

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Identificación y caracterización de microorganismos
benéficos aislados de caña de azúcar de la Huasteca
Potosina y Tamaulipeca para el desarrollo de
biofertilizantes”**

Tesis que presenta

FATIMA BERENICE SALAZAR BADILLO

Para obtener el grado de

Maestría en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

DR. JUAN FRANCISCO JIMÉNEZ BREMONT

San Luis Potosí, S.L.P., 7 de diciembre del 2011



Constancia de aprobación de la tesis

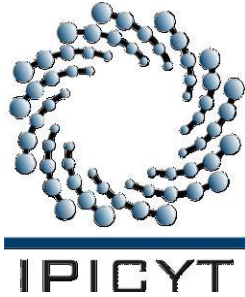
La tesis "Identificación y caracterización de microorganismos benéficos aislados de caña de azúcar de la huasteca Potosina y Tamaulipeca para el desarrollo de biofertilizantes" presentada para obtener el Grado de Maestría en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por QFB Fatima Berenice Salazar Badillo y aprobada el 23 de noviembre de 2011 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
(Director de la tesis)

Dr. Antonio de León Rodríguez
(Asesor de la tesis)

Dra. Ruth Elena Soria Guerra
(Asesor de la tesis)

..



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, y recibió el apoyo de la Fundación Produce San Luis Potosi.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Pagina en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen

Dedicatorias

Quiero dedicar este trabajo a mis padres

Lula y Cuco

Ya que sin su apoyo, cariño y comprensión no hubiera logrado sacar esto adelante. Ellos saben que son lo que más quiero en el mundo y que todo el esfuerzo que hice no solo es por mí sino también por ellos.

A mis hermanos: Marco, Jorge y Cuco, ya que en su momento cada uno de ellos ha sido mi inspiración, así como un motivo para seguir echándole ganas.

A mis niños que tanto quiero: Itzel, Jorge, Cuquito, Toñito y Angelito, ya que siempre le aportan alegría, travesuras y diversión a mi vida.

A mi hermanita Rosi que siempre tiene el consejo adecuado, además siempre ha estado ahí para apoyarme al paso de los años y darle un toque de alegría y responsabilidad a mi vida.

Agradecimientos

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por confiar en mí y darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, lo que me ha permitido crecer no solo como estudiante sino también como persona. Principalmente le agradezco el apoyo incondicional que siempre me ha dado.

Al Dr. Antonio de León Rodríguez y a la Dra. Ruth Elena Soria Guerra, por sus sugerencias y el tiempo empleado para la revisión de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Luz, Jorge, Silvia, Azu, Isra, Betty, Pablo, Erika, Aida y Alicia, por todos sus consejos, apoyo y buenos momentos que me han hecho pasar.

A Margarita y Alex por su apoyo y amistad.

A mis compañeros de generación ya que siempre me mostraron apoyo y principalmente amistad.

A Cintya y Janeth que además de darme apoyo, cariño y amistad cuando más lo he necesitado, hicieron de esta experiencia algo divertido, las quiero mucho brujas.

A mis amigos Rosi, Diana y Alan, que a pesar de la distancia siempre han estado apoyándome y aconsejándome.

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| Constancia de aprobación | ii |
| Créditos institucionales | iii |
| Acta de examen | iv |
| Dedicatorias | v |
| Agradecimientos | vi |
| Lista de tablas | x |
| Lista de figuras | xi |
| RESUMEN | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| I.- INTRODUCCIÓN | 1 |
| II.- MATERIALES Y MÉTODOS | |
| 2.1 Aislamiento de microorganismos de raíces de caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)..... | 4 |
| 2.2 Caracterización bioquímica de algunos microorganismos aislados..... | 4 |
| 2.3 Identificación de los géneros <i>Pseudomonas</i> y <i>Azospirillum</i> de los aislados bacterianos con capacidad fosfodisolvente..... | 4 |
| 2.4 Inoculación de caña de azúcar, maíz y jitomate..... | 5 |
| 2.5 Tipificación de los microorganismos probados mediante técnicas moleculares..... | 5 |

| | |
|--|---|
| 2.6 Interacción de hongos aislados de caña de azúcar con <i>Arabidopsis thaliana</i> | 6 |
|--|---|

III.- RESULTADOS

| | |
|--|---|
| 3.1 Aislamiento de microorganismos de la rizósfera de caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)..... | 8 |
|--|---|

| | |
|---|---|
| 3.2 Caracterización bioquímica de los microorganismos aislados..... | 9 |
|---|---|

| | |
|---|----|
| 3.3 Identificación de los géneros <i>Pseudomonas</i> y <i>Azospirillum</i> de los aislados bacterianos..... | 10 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| 3.4. Identificación de los efectos producidos por los microorganismos aislados en caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)..... | 11 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| 3.5 Comparación del efecto de la biofertilización con microorganismos benéficos en el crecimiento de caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>) utilizando tanto sustrato comercial como suelo de campos cañeros del ejido Xicoténcatl en condiciones de invernadero..... | 14 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| 3.5.1 Efecto de promoción de crecimiento de los tratamientos con microorganismos aislados, comparando el peso fresco de la parte aérea y raíz en dos tipos de sustrato..... | 15 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| 3.5.2 Microorganismos que lograron los mejores rendimientos en las tres variedades de caña de azúcar cuando se comparan los pesos frescos totales (parte foliar y raíz) en ambos sustratos..... | 19 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| 3.6 Efecto de los aislados (con mejores rendimientos en caña de azúcar) en plantas de maíz y jitomate..... | 20 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| 3.7 Tipificación de los microorganismos aislados de caña de azúcar mediante técnicas moleculares..... | 24 |
| 3.8 Efecto de los microorganismos aislados de caña de azúcar en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 25 |
| IV.DISCUSIÓN | 28 |
| V.REFERENCIAS | 34 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Tipificación molecular de los microorganismos aislados..... | 24 |
|---|----|

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Caracterización de microorganismos aislados a partir de raíces de caña de azúcar..... | 8 |
| Figura 2. Identificación de cepas fosfodisolventes y fijadoras de nitrógeno..... | 9 |
| Figura 3. Cepa bacteriana <i>Pseudomonas fluorescens</i> y cepa del género <i>Azospirillum</i> | 11 |
| Figura 4. Peso fresco total de plantas de caña de tres meses de edad inoculadas con cepas fúngicas y sin inocular..... | 12 |
| Figura 5. Peso fresco de plantas de caña de tres meses de edad inoculadas con cepas bacterianas y sin inocular..... | 13 |
| Figura 6. Peso fresco de plantas de caña de la variedad 1743 inoculadas con los mejores tratamientos bacterianos y plantas control sin inocular, en sustrato comercial y tierra de campo..... | 16 |
| Figura 7. Peso fresco de plantas de caña de la variedad 2086 inoculadas con los mejores tratamientos bacterianos y plantas control sin inocular, en sustrato comercial y tierra de campo..... | 17 |
| Figura 8. Peso fresco de plantas de caña de la variedad 310 inoculadas con los mejores tratamientos bacterianos y plantas control sin inocular, en sustrato comercial y tierra de campo..... | 19 |
| Figura 9. Comparación del efecto en la velocidad de germinación de semillas de maíz y jitomate al ser inoculadas con microorganismos aislados de caña de azúcar..... | 21 |
| Figura 10. Comparación del efecto de la aplicación de los microorganismos ²³ , M2B4, M1B36, 66 y M2b14 en el peso a nivel foliar y raíz, así como los pesos frescos totales (parte foliar y raíz) en plantas de maíz..... | 22 |
| Figura 11. Comparación del efecto de la aplicación de los microorganismos ²³ , M2B4, M1B36, 66 y M2b14 en el peso a nivel foliar y raíz, así como los pesos frescos totales (parte foliar y raíz) en plantas de jitomate..... | 23 |
| Figura 12. Interacción de <i>A. thaliana</i> con cepas fúngicas aisladas de caña de azúcar..... | 26 |

RESUMEN

“Identificación y caracterización de microorganismos benéficos aislados de caña de azúcar de la Huasteca Potosina y Tamaulipeca para el desarrollo de biofertilizantes”

En los últimos 50 años se ha reportado que diferentes especies de microorganismos aislados de la rizósfera, al ser reintroducidos en campo pueden producir un efecto benéfico de promoción de crecimiento tanto en las plantas de las que fueron aisladas. En general, los microorganismos benéficos para la agricultura, se clasifican en aquellos que promueven el crecimiento vegetal y los que actúan como agentes de biocontrol. Además, ayudan a mejorar la calidad del suelo, lo que conlleva a un mayor rendimiento en la producción, protección de los cultivos, conservando los recursos naturales y creando así una agricultura y medio ambiente sostenibles. En este estudio se realizó el aislamiento de microorganismos nativos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) de la Huasteca Potosina y Tamaulipeca, con el fin de obtener microorganismos benéficos que promuevan el crecimiento vegetal para el desarrollo de biofertilizantes. Se identificaron 23 cepas de microorganismos con potencial de promoción de crecimiento en caña de azúcar, de los cuales las cepas bacterianas M2B4, 66 y M2B14 promueven también el crecimiento de plantas de maíz (*Zea mays*), y las cepas bacterianas 23, 66 y M1B36 promueven el crecimiento de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum*). Así mismo se comparó el efecto de promoción de crecimiento de las cepas bacterianas M2B4, 66, M2B14, M1B30, 23 y M1B36, al ser aplicadas en las variedades de caña 310, 1743 y 2086, en dos tipos de sustratos. Se observó que la variedad 310 al ser inoculada con la cepa M1B30 logra mayor rendimiento en un sustrato pobre en nutrientes, corroborando así que la interacción benéfica entre el microorganismo y la planta depende del tipo de suelo en el que crecen, así como del genotipo de la planta

PALABRAS CLAVE: microorganismos benéficos, caña de azúcar, promoción de crecimiento.

Abstract

Identification and characterization of beneficial microorganisms isolated from Huasteca sugarcane for the development of biofertilizers

In the last 50 years old it has been reported that numerous species of microorganisms that have been isolated from the rhizosphere can act beneficially promoting growth when they are reintroduced to fields or used in greenhouses. In general the beneficial microorganisms are classified in two broad groups based on their primary effects: a) microorganisms that promote plant growth and b) microorganisms that act as biological control agents. This work present a isolation of microorganism of sugarcane (*Saccharum officinarum*) from the state of San Luis Potosi and Tamaulipas, in order to obtain beneficial microorganisms that encourage plant growth for the development of biofertilizers. We identified 23 strains of microorganisms that potentiate the growth in sugarcane, where the bacterial strains M2B4, 66 and M2B14 also promote plant growth in maize (*Zea mays*). On the other hand, tomato plants (*Solanum lycopersicum*), decrease their growth with the bacterial strains M2B4 and M2B14, since with the bacterial strains 23, 66 and M1B36 their growth was increased. Our results suggest that the native microorganisms isolated from sugar cane have a better interaction with plants from *gramineae* family. On the other hand, because it is known that beneficial interactions between microorganisms and plants is influenced for the soil type in which they grow, and the genotype of the plant, we compared the promoting effect in growth in three sugarcane varieties 310, 1743 and 2086. Yield was determined by the total weight of the plant (leaf and root), in two substrates, in a commercial that is a rich soil in nutrients and in sugarcane fields. It was observed that the variety 310 when was inoculated with bacterial strain M1B30 achieves higher performance on field soil. This confirms that the growth of the plants is influences not only bye the type of soil, if no also by the genotype of the plant.

KEYWORDS: beneficial microorganisms, sugarcane, promotion of growth.

I. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se ha reportado que numerosas especies de microorganismos que han sido aislados de la rizósfera de diversos cultivos actúan de forma benéfica al ser reintroducidos al campo o aplicados en los invernaderos. Dichos microorganismos se han clasificado de acuerdo al efecto benéfico que ejercen al establecerse en asociación con la planta huésped: a) microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas (Plant Growth Promoting Microorganism o PGPM), los que ayudan a proveer de nutrientes a la planta huésped, así mismo pueden influir positivamente en la morfología y crecimiento de la raíz, o estableciendo relaciones simbióticas que favorezcan a la planta (Vessey *et al.*, 2003, Avis *et al.*, 2008), y b) los agentes de control biológico (Biological Control Agents ó BCA), que indirectamente ayudan a la productividad de la planta a través del control de microorganismos fitopatógenos, además de reducir la población de patógenos resistentes a fungicidas (Shen *et al.*, 2002, Avis *et al.*, 2008, , Sang *et al.*, 2008).

