



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Selección de Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs) con capacidad de promoción de crecimiento vegetal, provenientes de cultivos de caña panelera con manejos agronómicos contrastantes

Gloria Inés Leal Medina

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia
2017

Selección de Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs) con capacidad de promoción de crecimiento vegetal, provenientes de cultivos de caña panelera con manejos agronómicos contrastantes

Gloria Inés Leal Medina

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias-Microbiología

Director:

Ph.D. Daniel Uribe Vélez

Línea de Investigación: Microbiología ambiental
Grupo de Investigación: Microbiología Agrícola

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia

2017

*A Gabriel y a Joaquín, mi papá y mi hijo,
por ser faros de amor, fuerza
y esperanza en mi vida.*

*“Los seres humanos no nacen para siempre el día en que
sus madres los alumbran, sino que la vida
los obliga a parirse a sí mismos una y otra vez”*

Gabriel García Márquez.

Agradecimientos

A mi familia por su apoyo incondicional en la distancia, por la palabra y la alegría en el momento justo.

A la Universidad Nacional de Colombia, al IBUN, al grupo de Investigación en Microbiología Agrícola por ser mi familia en estos dos años de formación y al Jardín Infantil UN.

Al profesor Daniel Uribe Vélez, por sus enseñanzas de ciencia y de vida, por su acompañamiento, paciencia y por permitirme hacer parte de esa gran familia.

A todos mis compañeros y amigos: Carlos, Vanessa, Karen, Laura, Kelly, Luz Adriana, Andrés, por sus enseñanzas, sus abrazos y palabras de aliento, por hacer para mi esta ciudad más cálida.

A Socorro Prieto por su acompañamiento, gestión y apoyo.

Al posgrado Inter facultades en Microbiología, al programa Jóvenes Investigadores de Colciencias y a la Fundación Juan Pablo Gutiérrez Cáceres por su apoyo.

Resumen

Las Bacterias Aerobias Formadoras de Endosporas (BAFEs) han sido poco estudiadas en asociación con los cultivos de caña de azúcar, ya sea desde el punto de vista de biofertilización o de su ecología. El cultivo de caña panelera en Colombia reviste gran importancia desde el punto de vista socioeconómico y su manejo agronómico se desarrolla de manera diferencial a lo largo de la geografía del país. Con el fin de conocer si el manejo del cultivo tiene un efecto en las actividades asociadas a promoción de crecimiento vegetal de este grupo funcional y seleccionar aislamientos con potencial uso como promotores de crecimiento vegetal, 52 aislamientos de BAFEs rizosféricas obtenidas de cultivos de caña panelera de Cundinamarca y Santander con diferente régimen de fertilización, diferente variedad y tasa de renovación de semilla, fueron caracterizados en términos de producción de compuestos indólicos, solubilización de fosfato de calcio y aluminio, mineralización de ácido fítico, fijación biológica de nitrógeno, actividad ACC deaminasa y antagonismo frente a tres hongos fitopatógenos. Se encontró que los aislamientos provenientes de Santander son más destacados en la producción de indoles, solubilización de fosfato tricálcico y mineralización de ácido fítico, mientras que los aislamientos provenientes de Cundinamarca exhibieron mayor capacidad antagónica frente a hongos fitopatógenos. Las actividades de solubilización de fosfato de aluminio, fijación biológica de nitrógeno y ACC deaminasa no fueron destacadas dentro del grupo de BAFEs estudiado. Los aislamientos de BAFEs se encontraron en su mayoría asociados a los clados de *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* y la inoculación de plántulas de caña panelera con *B. megaterium* 6C07 mostró un aumento en la longitud de vástago en la Variedad POJ 2878 y también en el diámetro del tallo y en el peso seco de vástago en la variedad CC93-771 en comparación con el control no inoculado.

Palabras clave: BAFEs, caña panelera, promoción de crecimiento vegetal.

Contenido

	Pág.
1. Marco teórico	3
1.1 La caña de azucar	3
1.2 Morfología de la caña de azucar	3
1.3 Cultivo de la caña de azucar	6
1.3.1 Fases del ciclo de cultivo	8
1.4 La caña panelera.....	9
1.4.1 Importancia socioeconómica de la caña panelera.....	9
1.4.2 Características de la producción panelera en Colombia	10
1.5 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal	11
1.5.1 Clasificación de las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal .	12
1.5.2 Principales mecanismos de las RPCV	13
1.6 Bacterias aerobias formadoras de endosporas (BAFEs)	19
1.6.1 Ecotipos de <i>Bacillus</i>	20
1.6.2 BAFEs como RPCV	21
2. Problema de Investigación y objetivos	24
2.1 Problema de investigación	24
2.1.1 Planteamiento del problema	24
2.1.2 Justificación	25
2.2 Objetivos	26
2.2.1 Objetivo General.....	26
2.2.2 Objetivos específicos	26
3. Materiales y métodos.....	27
3.1 Aislamientos bacterianos.....	27
3.2 Identificación molecular de aislamientos de BAFEs.....	27
3.3 Caracterización de BAFEs rizosféricas en actividades relacionadas con promoción de crecimiento vegetal.....	31
3.3.1 Producción de compuestos indólicos	32
3.3.2 Solubilización de fosfatos	32
3.3.3 Mineralización de ácido fítico	33
3.3.4 Actividad ACC deaminasa	33
3.3.5 Evaluación de la fijación de nitrógeno.....	34
3.3.6 Antagonismo contra hongos fitopatógenos	35
3.4 Evaluación bajo condiciones de Invernadero.....	36
3.5 Análisis estadístico.....	38

