercial *B. subtilis* “**Serenade® MAX™**” con media 5.03 x 10⁵ UFC g⁻¹ son estadísticamente iguales y superiores respecto al testigo.

Sin tener reportes de trabajos similares a esta investigación, podemos hacer mención con respecto a los resultados de Cavaglieri, *et al* (2005) obtuvieron poblaciones bacterianas del rizoplano de maíz, y se ensayó la capacidad de diez cepas de *Bacillus* para inhibir el crecimiento fúngico. De acuerdo con estos resultados, se seleccionó *B. subtilis* CE1 como el mejor antagonista para analizar la colonización de raíz de maíz de *F. verticillioides*. *Bacillus subtilis* CE1 en 10⁸ y 10⁷ UFC/ml⁻¹, el inóculo fue capaz de reducir la colonización por rizoplano y endorhizosfera de *F. verticillioides* en ensayos de invernadero. La cepa *B. subtilis* CE1 podría ser un potencial agente de control biológico contra *F. verticillioides* a nivel de la raíz. Esto respalda lo encontrado en este trabajo, que *Bacillus subtilis* es un excelente microorganismo para ser aplicado en la rizósfera en caña de azúcar proveniente de cultivo de tejidos.

Con respecto al tiempo, ocho días previos a la siembra se realizó el primer muestreo (Tiempo 0), la cual presentó un desarrollo en caja con media de 2.17 x 10⁵ UFC g⁻¹, el segundo muestreo que se realizó 15 días posteriores a la inoculación, presentó una media de 1.70 x 10⁶ UFC

g^{-1} , siendo superior al resto de los tiempos, la diferencia entre densidad de UFC/ g^{-1} entre cada tiempo fue notoria disminuyendo considerablemente conforme al paso del tiempo.

Esto se asemeja a lo obtenido por Lugtenberg y Kamilova (2009), donde concluyen que los agentes de control biológico pueden estar expuestos a la actividad competitiva y antagonista de la microbiota endógena, que la introducción de microorganismos exógenos en los suelos agrícolas (producto Serenade® MAX™ con unidades infectivas de *B. subtilis*) puede traer efectos perjudiciales para el equilibrio ecológico, y afectar las poblaciones autóctonas (*B. subtilis* nativo) que ejercen efectos benéficos en el desarrollo de las plantas.

6.3. Comparación de concentraciones nutrimentales en hojas de caña de azúcar proveniente de cultivo de tejidos

Se realizaron análisis de 11 elementos esenciales (EE) en hojas de caña de azúcar provenientes de cultivo de tejidos, en la cual los resultados obtenidos arrojaron que manganeso (Mn) por efecto de *T. harzianum* nativo y *B. subtilis* nativo con media de 143.196 ppm y Hierro (Fe) por efecto de *B. subtilis* nativo con media de 135.7064 ppm, resultaron con una mayor concentración por efecto de la aplicación de dichos microorganismos y que el resto de los elementos no presentaron diferencias estadísticas significativas.

Dichos resultados concuerdan con Malboobi *et al.* (2009) donde mencionan que la aplicación de *T. harzianum* en la etapa de iniciación del retoño aumentó la disponibilidad de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) en 27, 65 y 44%, respectivamente. La disponibilidad de algunos de los micronutrientes a saber, Cu, Fe, Mn y Zn también se mejoraron, respectivamente, en 6, 100, 79 y 66%. Hubo un aumento considerable en el carbono orgánico (55%) con una disminución concomitante del pH del suelo (6%).

Además del efecto controlador biológico de patógenos Howell (2003) y Godes (2007) mencionan que se ha comprobado que la inoculación de *T. harzianum* aporta otros beneficios a las plantas; a través de la descomposición de materia orgánica, libera nutrientes en formas disponibles para la planta, y presenta actividad solubilizadora de fosfatos (Valencia *et al.* 2007), por lo que se utiliza frecuentemente como un organismo estimulador de la disponibilidad de los fertilizantes en diferentes productos comerciales (Moreno *et al.* (2007), y Peng (1993), señala que promueve el

crecimiento y desarrollo de los cultivos produciendo metabolitos que estimulan los procesos de desarrollo vegetal.

6.4. Determinación del desarrollo radicular en la rizósfera de caña de azúcar de cultivo de tejidos

Los análisis para la determinación del desarrollo radicular en caña de azúcar proveniente de cultivo de tejidos se realizaron en base a densidad (peso en gramos), Los resultados expresaron para peso fresco; *B. subtilis* nativo, *T. harzianum* nativo y *B. subtilis* comercial que fueron mejores en crecimiento radicular, obteniendo como media 11.544 g, 7.738 g y 7.179 g; respectivamente para cada tratamiento, siendo estadísticamente iguales y superiores al resto de los tratamientos.