Entre las bacterias benéficas se encuentran *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* las cuales solubilizan fósforo orgánico (Richardson *et al.*, 2001, Mehnaz *et al.*, 2006), *Rhizobium* spp., que produce reguladores de crecimiento vegetales, solubiliza fosfato orgánico e inorgánico (Antoun *et al.*, 1998), produce antibióticos y actúa competitivamente con otros microorganismos (Siddiqui *et al.*, 1998, Huang *et al.*, 2007). En el caso de los hongos, se ha reportado que *Glomus* spp., produce fitoalexinas (compuestos antimicrobianos) y enzimas asociadas a los mecanismos de defensa de las plantas, además de formar barreras estructurales (Whipps *et al.*, 2004). Otro hongo es *Trichoderma* spp., que debido a sus multifacéticos mecanismos de acción (parasitismo, competencia, antibiosis, entre otros), actúa directamente en el crecimiento y productividad de las plantas. Este hongo presenta la capacidad de solubilizar y mejorar la absorción de macro y micronutrientes, produce compuestos biológicamente activos como enzimas degradadoras de la pared celular, metabolitos secundarios y sustancias antibióticas para la resistencia a microorganismos patógenos (Benítez *et al.*, 2004; Avis *et al.*, 2008; Vinale *et al.*, 2008, Singh *et al.*, 2010).

1.1 Microorganismos benéficos en caña de azúcar

A nivel agronómico la importancia de la aplicación de microorganismos benéficos es muy importante ya que la asociación microorganismo – planta en la rizósfera, crea una protección contra microorganismos patógenos y permite que la planta tenga una mejor nutrición (Harman *et al.*, 2004). Uno de los cultivos en los que se han aplicado estos microorganismos es el de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), debido a que es uno de los cultivos agroindustriales más importantes en las regiones tropicales, subtropicales y de climas húmedos, de donde se obtiene preferentemente azúcar. Además puede ser utilizada como fuente de materias primas para una amplia gama de derivados (abono orgánico, alcohol, biocombustible y papel), algunos de los cuales constituyen alternativas de sustitución de otros productos con impacto ecológico

En caña de azúcar diferentes cepas de *Trichoderma* spp. han sido utilizadas como agentes de control biológico principalmente contra la pudrición roja o red rot (Harman *et al.*, 2006, Singh *et al.*, 2008), ya que presenta acción parasitaria directa contra *Colletotrichum falcatum* (Srivastava *et al.*, 2008). Por otro lado, cepas de *Trichoderma* spp. facilitan la absorción de nutrientes dando lugar a un aumento en el crecimiento de la planta (Srivastava *et al.*, 2008, Shukla *et al.*, 2008, Yadav *et al.*, 2008). En cultivos de caña de azúcar en la India se demostró que la aplicación de una mezcla de cepas de *Trichoderma viride*, *Gluconacetobacter* y abono orgánico mejoran la calidad del suelo, debido al aumento de carbono orgánico, de nutrientes disponibles y el aumento de poblaciones bacterianas nitrificantes (Singh *et al.*, 2008). Otro microorganismo que se aplica a caña de azúcar es *Gluconacetobacter diazotrophicus* ya que es una bacteria fijadora de nitrógeno aún en presencia de nitratos, además de que se adapta fácilmente a la rizósfera de la caña (Srivastava *et al.*, 2008).

Diversos estudios han establecido que cepas de *Pseudomonas fluorescens* tanto en condiciones *in vitro* como en campo, producen metabolitos secundarios con actividad antibiótica, así como sideróforos los cuales están involucrados en la asimilación de nutrientes, y se cree están involucrados en la activación de la respuesta sistémica de la planta (Samiyappan *et al.*, 2007).

1.2 Microorganismos benéficos en diversos cultivos

Además del cultivo de caña de azúcar, se están utilizando microorganismos benéficos en otros cultivos de importancia mundial como el maíz (*Zea mays*) y el jitomate (*Solanum lycopersicum*) (Alfonso *et al* 2005, Jaime-Vega *et al.*, 2008). Entre los microorganismos que se han aplicado a estos cultivos encontramos al hongo *Trichoderma spp.*, el cual además de promover la germinación, actúa en la primera fase del desarrollo de la planta como un biocontrolador (Harman *et al.*, 2004, Avis *et al.*, 2008). Otras bacterias benéficas que se aplican a estos cultivos son *Azotobacter spp.* y *Azospirillum spp.*, que se sabe que producen o metabolizan fitohormonas como lo es el ácido indol acético, citocininas, giberelinas, etileno y otras moléculas como el ácido abscísico, las cuales regulan diversos procesos en el desarrollo y crecimiento de las plantas, como es la división y diferenciación celular, la germinación, la elongación, la floración, la fructificación, así mismo algunos de estos compuestos se relacionan con la capacidad de las plantas a adaptarse a ciertas condiciones de estrés (Cassan *et al.*, 2008).

El objetivo de esta tesis fue aislar microorganismos nativos del cultivo de caña de azúcar que actúen de forma benéfica para el desarrollo de biofertilizantes. Por tal motivo se obtuvieron muestras de cañas de la huasteca Potosina y Tamaulipeca, dos de las regiones de mayor producción de caña de azúcar en México. Donde aislados fúngicos y bacterianos fueron obtenidos de las raíces de plantas de caña de azúcar, siendo algunos identificados como cepas pertenecientes a los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Bacillus*, y a los géneros fúngicos *Trichoderma* y *Nigrospora*. En este trabajo se describe como se realizó el aislamiento, caracterización, y el efecto de promoción de crecimiento observado en plantas de caña de azúcar, maíz, jitomate y *Arabidopsis thaliana*, al ser tratadas con estos microorganismos. Así mismo se comprobó que el rendimiento máximo de los cultivos se ve influenciado por la interacción genotipo – sustrato

II.MATERIALES Y METODOS

2.1 Aislamiento de microorganismos de raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

Se realizaron tres colectas (2008, 2009 y 2010) de plantas de caña de azúcar de diferentes tipos de suelo, con diferente grado de fertilidad, ubicados tanto en la huasteca Potosina como en la Tamaulipeca. Las plantas tenían tres meses de edad y las variedades recolectadas fueron CP72-2086, Zmex55-32, Mex68-P-23, Mex 79-431, RD7511, CP822086 y CP702082. Para el aislamiento de las cepas se utilizaron raíces de las plantas de caña de azúcar, estas fueron esterilizadas por inmersión en una solución de etanol al 95% (v/v) durante 1 min y luego lavadas 10 veces con agua destilada estéril durante 10 min para eliminar el exceso de tierra presente en las raíces. Posteriormente fragmentos de raíces de caña fueron sembrados en cajas de Petri que contenían medios ricos tanto para bacterias como para hongos, Luria Bertani (LB) y Agar Papa Dextrosa (PDA), respectivamente (Yoav Bashan *et al.*, 1995). Se monitorio el crecimiento de hongos y bacterias cada 24 h, para realizar el aislamiento individual de cada microorganismo.

2.2 Caracterización bioquímica de algunos microorganismos aislados

Para la caracterización bioquímica se utilizó un conjunto de medios que previamente han sido reportados para caracterizar cepas fosfodisolventes y fijadoras de nitrógeno, estos fueron Medio mínimo de hidroxapatita (MMHA) y medio NFb (Peña *et al.*, 2007).

2.3 Identificación de los géneros *Pseudomonas* y *Azospirillum* de los aislados bacterianos con capacidad fosfodisolvente.

Para la caracterización del género bacteriano *Azospirillum* se utilizó el medio NFb (Yoav Bashan *et al.*, 1995), en el caso del género bacteriano *Pseudomonas* el medio agar tripticasa de soya (TSA) y para las especies de *P. putida* y *P. fluorescens* se utilizó el medio S18 (Peña *et al.*, 2007).

2.4 Inoculación de caña de azúcar, maíz y jitomate.

A fin de establecer el potencial de los microorganismos aislados como promotores de crecimiento se llevaron a cabo ensayos de promoción de crecimiento *in vitro* y en invernadero. Para esto, se llevó a cabo la producción de inóculos de cada cepa bacteriana y fúngica. En el caso de los inóculos bacterianos se partió de pre-inóculos crecidos toda la noche, en medio LB hasta obtener una concentración de 1×10^8 cel/mL. Posteriormente se llevó a cabo la inoculación tanto de esquejes y plántulas de caña de azúcar, como de semillas de maíz y jitomate. En el caso de los inóculos fúngicos aplicados a caña de azúcar, se tomó un disco de 2 cm de diámetro del hongo crecido en medio PDA, el cual fue aplicado sobre la yema central del esqueje. En el caso de caña de azúcar se evaluaron 25 cepas fúngicas, y 47 bacterianas como inóculos. El experimento se realizó por duplicado con tres plantas, a los 45 días de tratamiento se evaluó el peso fresco de la raíz, foliar y el peso total de la planta. En el caso de las semillas de maíz y jitomate, se evaluaron cinco cepas aisladas de raíces de caña de azúcar, el ensayo *in vitro* se realizó por triplicado con cinco semillas, observándose el porcentaje de germinación hasta los cinco días posterior a la siembra. Por otro lado el ensayo de invernadero se realizó con 15 réplicas, la cosecha de estas plantas se llevó a cabo después de 30 días de tratamiento y se evaluó el peso fresco de raíz y de la parte aérea.

2.5 Tipificación de los microorganismos probados mediante técnicas moleculares

Con base en los resultados obtenidos en los ensayos de invernadero, se seleccionaron las cepas que mostraron mejores resultados y se llevó a cabo su identificación por medio de ITS (internal transcribed spacer). Para esto se amplificaron las regiones intergénicas (ITS) del ADN ribosomal, 16S en bacterias y 18S en hongos, ya que estas regiones varían entre género y especie. En el caso de las cepas fúngicas, la extracción del DNA genómico se llevó a cabo por el método ya descrito por Raeder y Broda (1985). En el caso de las cepas bacterianas se utilizó la técnica de PCR de colonia. Posteriormente se amplificaron los ITS mediante PCR, para los hongos se

utilizaron los oligonucleótidos ITS-4 Fw 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' y el ITS-5 Rv 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' (White *et al.*, 1990), ya que generan un fragmento de 500 pb que abarca la región ITS-1 e ITS-2 y el gen 5.8S del rDNA. Para las bacterianas se utilizaron los oligonucleótidos 63F Fw 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'; 1387R Rv 5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3' (Marchesi *et al.*, 1998), ITN1 Fw 5'-GCCGCGTGAGTGATGAAGG-3' ITN2 Rv 5'-CCCACGCTTTCGCGCCTC-3', e ITN3 Rv 5'-CCATTGTAGCACGTGTGTAGC-3'. La reacción fue realizada en un volumen total de 50 µL que contenía aproximadamente 50 ng de DNA genómico, 1 µL de cada oligonucleótido de concentración igual a 10 pmol/µL, cloruro de magnesio 2mM, 1 µL de cada deoxinucleósido trifosfato (dNTPs) 200 µM, 1.5 U (0.03 µL) de la enzima *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La reacción fue sometida a una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 60 °C, y 1.5 min a 72 °C, con una extensión final de 8 min a 72 °C en un termociclador marca Bio-Rad. La enzima *Taq* DNA polimerasa utilizada, presenta actividad transferasa terminal, actividad que le permite añadir una desoxiadenosina (A) en el extremo 3' terminal a los productos de PCR, esto permitió la clonación en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. La secuenciación de cada fragmento se llevó a cabo en un secuenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystem) y el análisis *in silico* se llevó a cabo usando herramientas bioinformáticas del NCBI BLASTN.

2.6 Interacción de hongos aislados de caña de azúcar con *Arabidopsis thaliana*

Con la finalidad de observar el efecto que presentan las cepas fúngicas aisladas de caña de azúcar en el desarrollo de *A. thaliana*, se llevó a cabo la producción de inóculos. Para la producción de los inóculos, se realizaron cultivos de las cepas fúngicas en medio rico PDA, una vez que el hongo estuvo completamente desarrollado se tomó un disco de 2 cm de diámetro del hongo y fueron colocados en cajas de Petri con medio MS 2X, en las cuales se

transfirieron plántulas de tres semanas de edad a cinco cm de distancia del hongo. El experimento se realizó por duplicado con cinco plántulas cada uno.