4. Resultados y Discusión	39
4.1 Análisis de suelo.....	39
4.2 Caracterización de BAFEs rizosféricas en actividades relacionadas con promoción de crecimiento vegetal	43
4.2.1 Producción de compuestos indólicos	45
4.2.2 Solubilización de fosfato tricálcico	49
4.2.3 Solubilización de fosfato de Aluminio	52
4.2.4 Mineralización de ácido fítico	53
4.2.5 Actividad ACC deaminasa.....	58
4.2.6 Fijación biológica de nitrógeno	62
4.2.7 Antagonismo contra hongos fitopatógenos.....	63
4.3 Identificación molecular de aislamientos de BAFEs	72
4.4 Evaluación bajo condiciones de Invernadero	78
5. Conclusiones y recomendaciones.....	91
5.1 Conclusiones	91
5.2 Recomendaciones	92

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Sistema radicular de la caña.	4
Figura 1-2: Tallos de la caña.	4
Figura 1-3: Partes del tallo de la caña de azucar.....	5
Figura 1-4: Partes de la hoja madura de la caña de azucar.....	6
Figura 1-5: Ciclo fenológico de la caña de azucar.	7
Figura 1-6: Clasificación de las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento vegetal... 12	12
Figura 1-7: Modelo explicativo de la actividad ACC deaminasa.....	13
Figura 4-1: Análisis de Componentes principales de suelos muestreados.....	40
Figura 4-2: Análisis de Conglomerados entre suelos muestreados.....	42
Figura 4-3: Porcentaje de aislamientos dentro de cada nivel de producción de compuestos indólicos.....	43
Figura 4-4: Porcentaje de aislamientos dentro de cada nivel de solubilización de fosfato tricalcico.....	50
Figura 4-5: Porcentaje de aislamientos dentro de cada nivel de solubilización de fosfato de Aluminio.....	52
Figura 4-6: Porcentaje de aislamientos que presentaron o no la actividad de mineralización de ácido fítico.....	54
Figura 4-7: Crecimiento del hongo Sclerotium luego de 3 días en medio PDA.....	64
Figura 4-8: Porcentaje de aislamientos dentro de cada una de las categorías de inhibición de crecimiento de Sclerotium	64
Figura 4-9: Área de Inhibición de crecimiento micelial de Sclerotium por BAFEs categorizados como positivos para esta actividad.....	65
Figura 4-10: Porcentaje de aislamientos dentro de cada una de las categorías de inhibición de crecimiento de Rhizoctonia solani	65
Figura 4-11: Área de Inhibición de crecimiento micelial de Rhizoctonia por BAFEs categorizados como positivos para esta actividad.....	67
Figura 4-12: Porcentaje de aislamientos dentro de cada una de las categorías de inhibición de crecimiento de Botrytis.....	69
Figura 4-13: Área de Inhibición de crecimiento micelial de Botrytis por BAFEs categorizados como positivos para esta actividad.....	70
Figura 4-14: Árbol de distancia genética construido mediante el método Neighbor-Joining basado en secuencias de la región 16SrNA.....	74
Figura 4-15: Longitud de vástago de plantas de caña panelera de la variedad POJ2878 para cada tratamiento	79

Figura 4-16: Diámetro de tallo de plantas de caña panelera de la variedad POJ2878 para cada tratamiento	80
Figura 4-17: Peso seco de vástago de plantas de caña panelera de la variedad POJ2878 para cada tratamiento	81
Figura 4-18: Peso seco de raíz de plantas de caña panelera de la variedad POJ2878 para cada tratamiento	82
Figura 4-19: Longitud de vástago de plantas de caña panelera de la variedad CC-93771 para cada tratamiento	87
Figura 4-20: Diámetro de tallo de plantas de caña panelera de la variedad CC-93771 para cada tratamiento	88
Figura 4-21: Peso seco de vástago de plantas de caña panelera de la variedad CC-93771 para cada tratamiento	89
Figura 4-22: Peso seco de raíz de plantas de caña panelera de la variedad CC-93771 para cada tratamiento	90