Así mismo para peso seco en donde *B. subtilis* nativo, *T. harzianum* nativo y *B. subtilis* comercial de igual forma, mejoraron el crecimiento de la zona meristemática, obteniendo como media 3.306 g, 2.845 g y 2.717 g respectivamente para cada tratamiento, siendo estadísticamente iguales y mejores que el resto de los tratamientos.

Cabe mencionar que investigaciones sobre la aplicación de microorganismos benéficos en plantas provenientes de cultivo de tejidos es nula ya que en la literatura no se encuentran reportes relacionados al tema, pero sí podemos comparar con lo reportado por Pulido (2016), el cual avaluó el efecto de la aplicación de esporas y células vegetativas del microorganismo *Bacillus subtilis* a diferentes concentraciones (10^7 y 10^8 UFC/ml), en cultivos de maíz, mediante las variables respuesta: longitud aérea (LA), peso seco aéreo (PSA), peso seco radicular (PSR) y peso seco total (PST). Donde encontró que la inoculación del microorganismo, ya sea como esporas o células vegetativas, que en ambas concentraciones evaluadas y el sobrenadante proveniente de su cultivo incrementa el crecimiento y desarrollo de las plantas de maíz respecto al control absoluto sin inocular, esto respalda que *Bacillus subtilis* es un excelente potencializador del crecimiento particularmente en raíz, siendo más efectivo que *Trichoderma harzianum*.

Por otra parte se sustenta a lo dicho por Sutton (1993), que *T. harzianum* tiene la capacidad de multiplicarse en el suelo y colonizar las raíces de las plantas liberando factores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas) que estimulan la germinación y el desarrollo de las plantas. Lo que se comprueba con este trabajo haciendo comparación con lo reportado por Valencia *et al.*

(2007), que *T. harzianum* nativo tuvo un 41.1% más de desarrollo respecto al testigo y en comparación con la cepa comercial del producto con la cepa T-22 de PHC® con un 7.6%, con la expresión del crecimiento radicular significativo, donde señala que sustancias estimulantes producidas por *T. harzianum* actúan como catalizadores o aceleradores de los tejidos meristemáticos primarios en las partes jóvenes de la planta, acelerando su reproducción celular, logrando que las plantas se desarrollen más rápido en comparación con plantas que no han sido tratadas con dicho microorganismo.

7. CONCLUSIONES

- La cepa *Trichoderma harzianum* nativo se estableció mejor al ambiente de la rizósfera de las plantas provenientes de cultivo de tejidos, que dando obsoleta la cepa comercial presentando nulo desarrollo.
- La aplicación de cepas nativas en caña de azúcar, en este caso *Bacillus subtilis* resultó ser más eficiente que la comercial, pero a diferencia de *Trichoderma*, la cepa comercial de *Bacillus* puede ser utilizada en ausencia de la cepa nativa debido a que estadísticamente resultaron iguales.
- El éxito de *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* como estimuladores de fertilizantes o promotores de la disponibilidad de macro y micronutrientes a las raíces de las plantas y como controladores biológicos dependen en gran parte de ciertos factores tales como pH, luz, humedad y temperatura, que en gran parte determinan el grado de desarrollo del microorganismo en simbiosis con el hospedero y como resultado paralelo hacer de las plantas provenientes de cultivo *in vitro*, la obtención de una mejor adaptación y desarrollo de un ambiente controlado *in vitro* o en invernadero a un ambiente hostil en campo con temperaturas que pueden fluctuar de los 28 a 45 °C.
- Los microorganismos nativos tuvieron mayor efecto en el desarrollo radicular de las plantas provenientes de cultivo de tejidos.
- La utilización de cepas comerciales, particularmente las utilizadas en este trabajo, son ideales para mejorar el desarrollo de raíz.
- La inoculación con los microorganismos nativos *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* incrementaron la eficiencia de absorción de elementos como el manganeso y el hierro, reflejado en una mayor concentración de dichos elementos en las hojas, así mismo los microorganismos comerciales tuvieron efecto positivo en la absorción del hierro.