III.RESULTADOS

3.1 Aislamiento de microorganismos de la rizósfera de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

Con el objetivo de aislar e identificar microorganismos de la rizósfera se realizó un muestreo de cañas de azúcar en las regiones “El Naranjo” San Luis Potosí y “Xicoténcatl Gómez Farías” Tamaulipas. Los aislados se obtuvieron de plantas de tres meses de edad, y pertenecientes a las variedades CP72-2086, Zmex55-32, Mex68-P-23, Mex 79-431, RD7511, CP822086 y CP702082. Se obtuvo un total de 123 cepas, de las cuales 59 fueron bacterianas y 64 fúngicas (Fig. 1A).

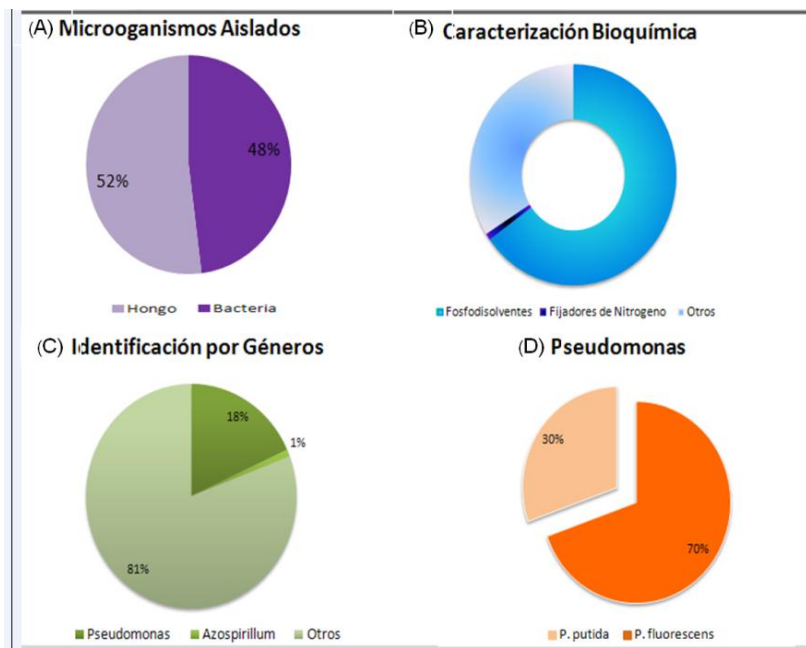


Figura 1. Caracterización de microorganismos aislados a partir de raíces de caña de azúcar. A) Porcentaje de poblaciones bacterianas y fúngicas obtenidas en los medios de crecimiento PDA y LB. B) Patrón de identificación de pruebas bioquímicas MMHA y NFb para los microorganismos solubilizadores de fósforo y fijadores de nitrógeno C) Porcentaje de géneros identificados por pruebas bioquímicas TSA Y NFb. D) Porcentaje de cepas identificadas del género *Pseudomonas*, con el medio S1⁸.

3.2 Caracterización bioquímica de los microorganismos aislados.

El siguiente paso fue analizar si los aislados obtenidos presentaban características bioquímicas para solubilizar fósforo y fijar nitrógeno, por lo que las 123 cepas obtenidas en el asilamiento fueron crecidas en el medio mínimo de hidroxapatita (MMHA) y medio NFb, ya que previamente han sido utilizados para caracterizar cepas fosfodisolventes y fijadoras de nitrógeno (Peña *et al.*, 2007). En el medio MMHA se seleccionaron las cepas que formaron un halo transparente alrededor de la colonia, ya que esto indica que el microorganismo presenta la capacidad de solubilizar fósforo del medio, en donde obtuvimos que el 32.8% de las cepas bacterias y el 32.2% de las cepas fúngicas son fosfodisolventes. Por otro lado, en el medio NFb se seleccionaron aquellas que formaron una biopelícula blanquecina superficial típica del crecimiento de los microorganismos microaerófilos, capaces de fijar nitrógeno, de la cual se obtuvo una cepa bacteriana (A26) que representa el 0.8% de las cepas caracterizadas (Fig. 1B). En la Figura 2 se muestra un ejemplo de la formación del halo transparente al solubilizar el fósforo del medio, así como el crecimiento de la cepa fijadora de nitrógeno A26.

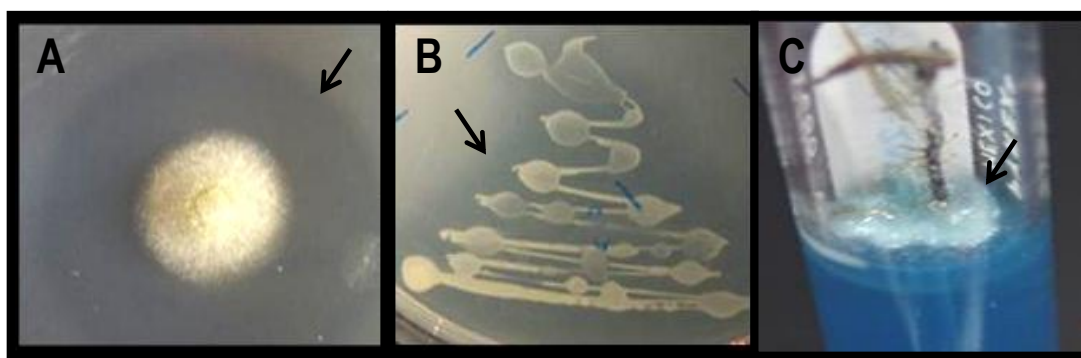


Figura 2. Identificación de cepas fosfodisolventes y fijadoras de nitrógeno. Para identificar a las cepas fosfodisolventes se utilizó la prueba bioquímica MMHA, en donde se observó la formación de un halo transparente alrededor del crecimiento, demostrando así la solubilización del fósforo presente en el medio. A) Se observó un halo alrededor del crecimiento de la cepa M1H1, cuando esta cumplió 8 días de crecimiento. B) La capacidad fosfodisolvente de la cepa bacteriana M4B8 se observó a las 24 h del crecimiento bacteriano. C) Se observó el crecimiento de la cepa A26 en el

medio NFb, la cual por su capacidad fijadora de nitrógeno es capaz de formar una biopelícula blanquecina en la superficie del medio.

3.3 Identificación de los géneros *Pseudomonas* y *Azospirillum* de los aislados bacterianos

Se ha reportado que el género bacteriano *Pseudomonas* presenta la capacidad de solubilizar fósforo de fuentes insolubles de este mineral en el suelo, por lo cual se considera que estas bacterias actúan de forma benéfica en las plantas ya que al proporcionar fósforo promueven el crecimiento vegetal. Así mismo se consideran como microorganismos benéficos a los pertenecientes al género *Azospirillum* ya que de igual manera que las *Pseudomonas* promueven el crecimiento vegetal al fijar nitrógeno en condiciones de vida libre, o por el incremento de la actividad nitrato reductasa en condiciones endofíticas (Cassan *et al.*, 2003, Avis *et al.*, 2008). Uno de los principales mecanismos que explican el efecto de promoción de crecimiento es la capacidad de producir reguladores de crecimiento vegetal (Cassan *et al.*, 2003). Por tal motivo la identificación de estos géneros bacterianos se llevó a cabo al crecer las 59 cepas bacterianas, teniendo mayor interés en aquellas cepas que previamente se identificaron como fosfodisolventes y fijadoras de nitrógeno. Los medios utilizados fueron medios de crecimiento específicos para el crecimiento de bacterias de los géneros *Azospirillum* y *Pseudomonas*, medio NFb y TSA respectivamente. En el caso particular de las especies *P. putida* y *P. fluorescens* se utilizó el medio S1⁸.

En la identificación del género *Pseudomonas* y *Azospirillum* se obtuvo que de los 59 microorganismos aislados el 18% pertenecen al género *Pseudomonas*, y el 0.8% al género *Azospirillum* y el 81.2% de los microorganismos restantes no identificados mediante las pruebas bioquímicas realizadas (Fig. 1C). Se identificó que de las cepas bacterianas que pertenecen al género *Pseudomonas*, el 82.6% pudo crecer en condiciones limitadas de fósforo, y de ese 82.6% solo el 34.7% fueron capaces de solubilizar el fósforo presente en el medio. Del número total de *Pseudomonas* obtenidas se realizó la identificación de especies y se encontró que el 70% de las cepas obtenidas

pertenecen a la especie *P. fluorescens* y el otro 30% a *P. putida* (Fig.1D). Por otro lado, se observó que la cepa de *Azospirillum spp.*, aislada en este trabajo fue capaz tanto de crecer en condiciones limitadas de fósforo como de solubilizarlo. En la Figura 3 se muestra el crecimiento de las bacterias *P. fluorescens* y *Azospirillum spp.*

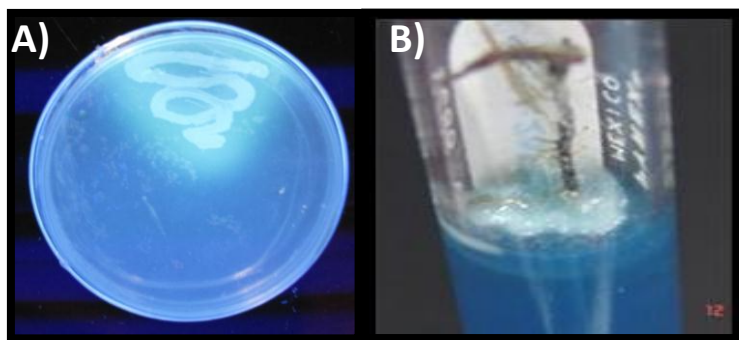


Figura 3. Cepa bacteriana *Pseudomonas fluorescens* y cepa del género *Azospirillum*. A) Crecimiento de la cepa bacteriana M1B29 (*P. fluorescens*), que produjo un sideróforo fluorescente de color amarillo verdoso llamado pioverdina, el cual fluoresce bajo la luz ultravioleta. B) Crecimiento de la cepa bacteriana A26 (*Azospirillum sp*), su crecimiento formó una capa blanquecina de tipo algodonosa.

3.4 Identificación de los efectos producidos por los microorganismos aislados en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*).

Con la finalidad de evaluar el efecto de los microorganismos aislados en la caña de azúcar, que presentaron capacidad de solubilizar fósforo, se realizó un experimento en invernadero utilizando esquejes de caña de azúcar, donde se evaluaron 25 cepas fúngicas y 47 bacterianas. En el caso de las cepas bacterianas se utilizó una concentración de 1×10^8 cel/mL de inóculo sobre la yema central del esqueje, y finalmente se cubrieron con 5 cm de suelo. En el caso de las cepas fúngicas se tomó un disco de 2 cm de diámetro del hongo crecido en medio rico PDA, posteriormente cada disco fue aplicado como inóculo sobre la yema central del esqueje y finalmente se cubrieron con 5 cm

de suelo. El experimento se realizó utilizando tres plantas por tratamiento y la cosecha de estas plantas se llevó a cabo después de 3 meses de edad donde se obtuvo el peso fresco tanto de raíz como de parte aérea. Adicionalmente se repitió el experimento en las mismas condiciones, logrando resultados similares (datos no mostrados).

Como resultado observamos que de los 25 tratamientos fúngicos aplicados, 10 incrementaron el peso fresco total (parte foliar y raíz), sin embargo solo siete mostraron diferencias significativas con respecto al control. Cuando utilizamos la cepa H23 observamos un incremento en el peso total de la planta de tres veces (85.52 ± 1.12 g), con respecto al control (18.14 ± 3.55 g), mientras que el tratamiento M3H24 incrementó el peso total de la planta al doble (41.69 ± 4.41 g) con respecto al control (18.14 ± 3.55 g). En la Figura 4, se muestran los pesos frescos (parte foliar y raíz) obtenidos en los 10 tratamientos, así como las diferencias observadas entre los tratamientos con base a la prueba estadística ANOVA de una vía y LSD.