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 3-1: Características de los suelos y cultivos muestreados.	28
Tabla 3-2: Tratamientos evaluados en los ensayo de invernadero	36
Tabla 3-3: Rangos de alturas de plantas.	37
Tabla 4-1: Comparación de los parámetros fisicoquímicos de suelos provenientes de Cundinamarca y Santander.....	41
Tabla 4-2: Caracterización de 52 aislamientos de BAFEs en solubilización de dos fuentes de fósforo inorgánico y producción de compuestos indólicos.	43
Tabla 4-3: Eficiencia de mineralización de fitato.	55
Tabla 4-4: Densidad óptica luego de 48 horas de crecimiento de BAFEs en medio MM9 con diferentes fuentes de N.....	59
Tabla 4-5: Actividad de reducción de acetileno de aislamientos de BAFEs.....	62
Tabla 4-6: Identidad de los aislamientos según la amplificación del gen rRNA 16S....	72

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
CORPOICA	Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ACP	Análisis de Componentes Principales
AIA	Ácido Indol Acético
ANOVA	Análisis de varianza
ARA	Ensayo de Reducción de Acetileno
ATP	Trifosfato de adenosina
BPCV	Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno
HRS	Hoya del Río Suarez
MO	Materia orgánica
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	polymerase chain reaction
RDP	Ribosomal Database Project
RNA	Ácido ribonucleico
SA	Ácido Salicílico
SSigMol	Servicio de secuenciación y análisis molecular
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
Has	Hectareas
USDA	U.S Department of agriculture

Introducción

El cultivo de caña panelera en Colombia está surgiendo como un importante renglón económico en el país sobre todo por la apertura de la panela en mercados internacionales y por la tendencia al alza del precio nacional al productor, sin embargo, existen escenarios heterogéneos en los sistemas de producción de este cultivo en regiones como Cundinamarca y la Hoya del Río Suárez (Boyacá y Santander), lo que incide en que se encuentren altibajos en los rendimientos alcanzados a lo largo de las regiones productoras y que se generen dos contextos distintos donde sea importante el desarrollo de estrategias de biofertilización que permitan ya sea disminuir los costos asociados a la fertilización de los cultivos o mejorar la nutrición y desarrollo de las plantas donde la fertilización es ausente.

Govindasamy *et al.*, (2010), relacionan que múltiples especies de *Bacillus* y *Paenibacillus* pueden afectar positivamente el crecimiento y la salud de los cultivos mediante tres formas de interacción que incluyen: una mejora en la disponibilidad y movilización de nutrientes para la planta huésped, el antagonismo contra hongos, bacterias, nematodos patógenos e insectos plaga y la estimulación de los mecanismos de defensa del huésped; la colonización endófito y la formación de biopelícula también ha sido reportada en estos dos géneros y todas esas características asociadas a promoción de crecimiento, sumada a su capacidad de formar endosporas hacen que en este grupo bacteriano se encuentren potenciales Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal que puedan ser útiles para su aplicación en una agricultura sustentable.

Dada la alta demanda de nutrientes de un cultivo permanente como la caña, las altas dosis de fertilización usadas en zonas como Santander y la continua extracción de nutrientes en regiones donde no se fertiliza como Cundinamarca, se encuentra un gran potencial en el estudio de Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs), sumado a esto, los dos escenarios mencionados brindan la oportunidad para estudiar las características funcionales de BAFEs que se han asociado a dos nichos ecológicos, como lo serían la

rizosfera de plantas de caña panelera manejados bajo diferentes regímenes agronómicos, adicionalmente, el estudio de estas bacterias permitiría la selección de aislamientos que puedan ser usados como inóculos capaces de mejorar el desarrollo de las plantas, incentivando la incursión de nuevas tecnologías en este cultivo que es de gran importancia para el país.

En este sentido, el presente trabajo buscó mediante la selección en primera instancia de un grupo de BAFEs obtenidas de rizosfera de caña panelera con un historial de manejo contrastante del cultivo, realizar una caracterización *in vitro* en actividades de promoción de crecimiento vegetal que incluyen la producción de compuestos indólicos, solubilización de fósforo inorgánico, mineralización de fósforo orgánico, fijación de nitrógeno, actividad ACC deaminasa y antagonismo *in vitro* contra hongos fitopatógenos, para posteriormente desarrollar ensayos a nivel de invernadero que permitieron evidenciar el efecto de la inoculación de los aislamientos seleccionados en el crecimiento de plantas de caña panelera.