8. LITERATURA CITADA

- Ahemad F, Ahmad I, Khan MS. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res* 163:173–181.
- Ahemad M, Kibret M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *J King Saud Univ Sci* 26:1–20.
- Alcántar, G. G. y M. Sandoval V. 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. 156 p. Publicación Especial No. 10 de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A.C., Chapingo, México.
- Alcántar G. Trejo-Téllez L. 2007. Nutrición de cultivos. Colegio de postgraduados, México. Ed. Mundi-prensa México. 462 págs
- Anderson, T.H. 2003. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Ag.Ecosys.Environ.* 98:285-293.
- Arkhipova TN, Prinsen E, Veselov SU, Martinenko EV, Melentiev AI, Kudoyarova GR. 2007. “Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil.” *Plant and Soil* 292:305-315.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. 2008. “Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities”. *Microbiological Research* 163:173-81
- Altomare, C., W.A. Norvell, T. Björkman y G.E. Harman. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microb.* 65(7), 2926-2933.
- Arkhipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, Martynenko EV, Kudoyarova GR. 2005. “Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants”. *Plant and Soil* 272:201-209.
- Barba Álvarez, A., Luna Rosales, B. y Romero Arredondo, J. 2001. Micropropagación de Plantas. México, Editorial Trillas, S.A. de C.V. 107 p.
- Bayer. 2018. Al servicio de la agricultura. <https://www.bayer.mx/es/productos/agricultura/> (accessed 2.6.18).
- Bevivino A, Tabacchioni S, Chiarini L, Carusi MV, Del Gallo M, Visca P. 1994. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. *Microbiology* 140:1069–1077.

- Behera, K.K., Sahoo, S., 2009. Rapid in vitro micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) through callus culture. *Nature and science* 7, 1–10.
- Benítez T, Rincón A.M., Limón M.C., and Codón A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. /:249-260.
- Brodeur J. 2012. Host specificity in biological control: insights from opportunistic pathogens. *Evol Appl*. 5(5):470-80.
- Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-de los Santos P, Martínez-Aguilar L. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 73:5308–5319.
- Calla Zalles, B. 2002. Efectos del Mycoral® durante la aclimatación y endurecimiento de plátano (*Musa spp*) Cuernos y FHIA- 20 producidos a partir de ápices meristemáticos. Tesis Ing. Agr., Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 32 p.
- Camargo, H. 2005. Evaluación en campo de la incidencia de *Rhizoctonia solani* en arroz (*Oriza sativa*), luego de la inoculación en semilla de un formulado comercial a base del antagonista *Trichoderma harzianum*.
- Carrillo A.E., Vera E.J., Alamilla M.J.C., Obrador O.J.J. y Aceves N.E. 2008. Cómo aumentar el rendimiento de la caña de azúcar en Campeche. Folleto técnico. Fondo mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Campeche. Colegio de Postgraduados Campus Campeche. 101p.
- Cohn F. 1872. Untersuchungen Über Bakterien. *Beitr Biol Pflanz*. 1:127-224.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. 2005. “Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects”. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4951-4959
- CONADESUCA. 2016. Comparativo de hectáreas cosechadas para distintas zafras (información de cierres) zafra 2016. Infocaña <http://www.campomexicano.gob.mx/azcf/reportes/salidaHtml.php>.
- Cortegaza Á.L. 2013. Guía para la micropropagación in vitro de la caña de azúcar. Fundación Produce. Sinaloa. A. C. 39 p.
- CDB. 2010. Convenio sobre Diversidad Biológica. <<http://www.cbd.int/>>.

- CNPR. 2014. Estadísticas de la Agroindustria de la Caña de Azúcar 2004/2013. Confederación Nacional de Productores Rurales. Unión Nacional de Cañeros: http://www.caneros.org.mx/site_caneros/estadisticas/nacional.pdf
- Chet I, Inbar J, Hadar I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow DT, Söderström B (eds) *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin, pp 165-184
- Choudhary DK, Bhavdish NJ. 2009. Interactions of *Bacillus spp.* and plants-UIT special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*. 164:493-513.
- Díaz, L.P., L.F. Medina, J. Latife, P.A. Digonzelli y S.B. Sosa. 2004. Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. *INTA, Argentina. RIA*, 33(2): 155-128.
- Díaz J. 1994. Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Agraria de La Habana.
- Druzhinina I, Kubicek CP. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species Clusters?. *J Zhejiang. Univ Sci B*. 2: 100-12.
- Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, et al. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol*. 9(10):749–759.
- Durman S, Menéndez A, Godeas A. 2003. Evaluación de *Trichoderma spp.* Como antagonista de *Rhizoctonia solani* “*in vitro*” y como biocontrolador del damping off de plantas de tomate en invernadero. *Revista Argentina de Microbiología*. 31(1):13-18.
- Euzeby JP. List of Prokariotic Names with standing nomenclature. 2006. Consultado: 20 de septiembre de 2010. Disponible en: <http://www.bacterioCict.fr/index.html>.
- Fernandez-Herrera, E., M. Acosta-Ramos, F. Ponce-González y V. Manuel-Pinto. 2007. Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxisporum* Schelechtend.:Fr. y *Rhizoctonia solani* Kuhn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(1): 35-42.
- FAOSTAT. 2013. Sugarcane production. Food and Agriculture Organization. Rome, Italy: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