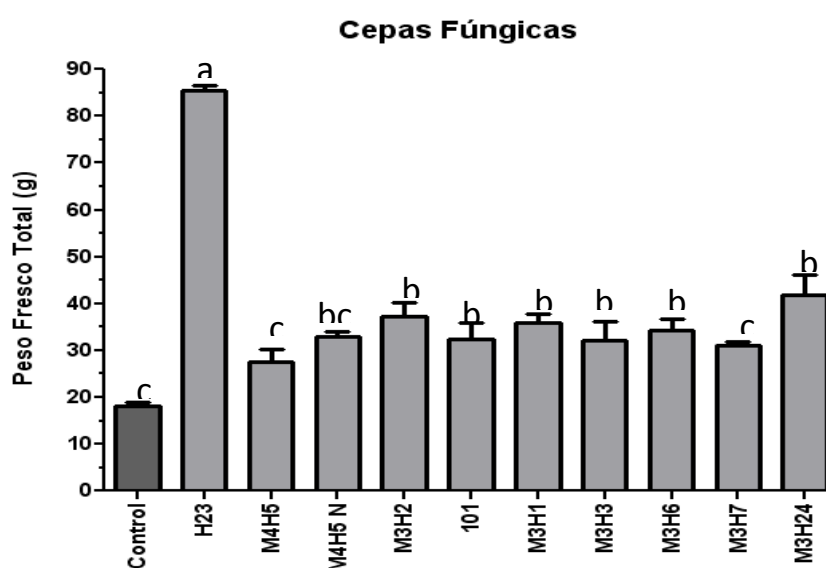


Figura 4. Peso fresco total de plantas de caña de tres meses de edad inoculadas con cepas fúngicas y sin inocular. Las barras representan el promedio de los datos \pm EE; las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y LSD ($p=0.001$).

Por otro lado al analizar los resultados obtenidos de las 47 cepas bacterianas, se observó que 13 de los 47 aislados aplicados a los esquejes de caña incrementaron el peso fresco total de la planta con respecto al control. Cabe señalar que el tratamiento con la cepa M1B30 fue el único que mostró diferencias significativas con respecto al control, incrementando casi al doble (47.24 ± 2.94 g), el peso de las plantas en comparación a las plantas control (27.57 ± 2.35 g). En la Figura 5, se observan los pesos frescos obtenidos en los 13 tratamientos bacterianos, así como el análisis estadístico ANOVA de una vía y LSD.

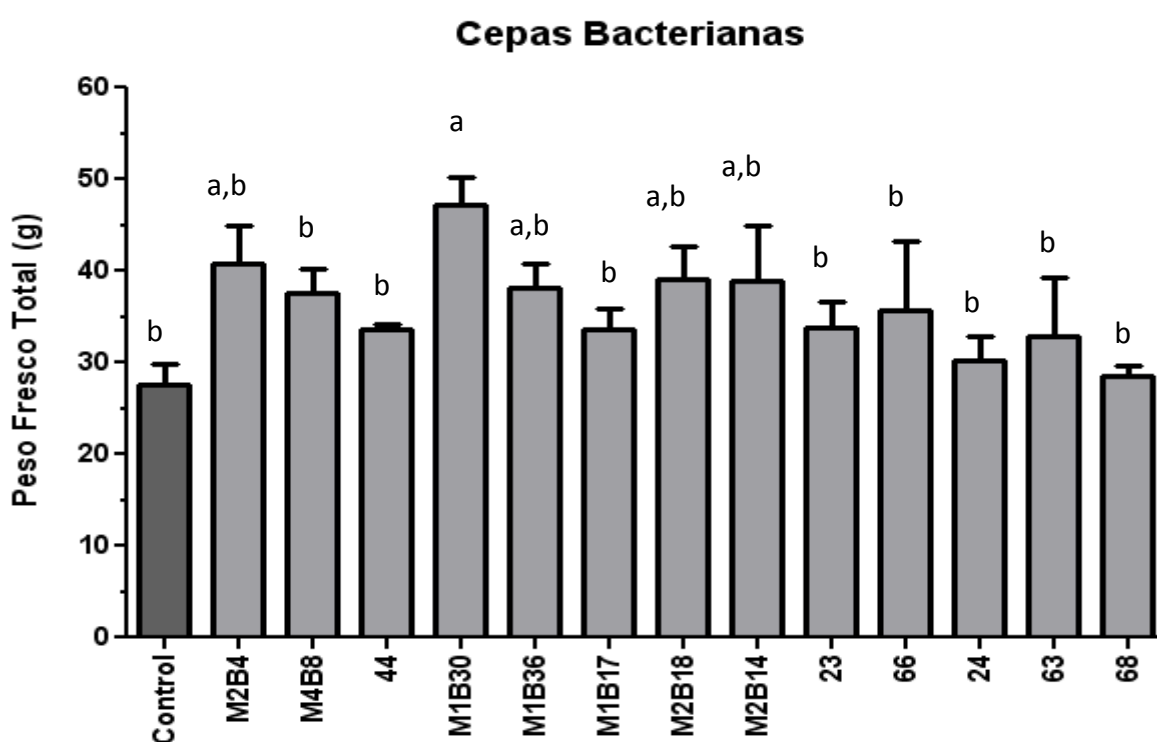


Figura 5. Peso fresco de plantas de caña de tres meses de edad inoculadas con cepas bacterianas y sin inocular. Las barras representan el promedio de los datos \pm EE; las letras indican diferencias significativas entre los tratamientos. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y LSD ($p=0.001$).

Los resultados sugieren que tanto las cepas fúngicas como bacterianas aisladas de la caña de azúcar tienen potencial como promotoras de crecimiento.

3.5 Comparación del efecto de la biofertilización con microorganismos benéficos en el crecimiento de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) utilizando tanto sustrato comercial como suelo de campos cañeros del ejido Xicoténcatl en condiciones de invernadero.

Con la finalidad de evaluar si el efecto de promoción de crecimiento causado por microorganismos y observado en la caña de azúcar variedad ZMex 55-32 (variedad proveniente del ejido “El Naranja”, SLP), depende del tipo de sustrato y de la variedad de la caña de azúcar, se llevó a cabo un ensayo de invernadero, donde se comparó el efecto de promoción de crecimiento obtenido en un sustrato rico en nutrientes y en suelo de campos cañeros, así como el efecto en tres variedades de caña de azúcar. Cabe señalar que el cultivo de caña de azúcar presenta algunos problemas como lo es la quema del cultivo para poder cosechar, el que no hay rotación de suelo, además el suelo generalmente es apelmazado y rico en sales, entre otros; por lo cual nuestros ensayos con tierra de cultivo de caña, es clave para la obtención de rendimientos reales, que son incrementados cuando se utiliza un suelo rico en nutrientes (sustrato comercial) ya que en este se encuentran más biodisponibles los nutrientes por lo que las cepas benéficas no estarían cumpliendo una misión importante. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de invernadero utilizando tres variedades de caña de azúcar (1753, 2086 y 310) procedentes del ejido Xicoténcatl Tamaulipas, donde se comparó el efecto de promoción de crecimiento cuando la caña es sembrada en un sustrato rico en nutrientes, a cuando se siembra en el suelo que utilizan los cañeros, el cual es una tierra pobre. El ensayo se realizó durante 45 días utilizando tres esquejes para cada tratamiento, con Sunshine Mix No.3 como sustrato comercial, mientras que como suelo de campo se utilizó tierra de campos cañeros proveniente del ejido de Xicoténcatl, Tamaulipas. Los resultados se clasificaron en dos: 1) efecto de promoción de crecimiento de los tratamientos con

microorganismos aislados, comparando el peso fresco de la parte aérea y raíz en los dos tipos de sustrato, 2) microorganismos que lograron los mejores rendimientos en las tres variedades de caña de azúcar cuando se comparan los pesos frescos totales (parte foliar y raíz) en ambos sustratos.

3.5.1 Efecto de promoción de crecimiento de los tratamientos con microorganismos aislados, comparando el peso fresco de la parte aérea y raíz en los dos tipos de sustrato

Se observó que en la variedad 1743 a nivel de raíz, foliar y peso total (parte foliar y raíz), los rendimientos en el sustrato comercial son mayores que en la tierra de campo. Sin embargo, en el sustrato comercial solo a nivel de raíz se observaron diferencias significativas entre el tratamiento con la cepa M2B4 (59.44 ± 15.95 g), con respecto al control (36.21 ± 2.25 g), al incrementar el peso del control (Fig. 6A). Así mismo, en la tierra de campo se observaron diferencias entre los tratamientos bacterianos M2B14 (32.29 ± 2.04 g), y 23 (25.66 ± 5.65 g), con respecto al control (23.42 ± 2.16 g). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos bacterianos M2B14 (32.29 ± 2.04 g), y 23 (25.66 ± 5.65 g), ya que ambos promovieron el mismo crecimiento (Fig. 6B). Cabe mencionar que en ambos sustratos a nivel de peso total (parte foliar y raíz), no se observaron diferencias significativas (Fig. 6C). Los datos fueron analizados con la prueba LSD ($p=0.001$).

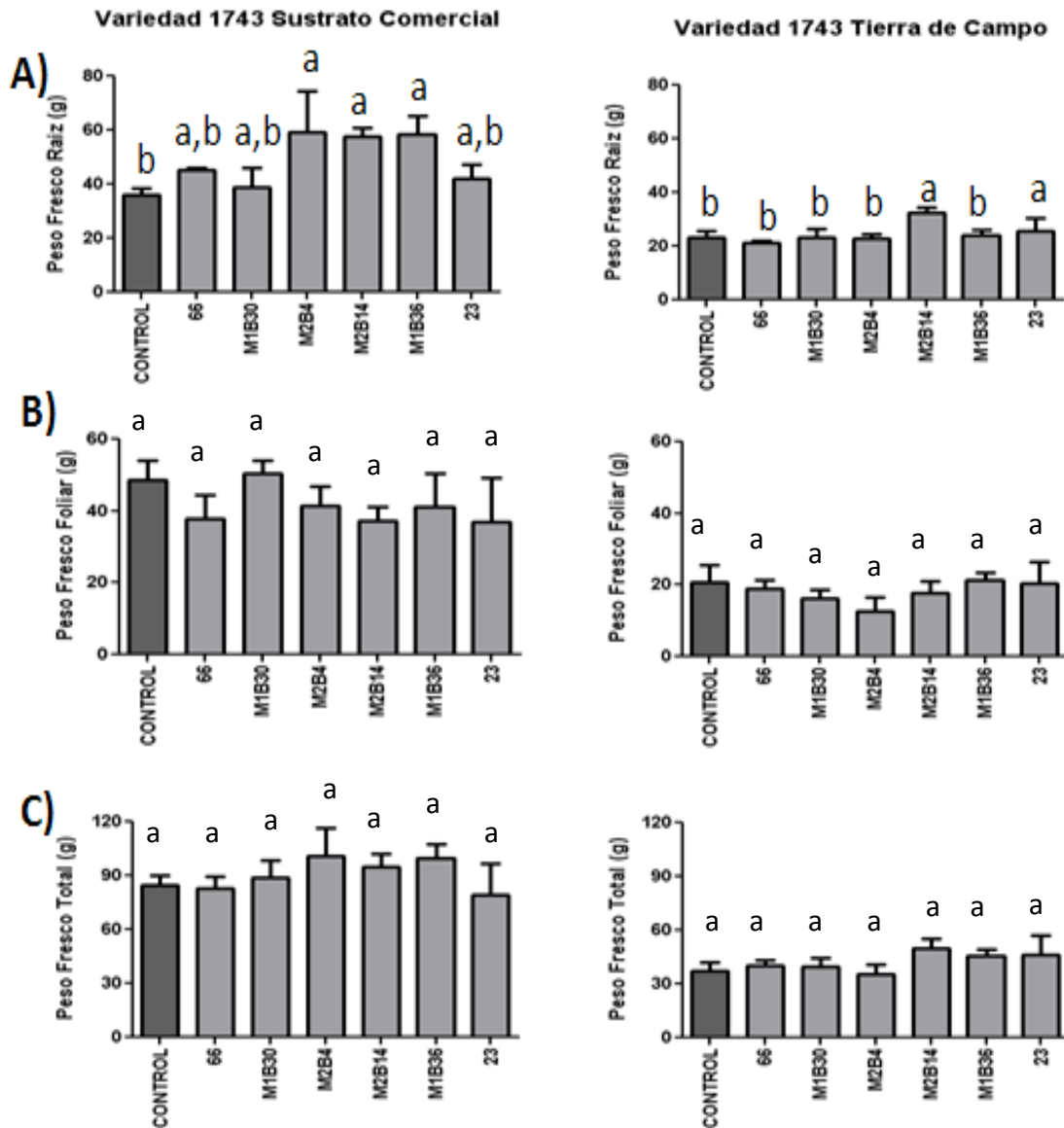


Figura 6. Peso fresco de plantas de caña de la variedad 1743 inoculadas con los mejores tratamientos bacterianos y plantas control sin inocular, en sustrato comercial y tierra de campo. Las barras representan el promedio de los datos \pm EE; y las letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y LSD ($p=0.001$).