1. Marco Teórico

1.1 La Caña de Azúcar

La caña de azúcar es una planta perenne perteneciente a la familia de las poáceas, su cultivo es de gran importancia en la economía de muchos países en el trópico y el subtrópico al almacenar sacarosa en sus tallos, ser fuente de alimento y ser un cultivo bioenergético (Moore, Paterson & Tew, 2014). El cultivo de la caña de azúcar es desarrollado en casi 100 países sobre un área de 23,8 millones de Hectáreas, que corresponde a cerca del 1,5% del área total de tierra cultivada en el planeta (Moore, Paterson & Tew, 2014).

La caña es originaria de Nueva Guinea (Indonesia y Papua) y arribó a Colombia a principios del siglo XVI, donde fue sembrada por primera vez en Santa María antigua del Darién y posteriormente en Cartagena y Buenaventura (Murcia y Ramírez, 2015). Las variedades actualmente cultivadas pertenecen a la especie *Saccharum officinarum*, a las cuales se les conoce como cañas nobles, y se considera que fueron domesticadas a partir de *S. robustum* (Insuasty *et al.*, 2003).

1.2 Morfología de la Caña de Azúcar

El conocimiento de la morfología de la planta permite diferenciar y reconocer las especies y variedades existentes y asociarlas con comportamientos en rendimiento y adaptabilidad. Las partes básicas de la estructura de la planta son la raíz, el tallo, las hojas y la flor (Osorio, 2007).

- Raíz: Constituye el órgano de sostén y el medio para la absorción de nutrientes y agua. En la planta de caña se distinguen dos tipos de raíces (Figura 1-1): Las raíces primordiales que corresponden a las raíces de la estaca original de siembra, son muy

ramificadas y su periodo de vida llega hasta los 3 meses de edad (Osorio, 2007), estas raíces, son reemplazadas por las raíces de los brotes, que son más robustas, emergen de la base o anillo de crecimiento del brote que se está desarrollando (Rae *et al.*, 2014) y son conocidas como raíces permanentes al formar el principal sistema radicular de la planta (Osorio, 2007).

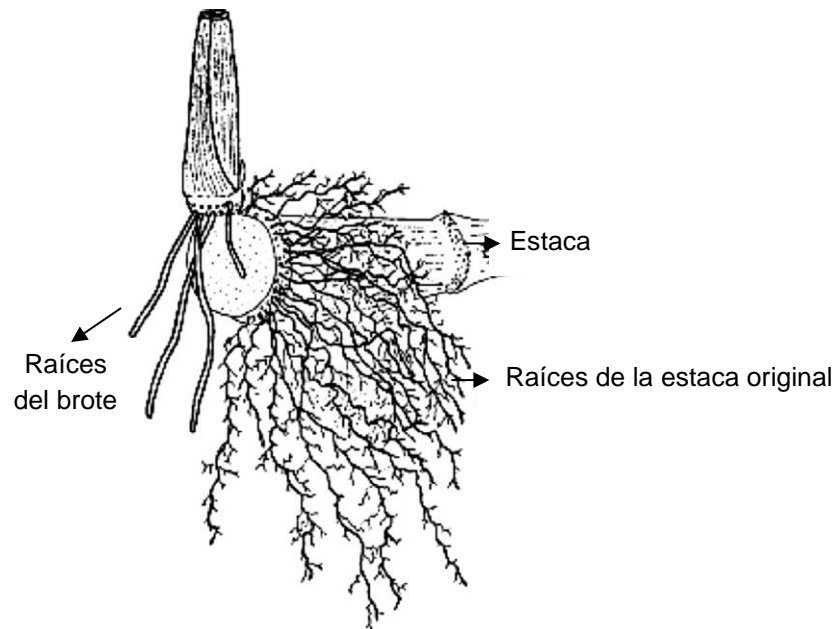


Figura 1-1. Sistema Radicular de la caña (Bonnett, 2014)

▪ Tallo: Es el órgano donde se da la acumulación de azúcares y su número, diámetro y color dependen de la variedad. Pueden ser primarios, secundarios o terciarios dependiendo de la yema de la cual se originan (Figura 1-2) (Osorio, 2007).

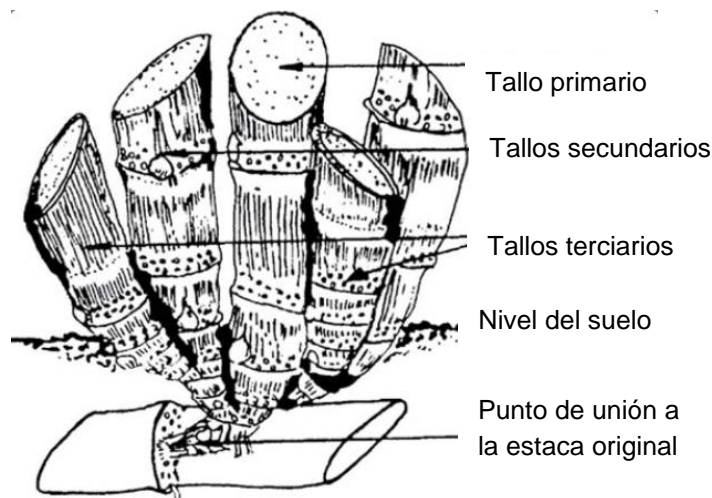


Figura 1-2. Tallos de la caña (Osorio, 2007)