- Fujita T, Shida O, Takagi H, Kunugita K, Pankrushina AN, Matsushashi M. 1996. Description of *Bacillus carboniphilus* sp. nov. Int Syst Bacteriol. 46:116-8.
- Grondona I, Hermosa R, Tejada M, Gomis MD, Mateos PF, Bridge PD, Monte E, García-Acha I. 1997. Physiological and biochemical characterization of *Trichoderma harzianum*, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. Appl Environ Microbiol 63:3189-3198
- Godes, A. 2007. Perspectivas de los inoculantes fúngicos en Argentina. pp. 11-14. En: Izaguirre-Mayoral, M.L., C. Labandera y J. Sanjuán (eds.). Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial. Imprenta Denad Internacional, Montevideo.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat Rev Microbiol. 2:43-56.
- Harman, G.E., Petzoldt, R., Comis, A., Chen, J. 2004. Interactions Between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and Maize Inbred Line Mo17 and Effects of These Interactions on Diseases Caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. Phytopathology 94, 147–153. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.2.147
- Harman, G.E. 2011. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. New Phytologist 189: 647–649.
- Hermosa MR, Grondona I, Iturriaga EA, Diaz-Minguez JM, Castro C, Monte E, Garcia-Acha I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma spp.* Appl Environ Microbiol 66:1890-1898
- Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. Nat Rev Microbiol. 8(1):15-25.
- Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Dis. 87, 4-10.
- Hu G. and St. Leger, J. 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. Applied and Environmental Microbiology. 68, 6383-6387.
- INAFED, 2010. Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM30veracruz/index.html>
- Jackson LE, Burger M, Cavagnaro TR .2008. Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. Annu Rev Plant Biol 59:341–363.

- Khan AA, Jilani G, Akhtar MS, Naqvi SMS, Rasheed M. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production. *J Agric Biol Sci* 1:48–58
- Khan, S.A., Rashid, H., Chaudhary, M.F., Chaudhry, Z., Afroz, A. 2008. Rapid micropropagation of three elite Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by shoot tip culture. *African Journal of Biotechnology* 7.
- Kubicek C, Harman G. *Trichoderma Gliocladium*. 2002. Basic biology, taxonomy and genetics. Copyright Taylor & Francis Ltd. 1:1-271.
- Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S. 2004. “Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp*”. *Phytopathology* 94:1259-1266
- Laslo É, György É, Mara G, Tamás É, Ábrahám B, Lányi S. 2012. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. *Crop Prot* 40:43–48.
- Lévesque CA, Brouwer H, Cano L, Hamilton JP, Holt C, Huitema E, et al. 2011. Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biol.* 11(7):R73.
- Lugtenberg B, Kamilova F. 2009. Plantgrowth-promoting rhizobacteria. *Ann Rev Microbiol.* 63:541-56.
- MAM (2013). Manual Azucarero Mexicano 56ª Edición. Grupos industriales y producción 2011/2012. Compañía Editora del Manual Azucarero. México, D. F. 495 p.
- Martínez L, B. y F. I. Pugnaier. 2009. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Ecosistemas* 18(2): 44-54.
- Malboobi MA, Behbahani M, Madani H, Owlia P, Deljou A, Yakhchali B, Moradi M, Hassanabadi H. 2009. Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1479–1484.
- Monte E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol* 4:1-4
- Moreno-Sarmiento, N., L. Moreno-Rodríguez y D. Uribe-Vélez. 2007. Biofertilizantes para la agricultura en Colombia. pp. 38-45. En: Izaguirre-Mayoral, M.L., C. Labandera y J. Sanjuán (eds.). *Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial*. Imprenta Denad Internacional, Montevideo.

- Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL, Thornart T. 2007. “Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants”. *Environmental Microbiology* 9:1084–1090.
- Orberá Ratón TM, Serrat Díaz MJ, González Giro Z. Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. *Fitosanidad*. 2009;13(2):95-100.
- Peix A, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, Rodríguez-Barrueco CE, Valázquez E. 2003. *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate *in vitro*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:2067–2072.
- Pérez N. 2004. Manejo Ecológico de plagas. CEDAR: La Habana. Cuba. 296 pp.
- Pereyra-Irujo, G. O., L. Velázquez, C. Graniery, L. A. N. Aguirrezábal, 2007. “A method for drought tolerance screening in sunflower”, *Plant Breeding*, 126: 445-448.
- Peterson RKD, Higley LG, editors. 2001. Biotic stress and yield Loss. New York: CRC Press.
- Reed SC, Yang X, Thornton PE. 2015. Incorporating phosphorus cycling into global modeling efforts: a worthwhile, tractable endeavor. *New Phytol* 208:324–329.
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305–339.
- Robinson-Boyera L., Jegerb J., Xu M. and Jeffries P. 2009. Management of strawberry grey mould using mixtures of biocontrol agents with different mechanisms of action. *Biocontrol Science and Technology*. 19 (10): 1051 - 1065.
- Santoyo G, Orozco-Mosqueda M, Govindappa M. 2012. “Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review”. *Biocontrol Science and Technology* 22:8, 855-872.
- Salgado-García, S., Lagunes-Espinoza, L.C., Núñez-Escobar, R., Ortiz-García, C.F., Bucio-Alanis, L. y Aranda-Ibañez, E. 2013. Caña de azúcar. Producción sustentable. Mundi Prensa-Colegio de Postgraduados. México, D. F. 528 p.
- Sentfés-Herrera H.E. (2013) Variabilidad Genética y Caracterización de Variedades de Caña de Azúcar (*Saccharum* spp.). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, México. 142 p.

- Sentíes-Herrera H.E., Gómez-Merino F.C., Valdez-Balero A., Silva-Rojas H.V., Trejo-Téllez L.I. (2014) The Agro-Industrial Sugarcane System in Mexico: Current Status, Challenges and Opportunities. *Journal of Agricultural Science* 4: 26-55.
- Singh, V., R.J. Lal, S.K. Awasthi, and M.R. Verma. 2009. Managing red rot of sugarcane by *Trichoderma harzianum*. *Indian Sugar* 59: 25–30.
- Scortecci K.C., Creste S., Calsa T., Xavier M.A., Landell M.G.A., Figueira A., Benedito V.A. 2012. Challenges, Opportunities and Recent Advances in Sugarcane Breeding. In: Dr. I. Abdurakhmonov (Ed). *Plant Breeding.InTech*, Nwy York, USA. pp. 267-296.
- Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus* 2:587.
- Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Komagata K. 1996. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 46:939-46.
- SIAZUCAR. 2009. Sistema Nacional de Información de la Industria Azucarera. Convención Nacional de Geografía 2009. <http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/eventos/cng2009/memoria/cng2009/20091019%20siazucar%20para%20cng%20julio%20c-rivera.pps>
- SAGARPA. 2016. Estudio del Cultivo de Caña de Azúcar para Fomentar la Productividad y Competitividad del Sector Agrolimentario y Rural en su Conjunto 2015. http://sagarpa.gob.mx/ProgramasSAGARPA/2015/Productividad_y_competitividad_agroalimentaria/Programa_regional_de_desarrollo_previsto_en_el_PND/36%20incentivos/.pps
- Stefanova M, Leiva A, Larriganaga L, Coronado MF. 1996. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista Facultad de Agronomía.* 16:509-516.
- Sutton, J. y G. Peng. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathol.* 83, 615-621.
- Valencia, H., J. Sánchez, D. Vera, N. Valero y M. Cepeda. 2007. Microorganismos solubilizadores de fosfatos y bacterias fijadoras de nitrógeno en páramos y región cálida tropical (Colombia) pp. 169-183. En: Sánchez, J. (ed.). *Potencial biotecnológico de microorganismos en ecosistemas naturales y agroecosistemas.* Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

- Vinale F, Marra R, Scala F, Ghisalbertic EL, Lorito M, Sivasithamparamb K. 2006. Major secondary metabolites produced by two comercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Lett Appl Microbiol.* 43:143-148.
- Vinale F, Sivasithamparamb K, Ghisalbertic E, Marraa R, Wooa S, Lorito M. 2008. *Trichoderma*-plant- pathogen interactions. *Soil Biol Biochem.* 40:1-10.
- Vinale F, Sivasithamparamb K, Ghisalbertic E, Marra-Barbetti MJ, Li HR, Wooa S, et al. 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol Mol Plant Pathology.* 72:80-86.
- Zuñiga, P., Adrian, I. 2012. Establecimiento in vitro de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).
- Yacizi S, Yanar Y, Karaman I. 2011. Evaluation of bacteria for biological control of early blight disease of tomato. *Afr J Biotechnol.* 10(9):1573-7.