Por otro lado, en la variedad 2086 a nivel de raíz se observa en el sustrato comercial los mejores tratamientos fueron M1B36, M2B14 y M2B4. A nivel de área foliar observamos que el tratamiento con la bacteria M2B4 y M1B36 fueron los mejores en el sustrato comercial y la tierra de campo,

respectivamente. En el peso total de la planta se observó que solo a nivel comercial hubo cuatro tratamientos con diferencias significativas con respecto al control sin inocular.

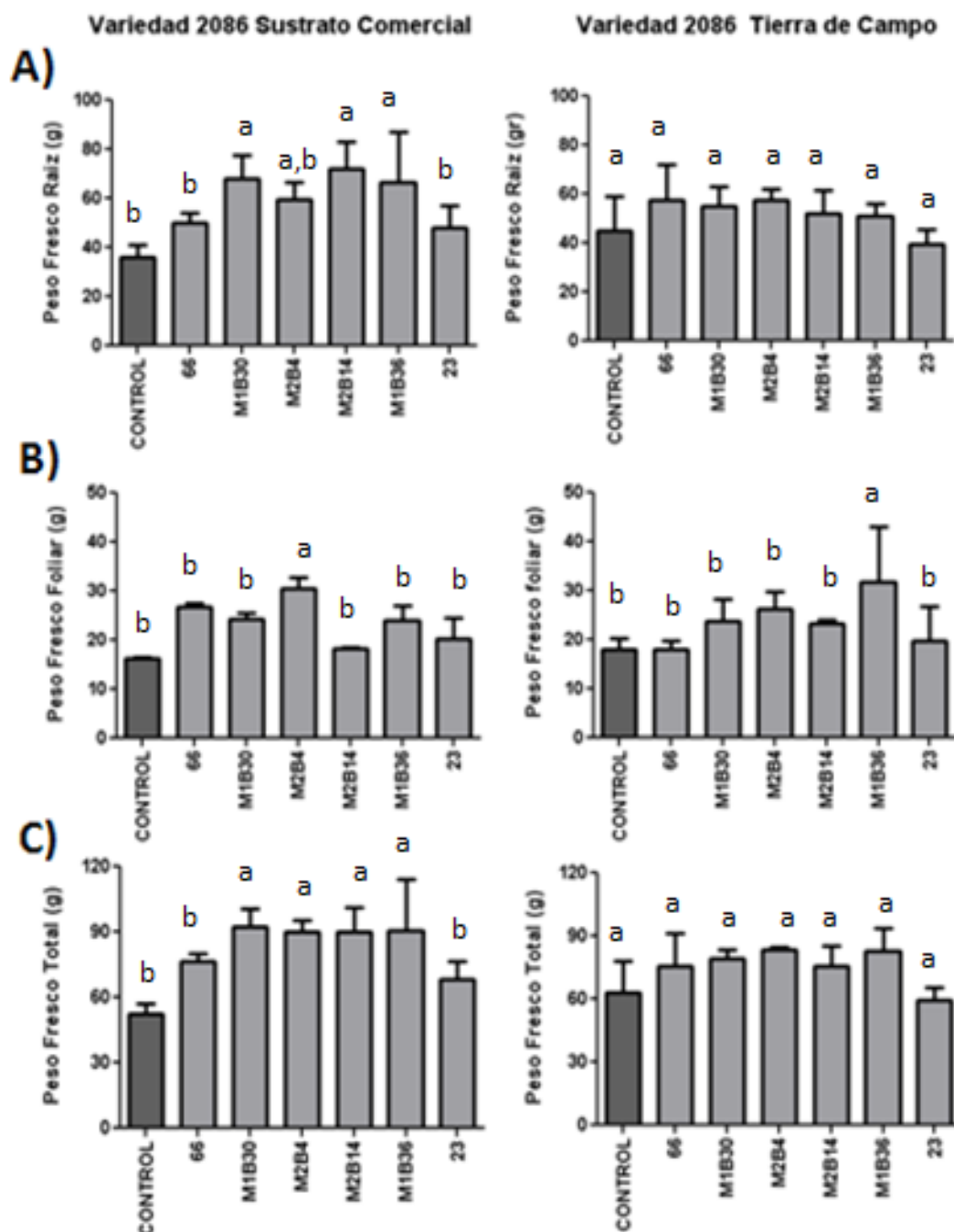


Figura 7. Peso fresco de plantas de caña de la variedad 2086 inoculadas con los mejores tratamientos bacterianos y plantas control sin inocular, en sustrato comercial y tierra de campo. Las barras representan el promedio de los datos \pm EE; y las letras representan diferencias estadísticamente

significativas entre los tratamientos. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y LSD ($p=0.001$).

Por último, en la variedad de caña de azúcar 310 en tierra de campo se observó solo una diferencia significativa entre el tratamiento M1B30 a nivel de raíz y peso total (parte foliar y raíz), con respecto al control. En la figura 8A, se observa que el tratamiento bacteriano M1B30 (76.44 ± 9.53 g), incremento un 45.96% más el peso del control (52.11 ± 15.28 g). Así mismo, en el peso total (parte foliar y raíz) el tratamiento M1B30 (117.34 ± 8.76 g), incrementó el rendimiento del control (80.39 ± 21.78 g), en un 46.68% (Fig. 8C). Por otro lado, en los resultados obtenidos en el sustrato comercial, se observó que tanto a nivel foliar como en el peso total (parte foliar y raíz), el tratamiento bacteriano M2B4 fue el único que presentó una diferencia significativa con respecto al control. En la figura 8B a nivel foliar se observó el incremento del 82.17% en el crecimiento de las plantas del tratamiento M2B4 (42.41 ± 6.35 g), con respecto al control (23.28 ± 1.74 g). Finalmente, en la figura 8C, se observa que a nivel de peso total (parte foliar y raíz), se incrementó en un 56.6% el rendimiento de las plantas del tratamiento M2B4 (96.86 ± 12.50 g), con respecto al rendimiento del control (61.85 ± 7.90 g). Los datos fueron analizados con la prueba LSD ($p=.001$).

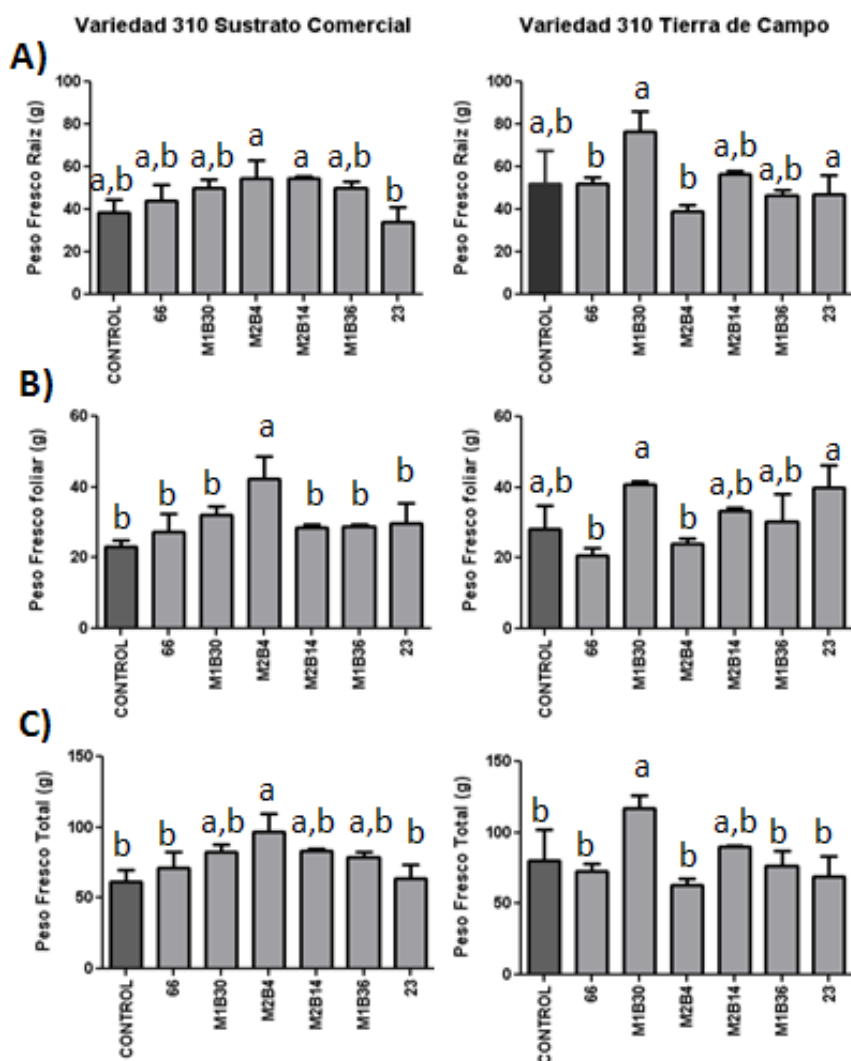


Figura 8. Peso fresco de plantas de caña de la variedad 310 inoculadas con los mejores tratamientos bacterianos y plantas control sin inocular, en sustrato comercial y tierra de campo. Las barras representan el promedio de los datos \pm EE; y las letras representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y LSD ($p=0.001$).

3.5.2 Microorganismos que lograron los mejores rendimientos en las tres variedades de caña de azúcar cuando se comparan los pesos frescos totales (parte foliar y raíz) en ambos sustratos.

En la variedad 1743 a nivel de peso fresco total (parte foliar y raíz) se observó que en los dos tipos de sustrato, no existe una diferencia significativa en el

rendimiento de las plantas inoculadas con los diferentes tratamientos bacterianos (Fig. 6C). Así mismo, en la variedad 2086 tampoco se observaron diferencias significativas en el rendimiento de las plantas en ambos sustratos (Fig. 7C). Contrario a esto, en la variedad 310 se observó que el rendimiento de las plantas del tratamiento M1B30 (117.34 ± 8.76), incrementó con respecto al control (80.39 ± 21.78 g), en la tierra de campo (Fig. 8C). Así mismo, en el sustrato comercial el rendimiento de las plantas del tratamiento M2B4 (96.86 ± 12.50), incrementó con respecto al rendimiento del control (61.85 ± 7.90) (Fig. 8C).

Se concluye que de las tres variedades utilizadas en este ensayo, las plantas de la variedad 310, al ser inoculadas con la cepa bacteriana M1B30 logran mayores rendimientos en sustratos pobres, como la tierra de campo, que los obtenidos utilizando sustratos comerciales. Por tal motivo se considera a la cepa bacteriana M1B30 como un microorganismo benéfico con potencial para la fabricación de un biofertilizante, ya que se observó que promueve el crecimiento vegetal.

3.6 Efecto de los aislados (con mejores rendimientos en caña de azúcar) en plantas de maíz y jitomate.

Con la finalidad de evaluar si el efecto de promoción de crecimiento de los microorganismos aislados de caña de azúcar es específico solo para ese cultivo, se llevaron a cabo experimentos utilizando otras plantas como maíz (perteneciente a la familia de las gramíneas) y jitomate (perteneciente a la familia de las solanáceas). En el primer experimento llevado a cabo se observó el efecto en la velocidad de germinación de las cepas 23, M2B4, MB36, 66 y M2B14 en semillas de maíz y jitomate. Para esto se esterilizaron semillas de maíz de la variedad “tigre” y semillas de jitomate de la variedad “saladet”, posteriormente fueron inoculadas 5 semillas por tratamiento con 1mL de la cepa bacteriana a una concentración de 1×10^8 cel/mL. El ensayo se realizó por triplicado, y la germinación se evaluó durante 1, 2, 3 y 5 días.

Como resultado se observó que en las semillas de maíz como en las de jitomate, no existió una diferencia significativa en cuanto a la velocidad de germinación con ninguno de los tratamientos aplicados con respecto al control (Fig. 9). Los datos fueron analizados con la prueba LSD ($p=0.001$).