Las partes del tallo son el nudo y el entrenudo, el nudo es la sección más dura y fibrosa y se encuentra conformado por el anillo de crecimiento, la banda de raíces, la cicatriz foliar, la yema y el anillo ceroso (Figura 1-3). El entrenudo por su parte es la porción de tallo localizada entre dos nudos y sus características varían en función de la variedad y las condiciones agroecológicas donde se desarrolla la planta, allí se lleva a cabo la división y la expansión celular para incrementar el tamaño de los tallos de manera radial y longitudinal (Osorio, 2007; Rae *et al.*, 2014).

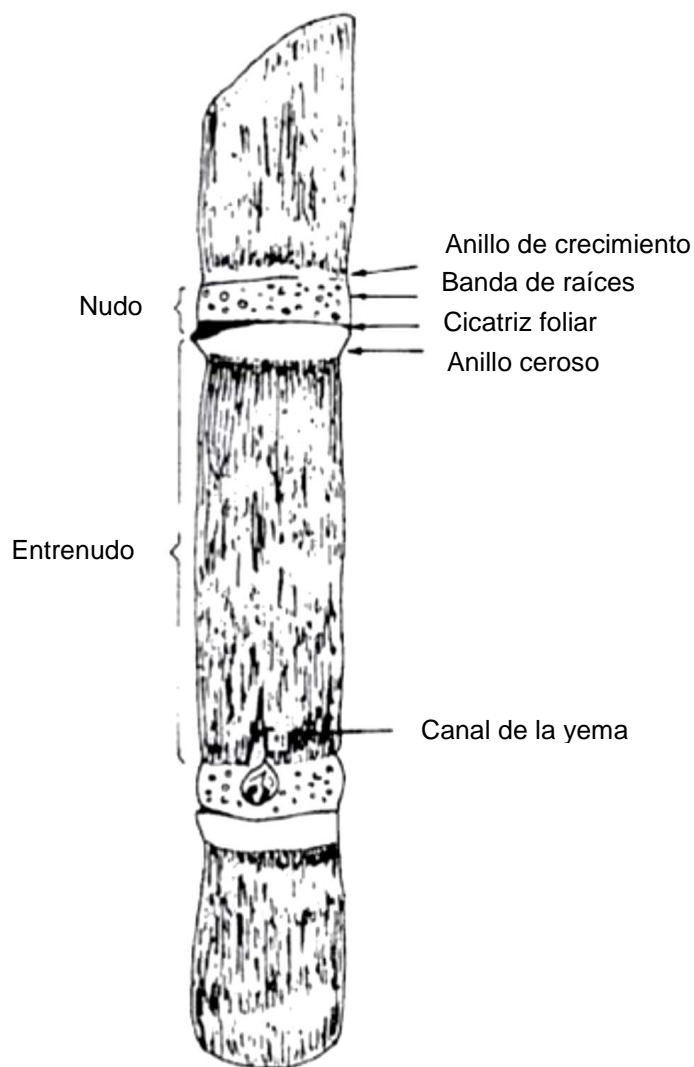


Figura 1-3. Partes del tallo de la caña de azúcar (Osorio, 2007)

- Hojas: Las hojas de la planta de caña se originan en los nudos y se van alternando a lo largo del tallo (Osorio, 2007). Las principales partes de una hoja madura de caña de azúcar son la lámina foliar con un nervio central engrosado, la vaina o yagua que envuelve al tallo en estado inmaduro y a las hojas más jóvenes y la unión entre ellas llamada collar (Figura 1-4) (Rae *et al.*, 2014; Osorio, 2007).