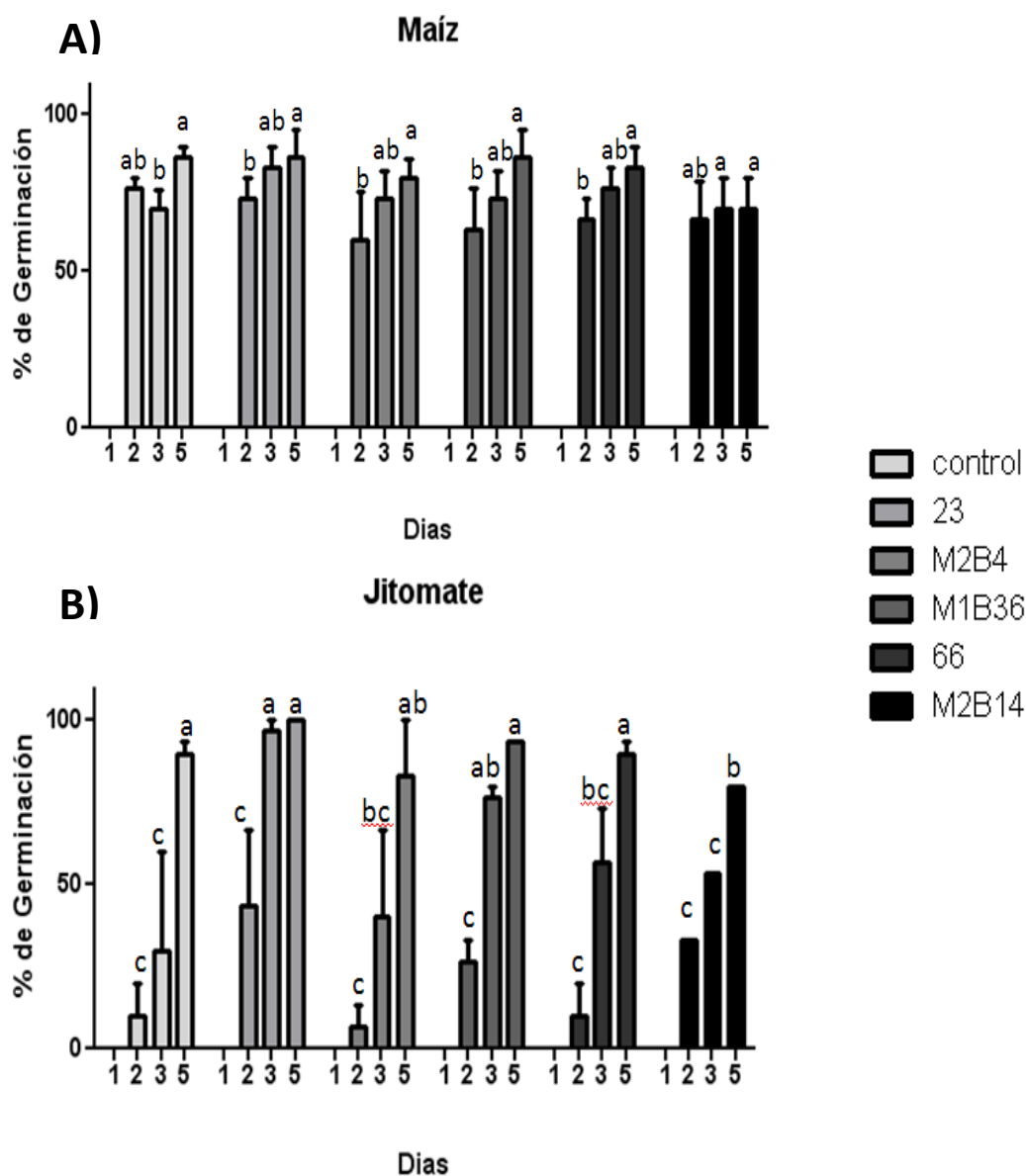


Figura 9. Comparación del efecto en la velocidad de germinación de semillas de maíz y jitomate al ser inoculadas con microorganismos aislados de caña de azúcar. A) Se observó el porcentaje de germinación de semillas de maíz con los 5 tratamientos bacterianos en diferentes días. B) Se observó la germinación de semillas de jitomate. Las barras representan el promedio de los datos \pm EE; y las letras representan diferencias

estadísticamente significativas entre los tratamientos. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía y LSD ($p=0.001$).

Una vez terminado el ensayo donde se observó el efecto en la velocidad de germinación de las semillas de maíz y jitomate cuando son inoculadas con cinco cepas bacterianas, los germinados fueron utilizados en un ensayo de invernadero donde se observaron las diferencias en peso a nivel foliar y de raíz de plantas de 1 mes de edad, así como los pesos frescos totales (parte foliar y raíz). Lo anterior fue con el objetivo de observar el efecto a largo plazo de la aplicación de los microorganismos benéficos en el rendimiento de las plantas.

Al finalizar el ensayo en las semillas de maíz observamos que a nivel de raíz, solo el tratamiento con la bacteria M2B4 (285.67 ± 2.34 g) es significativamente diferente con respecto al control (164.94 ± 1.35 g). Por otro lado, a nivel foliar no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos bacterianos y el control. Sin embargo, en los resultados a nivel de peso fresco total los tratamientos M2B4 (522.82 ± 12.9 g), 66 (541.81 ± 13.5 g) y M2B14 (439.78 ± 5.17 g), presentaron diferencias significativas con respecto al control (375.60 ± 1.08 g), al incrementar el peso total de la planta control (Fig. 10).

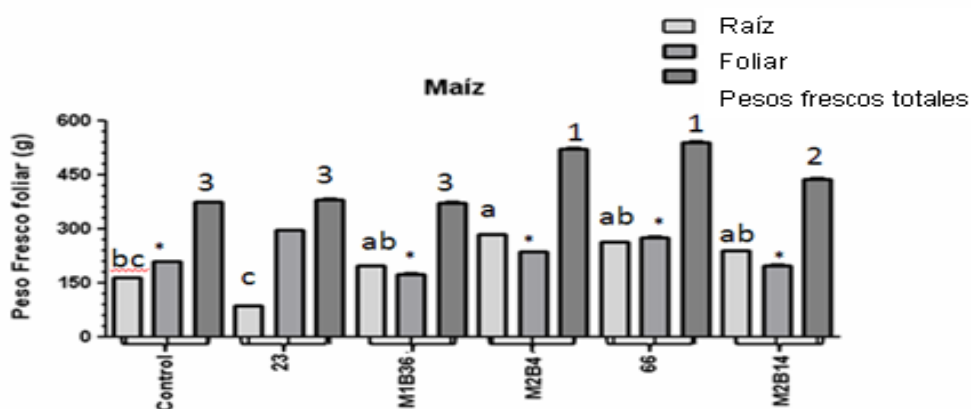


Figura 10. Comparación del efecto de la aplicación de los microorganismos 23, M2B4, M1B36, 66 y M2b14 en el peso a nivel foliar y raíz, así como los pesos frescos totales (parte foliar y raíz) en plantas de maíz. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas del peso de las raíces entre los tratamientos. El asterisco indica las diferencias

estadísticamente significativas del peso foliar entre los tratamientos. Los números indican las diferencias estadísticamente significativas de los pesos totales entre los tratamientos. Las barras representan la media \pm EE. Los datos fueron analizados con la prueba LSD ($p=0.001$).

Por otro lado, en las semillas de jitomate observamos que a nivel de raíz y foliar no hubo una diferencia significativa entre los tratamientos y el control. Sin embargo, a nivel de peso fresco total (parte foliar y raíz), se observó que los tratamientos con las cepas 23 (134.07 ± 4.83 g), M1B36 (110.04 ± 6.28 g) y 66 (133.18 ± 4.14 g), presentaron una diferencia significativa con el control ($116.31 \pm$ EE), ya que incrementan el peso total de la planta. Por otro lado, en la Figura 11 se observa una disminución en el peso total de las plantas que fueron inoculadas con las cepas bacterianas M2B14 (95.14 ± 4.16) y M2B4 (72.23 ± 12.32)

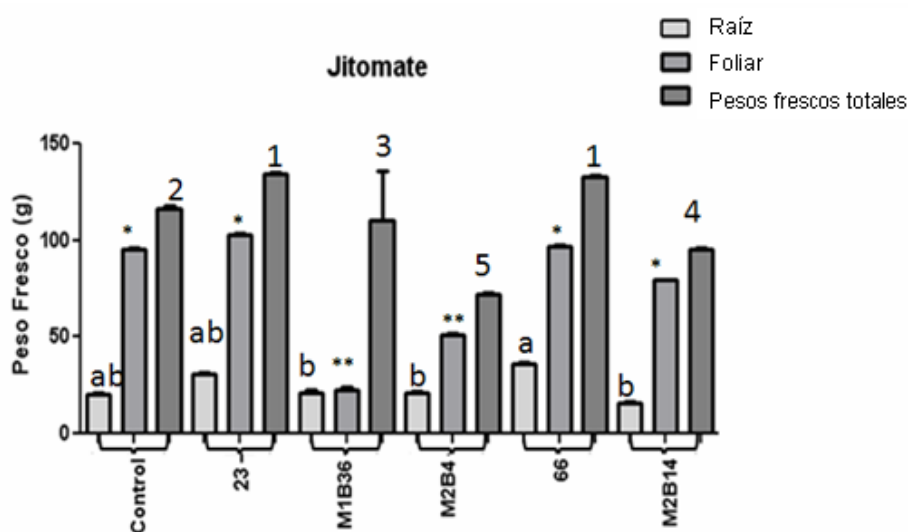


Figura 11. Comparación del efecto de la aplicación de los microorganismos 23, M2B4, M1B36, 66 y M2b14 en el peso a nivel foliar y raíz, así como los pesos frescos totales (parte foliar y raíz) en plantas de jitomate. Las letras indican las diferencias estadísticamente significativas del peso de las raíces entre los tratamientos. El asterisco indica las diferencias estadísticamente significativas del peso foliar entre los tratamientos. Los números indican las diferencias estadísticamente significativas de los pesos

totales entre los tratamientos Las barras representan la media \pm EE. Los datos fueron analizados con la prueba LSD ($p=.001$).

Los resultados sugieren que algunos de los microorganismos aislados de caña de azúcar (M2B4, 66 y M2B14), presentan una mayor interacción con plantas pertenecientes a la familia de las gramíneas, como la caña de azúcar y el maíz, ya que se observó que en estas plantas el crecimiento vegetal se potencializa. Mientras que otros microorganismos (23, M1B36 y 66), presentan mayor interacción con plantas como jitomate perteneciente a la familia de las solanáceas, esto al potencializar su crecimiento.

3.7 Tipificación de los microorganismos aislados de caña de azúcar mediante técnicas moleculares.

En base a los resultados obtenidos anteriormente, nos enfocamos a la caracterización molecular de algunos de los microorganismos que promovieron el crecimiento vegetal en las plantas de caña de azúcar, maíz y jitomate. Para lograr este objetivo, se amplificaron las regiones intergénicas (ITS) del ADN ribosomal, 16S en bacterias y 18S en hongos, mediante la técnica de PCR utilizando como molde el ADN genómico de las cepas aisladas. Después de obtener los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 0.8%, donde se observó la amplificación de las regiones ITS tanto de bacterias como de hongos. Posteriormente estos fragmentos se clonaron y secuenciaron. Con los resultados de la secuenciación se realizó un análisis tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov), donde se determinó el género y especie de los microorganismos, resultados que se pueden observar en la tabla 1.

| Procedencia | Clave | Cepa | BLASTx |
|-------------|-------|----------|--------------------------------|
| 1 | 9 | Bacteria | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| 1 | 10 | Bacteria | <i>Bacillus megaterium</i> |
| 1 | 23 | Bacteria | <i>Bacillus megaterium</i> |
| 1 | 35* | Bacteria | <i>Azospirillum</i> |
| 1 | 37 | Bacteria | <i>Bacillus megaterium</i> |

| | | | |
|---|------|----------|--|
| 1 | 63 | Bacteria | <i>Bacillus megaterium</i> |
| 1 | 66 | Bacteria | <i>Bacillus megaterium</i> |
| 1 | 101 | Bacteria | <i>Fusarium equiseti</i> |
| 2 | M2B1 | Bacteria | <i>Bacillus cereus</i> |
| | 8 | | |
| 1 | 4 | Hongo | <i>Trichoderma harzianum</i> strain NR5555 |
| 1 | 5 | Hongo | <i>Trichoderma harzianum</i> strain NR5555 |
| 1 | 6 | Hongo | <i>Trichoderma harzianum</i> strain NR5555 |
| 1 | 9 | Hongo | <i>Nigrospora sp. 3372</i> |
| 1 | 23 | Bacteria | <i>Ceratobasidium sp.</i> |

*Procedencia. 1) El Naranjo, San Luis Potosí 2) Xicoténcatl, Tamaulipas.

Tabla 1. Tipificación molecular de los microorganismos aislados. Mediante el análisis de la secuencia del ITS ribosomal.

Los resultados en incisos anteriores muestran que los tratamientos con las cepas fúngicas H23, M3H24, M3H6, M3H3, M3H1, 101 y M3H24, y las cepas bacterianas 23, 66, M1B30, M2B4 y M2B14, presentaron los mejores rendimientos en caña de azúcar, maíz y jitomate. De estas cepas, hasta el momento tenemos la secuencia del ITS de la cepa bacteriana 23 que corresponde a *Bacillus megaterium*; sin embargo, se tiene contemplado continuar con la tipificación molecular de las cepas que mostraron mayores rendimientos.

3.8 Efecto de los microorganismos aislados de caña de azúcar en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Con el objetivo de poder elucidar el mecanismo por el cual interacciona el microorganismo con la planta se realizaron experimentos *in vitro* utilizando como modelo *A. thaliana*. Para esto se germinaron semillas del ecotipo

silvestre Col-0 en medio MS 0.5X, posteriormente a las tres semanas de edad fueron trasplantadas cinco plántulas en una caja de petri y confrontadas con 10 diferentes cepas fúngicas y seis bacterianas. En donde se observó que cinco cepas (H3, H7, H23, H18, H25) promovieron el crecimiento tanto en aérea foliar así como en raíz, además se observó un aumento en la emergencia de los pelos radiculares, mientras que cinco cepas (H10, H13, H12, H8 y H3*) detuvieron el crecimiento. En la Figura 12, se muestran dos aislados fúngicos, la interacción del hongo H7 con *A. thaliana*, el cual promovió el crecimiento de pelos radiculares (Fig. 12A); también se observó el efecto patogénico de la cepa fúngica H8 que inhibió el crecimiento de *A. thaliana* (Fig. 12B). Además, se están realizando ensayos aplicando filtrados de exudados de cultivos de los microorganismos aislados en plantas de *A. thaliana*. Esto con el objetivo de observar si el efecto de promoción de crecimiento es por la interacción directa con el microorganismo y/o por las sustancias que produce el microorganismo, es decir por acción de alguna hormona o metabolito que pudiera ser considerado como el causante de la promoción de crecimiento, además de determinar el rango de concentración del sobrenadante el cual ejerce el efecto de promoción de crecimiento (datos no mostrados).

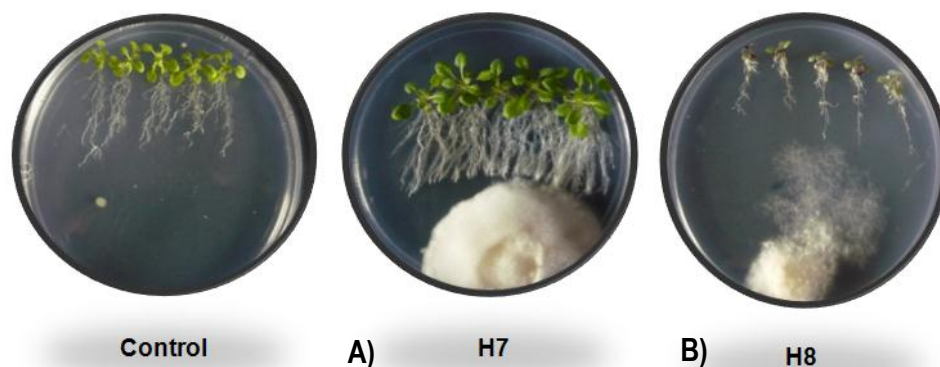


Figura 12. Interacción de *A. thaliana* con cepas fúngicas aisladas de caña de azúcar. Semillas del ecotipo silvestre Col-0 de *A. thaliana* fueron esterilizadas y germinadas en medio MS 0.5X, a las 3 semanas de edad se trasplantaron 5 plántulas en medio MS 0.5X y confrontadas con diferentes cepas fúngicas. En la figura se observa que la cepa fúngica H7 promovió el crecimiento tanto de área foliar como de raíz, así mismo se observó un

incremento en la emergencia de los pelos radiculares, mientras que la cepa H8 inhibió el crecimiento de *A. thaliana*.

V. DISCUSIÓN

En los últimos 50 años se ha reportado que algunos microorganismos pueden interaccionar de manera benéfica con las plantas. Favoreciendo la promoción del crecimiento, ya sea por la síntesis de fitohormonas, la fijación de nitrógeno, la solubilización de minerales, el incremento del volumen de la raíz, la producción de sideróforos o como agentes de biocontrol al producir compuestos antimicrobianos (Vassilev *et al.*, 2006, Avis *et al.*, 2008, Robles-Yerena *et al.*, 2010). Debido a estas ventajas, ha incrementado el interés por utilizarlos como biofertilizantes o inoculantes microbianos para lograr un equilibrio microbiológico en el suelo, incrementando la producción y protección de los cultivos y creando una agricultura y medio ambiente más sustentables (Vessey *et al.*, 2003).

En países como la India y Brasil, se han realizado aislamientos de la micro flora rizosférica de caña de azúcar, algunos de los géneros identificados son *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Azospirillum*, *Pantoea*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, entre otros (Saadabi *et al.*, 2007, Pariona-Llanos *et al.*, 2010). En este trabajo se identificaron microorganismos pertenecientes a algunos de estos géneros de muestras de raíces de plantas de caña de azúcar provenientes de los estados de San Luis Potosí y Tamaulipas, siendo el género *Bacillus* el predominante.

Se sabe que numerosas especies de bacterias y hongos que se encuentran asociados a la rizósfera de las plantas son capaces de ejercer un efecto benéfico al promover el crecimiento de estas (Rodríguez *et al.*, 1999). En las raíces de las plantas se pueden encontrar microorganismos capaces de solubilizar los fosfatos que no se encuentran biodisponibles en la rizósfera. Estos microorganismos favorecen la disponibilidad de nutrientes para las plantas, tal es el caso de los microorganismos pertenecientes a los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Erwinia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Rhizobium*. Además algunos de los géneros fúngicos que se han identificado son *Aspergillus*, *Penicillium*. Algunos otros microorganismos son capaces de tomar el nitrógeno presente en el suelo y reducirlo hasta compuestos disponibles para

la planta, proceso llamado fijación biológica del nitrógeno. Mehnaz y Lazarovits (2011), reportaron que géneros bacterianos como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, entre otros tienen la capacidad de fijar nitrógeno. En este trabajo resultados similares fueron encontrados al realizar la caracterización bioquímica de los microorganismos aislados previamente de la rizósfera de caña de azúcar, en donde se encontró que el 32.8 % de las cepas bacterianas y el 32.2 % de cepas fúngicas son solubilizadoras de fósforo, además de encontrar que el 0.8% de las cepas son capaces de fijar nitrógeno. Mediante el análisis del ITS se encontró que algunos de los microorganismos pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Trichoderma*. Estos han sido reportados como microorganismos capaces de fijar nitrógeno, en el caso del género *Azospirillum* (Cassan *et al.*, 2003, Avis *et al.*, 2008), o solubilizar fósforo del suelo como es el caso de los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Bacillus* (Illmer *et al.*, 1992, Rodríguez *et al.*, 1999) y el hongo *Trichoderma* spp. (Altomare *et al.*, 1999).

Es importante conocer los efectos que ejercen los microorganismos presentes en la superficie del suelo y la rizósfera de la raíz de las plantas, ya que habitan una variada comunidad microbiana compleja que incluye microorganismos saprófitos, endófitos, patógenos y benéficos (Avis *et al.*, 2008). Dichos microorganismos pueden atacar, repeler, antagonizar, competir o colaborar con otros microorganismos o incluso con la misma planta, afectando así el crecimiento y desarrollo de estas (Pariona-Llanos *et al.*, 2010). Por esta razón en esta tesis nos enfocamos a la identificación de los microorganismos promotores de crecimiento a partir de aislados de la rizósfera de caña, esto con el fin de obtener microorganismos específicos que al ser inoculados a la planta genere efectos positivos sobre el crecimiento de estas, ya sea por la síntesis o inducción de sustancias que promuevan el crecimiento de la planta, o por estimular la defensa de esta a patógenos y/o ejercer biocontrol. Como resultado obtuvimos que 32 microorganismos analizados promueven el crecimiento de caña de azúcar, dentro de estos microorganismos encontramos a *Trichoderma harzianum*. Shukla *et al.*, 2008, reportaron que se incrementa la toma de nutrientes de caña de azúcar al ser inoculada con *T. harzianum*, ya

que este hongo tiene la capacidad de movilizar y tomar minerales como potasio, nitrógeno y fósforo, poniéndolos disponibles para la planta. Además *T. harzianum* actúa como agente de biocontrol contra la enfermedad red rot y otras enfermedades de caña de azúcar (*Singh et al., 2010*). Además, nuestra cepa de *Trichoderma harzianum*, al ser utilizada en ensayos de germinación de semillas de nopal, promueve el rompimiento de la latencia en un porcentaje mayor que el control (*Delgado-Sánchez et al., 2010*)

En relación a las bacterias, el género *Pseudomonas* se encontró en nuestro estudio, el cual es conocido por potenciar y estimular el crecimiento de las plantas, ya sea por solubilizar fosfato, por regular la concentración de reguladores de crecimiento, como el ácido-indol acético. Además *Penrose et al., 2001*, relacionó la actividad de la ACC diaminasa de las *Pseudomonas*, con el incremento y la elongación de las raíces, ya que esta enzima se encarga de catalizar el 1-aminociclopropano carboxílico (ACC), precursor inmediato del etileno (hormona vegetal involucrada en muchos procesos de desarrollo de las plantas, como la abscisión de hojas, senescencia, crecimiento, floración, por mencionar algunos). Además cepas del género *Bacillus*, fueron encontradas predominantemente en nuestro estudio, este género es conocido por influir directamente en la arquitectura del sistema radicular y en el desarrollo de brotes debido a la secreción de sustancias promotoras de crecimiento vegetal como lo son auxinas y citocininas, además de ser capaces de producir antibióticos y ácido cianhídrico el cual promueve el crecimiento de las plantas al inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos (*Penrose et al., 2005, Persello-Cartieux et al., 2003, López-Bucio et al., 2007*).

Suelos fértiles con buenas propiedades físicas son necesarios para tener una agricultura sustentable, ya que estos ayudan al crecimiento de las raíces de las plantas al proporcionarle elementos necesarios para un crecimiento óptimo (*Doran et al., 2000*). Se considera que a partir de 1945 el hombre ha contribuido a la degradación de los suelos y a la pérdida de productividad de estos, como consecuencia de la inadecuada sustitución de nutrientes con grandes concentraciones de fertilizantes, a la mala gestión del agua, falta de rotación en los cultivos, entre otros (*Tilman et al., 2002*). Por ello se evaluó el efecto que ejercen los microorganismos aislados en dos tipos de sustrato,

sustrato comercial y tierra de uno de los ejidos que utilizan comúnmente los cañeros para la siembra de la caña, la cual es de muy mala calidad debido a la deficiencia de nutrientes y alto contenido de sales que contienen (Datos no mostrados).

En los resultados se observó que plantas de la variedad 2086 no muestran una diferencia significativa en los rendimientos obtenidos en ambos tipos de sustrato. Así mismo, la variedad 1743 solo muestra diferencia en el peso de la raíz de las plantas, siendo mayor el de las plantas crecidas en el sustrato rico en nutrientes; sin embargo no existen diferencias significativas en el rendimiento de la planta. Contrario a esto, observamos que la variedad 310 presenta mayor rendimiento en el suelo pobre en nutrientes, comparado a los rendimientos obtenidos en el suelo rico. Nuestros resultados son similares a lo observado por *Martínez de Oliveira et al (2006)*, donde reportó que en cultivos en Brasil de plantas de caña de la variedad SP81-3250 inoculadas con bacterias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum spp.*, *Azospirillum amazonense* y *Burkholderia tropica*), al ser cultivadas en suelos poco fértiles y pobres en nutrientes son capaces de crecer mejor que las plantas crecidas en suelos ricos en nutrientes. Es importante mencionar que nuestros resultados indican que la combinación específica de planta – microorganismo – sustrato es necesaria para conservar una agricultura sustentable, ya que al incorporar esta nueva tecnología de fertilización orgánica, se reduciría la fertilización química y por ende, se lograría mantener la fertilidad del suelo. (*Oliveira et al., 2002, Martínez de Oliveira et al., 2006*).