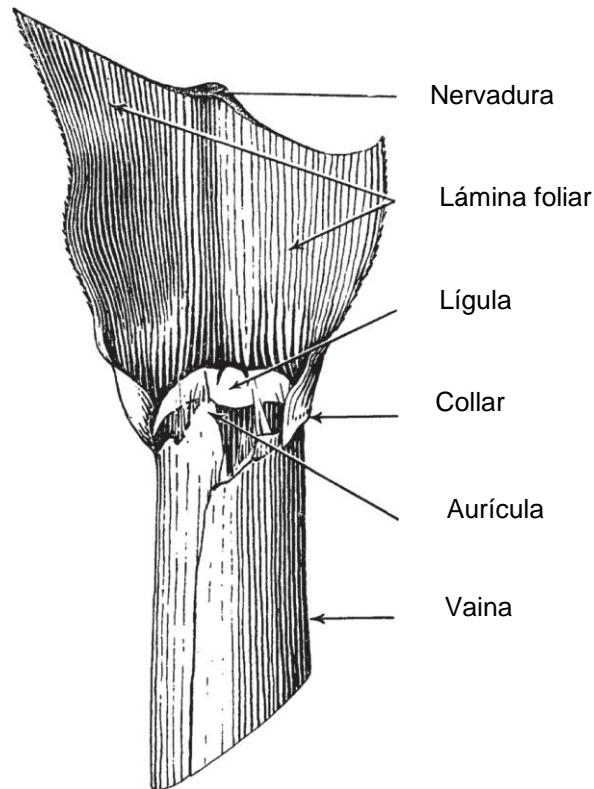


Figura 1-4. Partes de una hoja madura de caña de azúcar (Rae *et al.*, 2014)

1.3 Cultivo de la Caña de Azúcar

Existen dos ciclos de producción básicos de la caña de azúcar. El primero se refiere al ciclo de la planta de caña que comienza con la siembra y finaliza después de la primera cosecha, el segundo, conocido como retoño o soca comienza después de la cosecha de la planta de caña y continúa con sucesivos rebrotes o socas hasta la renovación de la semilla o estaca de siembra (Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011) (Figura 1-5).