Dada la necesidad de mantener una agricultura sustentable disminuyendo el uso de agroquímicos en los últimos años se ha incrementado la búsqueda de microorganismos benéficos que al ser aislados de la rizósfera, produzcan el mismo efecto benéfico en diversos tipos de plantas, por lo cual es importante establecer si estos microorganismos son capaces de promover crecimiento vegetal en plantas pertenecientes a diferentes familias. *Kloepper et al (1988)* y *Kumar (2001)*, reportaron que cepas bacterianas de *P. fluorescens* aisladas de distintos tipos de suelo tienen la capacidad de estimular la germinación de semillas, así como desencadenar el desarrollo de la raíz de diferentes cultivos como garbanzo, berenjena, soya y jitomate. Se ha reportado que el hongo

Trichoderma harzianum es capaz de promover el crecimiento de las raíces de plantas como maíz, jitomate y lechuga (Ousley et al., 1994, Naseby et al., 2000., Yededía et al., 2001., Alfonso et al., 2005, Chacón et al., 2007). Al realizar un ensayo en maíz con cinco cepas bacterianas (23, M2B4, MB36, 66 y M2B14) que fueron aisladas de caña de azúcar, se observó que las cinco cepas son capaces de ejercer el mismo efecto de promoción de crecimiento que en caña de azúcar. Por otro lado, Alfonso et al., 2005, reportaron que los géneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, forman parte de la rizósfera de jitomate y al ser aplicados a este cultivo ejercen un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas, así como en su estado nutricional. Contrario a lo anterior, en este trabajo se encontró que al aplicar las cepas M2B4 y M2B14, aisladas de las raíces de caña afectan el crecimiento de las plantas de jitomate. Sin embargo, las cepas 23, M2B4, MB36, 66 y M2B14 aisladas de caña de azúcar ejercen un efecto benéfico en plantas de la familia *Gramineae*, como es el caso de maíz y caña.

Por otra parte, se evaluó la participación de los microorganismos aislados en caña de azúcar en plantas de *A. thaliana*, donde observamos que cuatro de las cepas fúngicas analizadas una de ellas identificada como *Trichoderma harzianum* y tres de las cepas bacterianas entre ellas *Bacillus spp.* y *Pseudomonas spp.*, promueven el crecimiento de *A. thaliana*. Así mismo, se observó un incremento en el sistema radicular, esto al promover el crecimiento de raíces secundarias, por lo que la planta puede obtener mayor cantidad de nutrientes. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por López-Bucio et al., 2007, que reportó que *Bacillus megaterium* promueve el crecimiento e incrementa el número de raíces laterales junto con pelos radicales. Así mismo se reportó que el género *Trichoderma spp.*, es capaz de producir compuestos biológicamente activos como enzimas que degradan la pared celular, metabolitos secundarios, por lo cual es considerado además de promotor de crecimiento como agente de biocontrol (Avis et al., 2008, Singh et al., 2010). Además los resultados concuerdan con lo reportado para el género *Pseudomonas*, que se sabe que su efecto benéfico radica en la promoción no solo del crecimiento de las plantas, sino también como agente de biocontrol y solubilizador de fosfatos (Gravel et al., 2007, Avis et al., 2008).

En conclusión, debido a la gran importancia del cultivo de caña de azúcar, de la cual se obtiene azúcar, materia prima eficiente para la producción de bioetanol y como una fuente de generación de electricidad (Días *et al.*, 2009). Es de interés el desarrollo de nuevas tecnologías para aumentar el rendimiento de los cultivos. Una de estas tecnologías que ha tomado auge es la generación de bioinoculantes, los cuales son fijadores de nitrógeno, biocontroladores de patógenos, así como promotores de crecimiento vegetal (como por ejemplo *Pseudomonas spp.*, *Trichoderma spp.*, *Azospirillum spp.*, *Bacillus spp.*, entre otros), esto llevará al incremento en la producción de los productos obtenidos a partir de caña de azúcar.

VI.REFERENCIAS

- Alfonso T. E., Leyva A., Hernández A., (2005). Microorganismos benéficos como biofertilizantes eficientes para el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Revista Colombiana de Biotecnología*.2:47-54.
- Antoun H., Beauchamp C. J., Goussard N., Chabot R., Lalande R., (1998). Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*. 204:57–67.
- Avis T. J., Gravel V., Antoun H., Tweddell R. J., (2008). Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. *Soil Biology & Biochemistry*. 40:1733–1740.
- Benítez T., Rincon A. M., Limón M. C., Codón A. C., (2004). Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. *International Microbiology*. 7:249-260.
- Cassan F., Bottini R., Piccoli P., (2003). Plant growth promotion by *Azospirillum spp.* Trough gibberellins production. An alternative model to increase crop yield?. *Microbiología Agrícola: un aporte de la investigación Argentina para la sociedad*. Pp: 143-158. editorial de la Universidad Nacional de Santiago del Estero.
- Chacón M.R., Rodríguez-Galán O., Benítez T., Sousa S., Rey M., Llobell A., Delgado-Jarana J., (2007). Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by Trichoderma harzianum. *International Microbiology* 10, 19–27.
- Delgado-Sánchez P., Ortega-Amaro M. A., Rodríguez-Hernández A. A., Jiménez-Bremont J. F., Flores J., (2010). Further evidence from the effect of fungi on breaking Opuntia seed dormancy. *Plant Signaling & Behavior*. 10: 1229-1230.
- Dias M. O. S., Ensinas V. A., Nebra A. S., Filho M. R., Rossell C. E. V., Maciel W. M. R., (2009). Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: integration to conventional bioethanol production process. *Chemical Engineering Research and Design*. 87:1206-1216.

- Dileep K., B.S., (1998). Disease suppression and crop improvement through fluorescent pseudomonads isolated from cultivated soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.14:735–741.
- Dileep K., B.S., Berggren I., Mårtensson A.M., (2001). Potential for improving pea production by co-inoculation with fluorescent *Pseudomonas* and *Rhizobium*. *Plant and Soil*. 229: 25–34.
- Doran J. W., Zeiss M. R., (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*. 15:3–11.
- Gravel V., Antoun H., Tweddell R. J., (2007). Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry*. 39:1968-1977.
- Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M., (2004). *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews*. 2:43-55.
- Huang, H.C., Erickson, R.S (2007). Effect of seed treatment with *Rhizobium leguminosarum* on Pythium damping-off, seedling height, root nodulation, root biomass, shoot biomass, and seed yield of pea and lentil. *Journal of Phytopathology*. 155:31–37.
- Kloepper J. W., Hume D. J., Scher F. M., Singleton C., Tipping B., Laliberte M., Frauley, K., Kutchaw T., Simonson C., Lifshitz R., Zaleska I., Lee L., (1988). Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapeseed). *Plant Disease*. 72:42–46.
- Kubicek C. P., Mach R. L., Peterbauer C. K., Lorito M., (2001). *Trichoderma*. From genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology*. 83:11-23.
- Illmer P, Schinner F., (1992). Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil.*Soil Biology and Biochemistry*. 24:389–95.
- López-Bucio J., Campos-Cuevas J. C., Hernández-Calderón E., Velásquez-Becerra C., Farías-Rodríguez R., Macías-Rodríguez L I., Valencia-Cantero

- E., (2007). *Bacillus megaterium Rhizobacteria* Promote Growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene- independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*.
- Martinez de Oliveira A. L., Lima Canuto E. L., Urquiaga S., Reis Massena V., Baldani J. I., (2006). Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant and Soil* 284:23-32.
- Mehnaz S., Lazarovits G (2006). Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*. 51:326–335.
- Naseby D. C., Pascual J. A., Lynch J. M., (2000). Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *Journal of Applied Microbiology*. 88:161–169.
- Oliveira A. L. M., Urquiaga S., Döbereiner J., Baldani J., (2002). The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant & Soil*. 242:205-215.
- Ousley M. A., Lynch J. M., Whipps J. M., (1994). Potential of *Trichoderma spp.* As consistent plant growth stimulators. *Biology and Fertility of Soils* 17, 85–90.
- Pariona-Llanos R., Santi Ferrara F. I., Soto Gonzales H. H., Ramos Barbosa H., (2010). Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. *European Journal of Soil Biology*. 46:387-393.
- Penrose, D.M., Moffatt, B.A., Glick, B.R (2001). Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. *Canadian Journal of Microbiology*. 47: 77–80.

- Peña B. H., Reyes I., (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa L.*) Interciencia. 32:560-565.
- Persello-Cartieaux F. N., Robaglia L., (2003). Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. Plant, Cell and Environment. 26:189-199.
- Richardson A. E., (2001). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. Australian Journal of Plant Physiology 28:897–906.
- Robles-Yerena L, Rodríguez-Villareal R.A, Ortega-Amaro M.A, Fraire-Velázquez S, Simpson J, Rodríguez-Guerra R, Jiménez-Bremont J.F (2010). Characterization of a new fungal antagonist of *Phytophthora capsici*. Scientia Horticulturae. 125:248-255.
- Rodríguez H., Fraga R., (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology. 17:319-339.
- Saadabi M.A, El-Amin AL-Nur (2007). Contribution to the knowledge of soil fungi in sudan rhizosphere microflora of sugarcane at Kenana sugar estate. International Journal of Botany. 3:97-102.
- Samina Mehnaz (2011). Plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane in: Dinesh K. Mashewari (Ed), Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011, pp 165-186.
- Samiyappan R, Viswanathan R (2007). Siderophores and Iron Nutrition on the Pseudomonas mediated antagonism against *Colletotrichum falcatum* in sugarcane. Sugar Tech 9:57-60.
- Sang M. K., Chun S. C., Kim K. D., (2008). Biological control of *Phytophthora blight* of pepper by antagonistic rhizobacteria selected from a sequential screening procedure. Biological Control.46:424–433.

- Shen O.-H., Choi S.-M., Lee, Park C.-S., (2002). *In vitro* and *in vivo* activities of a biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A21-4, against *Phytophthora capsici*. Plant Pathology Journal.18:221–224.
- Shukla S. K., Yadav R. L., Suman A., Singh P. N., (2008), Improving rhizospheric environment and sugarcane ratoon yield through bioagents amended farm yard manure in udic ustochrept soil. Soil & Tillage Research. 99:158-168.
- Siddiqui Z. A., Mahmood I., (1998). Effect of a plant growth bacterium, an AM fungus and soil types on the morphometrics and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. Applied Soil Ecology. 8:77-84.
- Singh V., Singh P. N., Yadav R. L., Awasthi S. K., Joshi B. B., Singh R. K., Lal R. J., Duttamajumder S. K., (2010.). Increasing the efficacy of the *Trichoderma harzianum* for nutrient uptake and control of the rod rot in sugarcane. Journal of Horticulture and Forestry. 2:66-71.
- Singh V., Hoshi B. B., Awasthi S. K., Srivastava S. N., (2008). Eco-friendly management of red rot disease of sugarcane with *Trichoderma* strains. Sugar Tech. 10:158-161.
- Srivastava S N., Singh V., Awasthi S. K., (2008). *Trichoderma* induced improvement in growth, yield and quality of sugarcane. Sugar Tech. 8:166-169.
- Tilman D., Kenneth G., Cassman, Pamela A. M., Rosamond N., Stephen P., (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. Nature. 418:671-677.
- Vassilev N., Vassileva M., Nikolaeva L., (2006). Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. Applied Microbiology and Biotechnology. 71:137-144.
- Vessey J. K., (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil. 255: 571–586.

- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L., Marra R., Woo S. L., Lorito M., (2008). Trichoderma-plant pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*. 40:1-10.
- Whipps, J. M., (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany* 82:1198–1227.
- Yadav R. L., Singh V., Srivastav S. N., Lal R. J., Sangeeta S., Awasthi S. K., Joshi B. B., (2008). Use of *Trichoderma harzianum* for the control of red rot disease of sugarcane. *Sugarcane Int. (UK)* 26:28-33.
- Yedidia I., Srivastva A. K., Kapulnik Y., Chet I., (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*. 235:235–242.