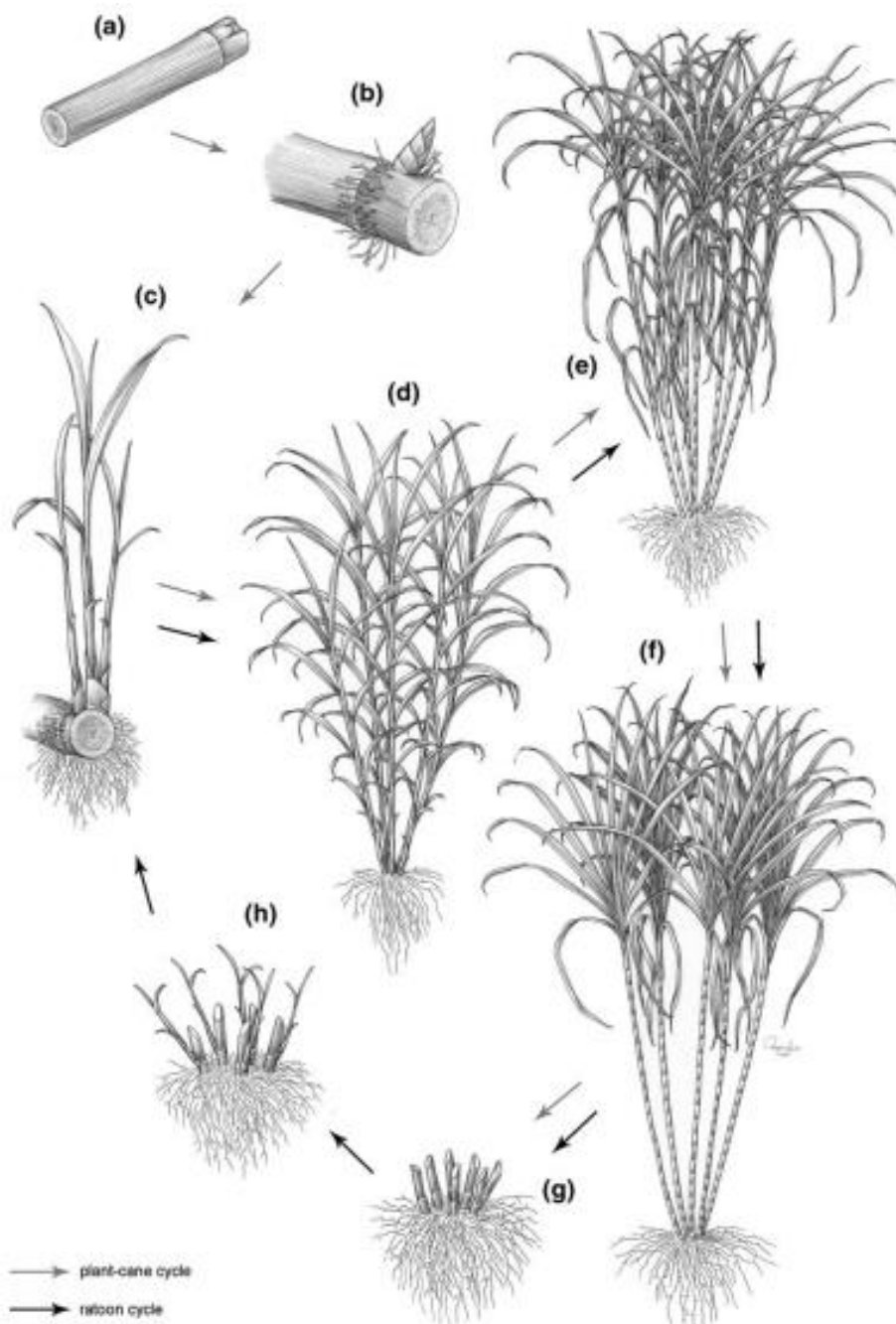


Figura 1-5. Ciclo fenológico de la caña de azúcar. a) Tallos usados en la siembra; b) Inicio de la germinación de las yemas y enraizamiento; c) Inicio del macollamiento; d) Macollamiento Intenso; e) Comienzo de la maduración; f) Tallos en una concentración óptima de sacarosa; g) Cosecha; h) Rebrote o soca de la planta de caña de azúcar. (Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011).

1.3.1 Fases del Ciclo de cultivo

- Germinación y establecimiento: Esta etapa comprende desde la siembra hasta la germinación de las yemas; la germinación puede comenzar entre los 7 y 10 días o extenderse hasta los 30 días después de la siembra, dependiendo de factores externos como la humedad, la temperatura, la aireación del suelo, la variedad, la presencia de la vaina y el tiempo transcurrido entre el corte de la semilla y la siembra. Los factores internos que influyen en la germinación comprenden la salud de la yema, la humedad y el contenido de azúcares reductores de la semilla vegetativa. Una condición adecuada de humedad, temperatura (28-30°C) y aireación asegura una rápida germinación (Santos & Diola, 2015).
- Macollamiento: El macollamiento comienza alrededor de los 40 días después de la siembra y se puede extender hasta los 120 días, es el proceso fisiológico de ramificación subterránea de los nodos compactos del tallo primario. El macollamiento da al cultivo el número de tallos suficientes requerido para una buena producción y depende de factores como la variedad, la luz, la temperatura, la irrigación y la fertilización. El máximo macollamiento se da entre los 90 y 120 días después de la siembra (Santos & Diola, 2015).
- Fase de crecimiento de tallos: El crecimiento de los tallos comienza cerca de los 120 días después de la siembra y se extiende hasta los 270 días en un cultivo de 12 meses, la formación frecuente y rápida de hojas se da en esta fase y bajo condiciones favorables, los tallos crecen rápidamente, alcanzándose hasta 4 o 5 entrenudos por mes (Santos & Diola, 2015).
- Fase de maduración: Esta fase tiene una duración aproximada de 6 meses, comenzando entre los 270-360 días después de la siembra, en esta etapa se da la rápida síntesis y acumulación de azúcares y el crecimiento vegetativo se reduce. Con el progreso de la maduración, azúcares simples como glucosa y fructosa son convertidos en sacarosa (Santos & Diola, 2015).

1.4 La caña panelera

En Colombia, dentro de los cultivos permanentes, la caña de azúcar ocupa el tercer lugar en extensión, luego de la palma de Aceite y el Café. De las 472.914 has sembradas hacia el 2015, el 48,9 % fue destinado a la producción de caña para panela y el restante para la producción de azúcar y mieles, hacia este mismo año, la producción de caña panelera fue de 1'223.607 toneladas (MADR, 2017). En este escenario, Colombia se ha posicionado como el segundo productor de panela en el mundo, después de la India, con una participación del 15% en el mercado global.

En Colombia, la panela se produce en 28 departamentos y 543 municipios. De acuerdo con la Federación Nacional de Productores de Panela (2012a), en área cultivada, Cundinamarca es el departamento con mayor extensión (22,76%) seguido por Antioquia (17,88%), Santander (16,59%) y Boyacá (7,82%), sin embargo, los departamentos con mayor rendimiento son Santander, Boyacá, Valle del Cauca, Huila y Nariño (Rodríguez, 2014; Murcia y Ramírez, 2015).

1.4.1 Importancia socioeconómica de la caña panelera

La producción panelera en Colombia representa el 1,5 % del PIB agropecuario del país y el 2,9% del PIB exclusivamente agrícola. Hacia el 2009 se registraron 91.176 unidades productoras de caña para panela y 17.700 trapiches paneleros inscritos ante el INVIMA, de los cuales, 57 registran actividades de exportación de panela (Fedepanela, 2009; Murcia y Ramírez, 2015).

La caña panelera es un producto fundamental para el mercado laboral en el sector agropecuario de Colombia. En el 2012 fue el segundo cultivo permanente que generó más empleos directos, al superar los 282 mil, y fue el tercero con más indirectos, superando los 564 mil (Finagro, 2014). En este contexto, alrededor de este producto se teje una de las agroindustrias rurales más importantes del país, con cerca de 70.000 productores asociados, además, el hecho de que el 80% de la producción se desarrolle en fincas de menos de 5 has, hace que este cultivo sea de gran importancia en la economía campesina del país (USDA, 2016).

1.4.2 Características de la producción panelera en Colombia

La producción panelera en Colombia se desarrolla en contextos regionales diferentes, generándose varios escenarios con unas características tecnológicas y socioeconómicas determinadas. Durán *et al.*, (2014), relacionan que los dos modelos definidos en la producción de caña panelera responden básicamente al sistema de corte o cosecha, encontrándose regiones productoras de corte por entresaque, donde se recolecta la caña dependiendo de la maduración en el cultivo, como en Cundinamarca (DANE, 2017) y regiones de corte por parejo, donde se realiza un corte total en un momento determinado como en la Hoya del Río Suárez, región ubicada entre Boyacá y Santander.

Lo anterior, ha conducido a que existan entre dichas zonas grandes diferencias en las prácticas de manejo agronómico como el sistema de siembra, los planes de fertilización y nutrición, el control de plagas, enfermedades y malezas y la renovación de lotes y sustitución de variedades tradicionales, lo cual ha incidido a su vez, en los rendimientos por unidad de área tanto en caña como en panela. (Durán *et al.*, 2014).

El rendimiento promedio del cultivo se encuentra en 6,1 Ton.ha⁻¹, sin embargo, en regiones como la Hoya del Río Suarez se pueden alcanzar hasta 11,32 Ton.ha⁻¹ (MADR, 2017).

La región geográfica de la Hoya del Río Suárez se ha relacionado como la principal zona productora de panela de Colombia. En ella se encuentran establecidas cerca de 42.000 hectáreas, y se produce aproximadamente, el 32% de la panela de Colombia (Fedepanela 2012). En este escenario, la siembra se desarrolla a chorrillo, cosecha con corte parejo, mecanización en diferentes labores, uso de fertilizantes en mayores dosis, pendientes leves, cultivos con áreas superiores a 7 hectáreas y rendimientos mayores por su nivel tecnológico (DANE, 2011). En esta zona, la variedad RD75-11 se encuentra establecida en cerca del 70% de los cultivos comerciales y se caracteriza por la amplia adaptación edafoclimática, tolerancia a las principales enfermedades de importancia económica, y de alta producción de biomasa y panela por unidad de área (Durán *et al.*, 2014).

Por otro lado, se encuentran explotaciones a pequeña escala ubicadas al occidente de Cundinamarca, y en municipios de clima medio de Antioquia, Tolima, Huila y Norte de Santander, allí se desarrolla la explotación panelera bajo un esquema de economía campesina y se constituye el escenario más representativo del país (Rodríguez, 2004).

En este modelo de producción, se desarrolla siembra en cajuela, con corte por entresaque, sin mecanización, poca o nula fertilización, la mano de obra es familiar y las fincas no poseen una extensión mayor a las 7 hectáreas (Fedepanela, 2009), además, los cultivos tienen más de 20 años y hay bajos índices de renovación de semilla, predominando la siembra de la variedad POJ 2878 (DANE, 2017). En este sentido, la baja incursión de tecnologías ha influido en los bajos rendimientos (Rodríguez, 2004).

1.5 Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal

La rizósfera es la zona que rodea las raíces de las plantas y en la cual se desarrollan complejas relaciones entre las especies vegetales, los microorganismos y el suelo (Nadeem *et al.*, 2015). Hiltner (1904) relaciona que esta es una región donde se presenta la máxima actividad microbiana, razón por la cual, también ha sido considerada como un “*hot spot*” para la actividad microbiana, donde la diversidad de interacciones está basada en complejos intercambios y cuya naturaleza neutral, benéfica o perjudicial es regulada por una compleja señalización molecular (Dardanelli *et al.*, 2010).

Las interacciones benéficas que se dan en la rizósfera pueden influir significativamente en el crecimiento de las plantas y por lo tanto, tener un efecto positivo en la producción de los cultivos. Los exudados radiculares consisten en una diversidad de compuestos orgánicos como auxinas, azúcares, vitaminas y flavonoides y esta variedad hace que microorganismos como las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (RPCV), puedan colonizar las raíces de las plantas y se encuentren en altas concentraciones alrededor de las raíces empleando estos compuestos como fuentes de carbono y energía (Nadeem *et al.*, 2015; Kloepper y Schroth, 1978).

1.5.1 Clasificación de las RPCV

Las RPCV pueden ser clasificadas de acuerdo con tres criterios: su localización, su función y su actividad (Figura 1-6) (Sharma *et al.*, 2017).

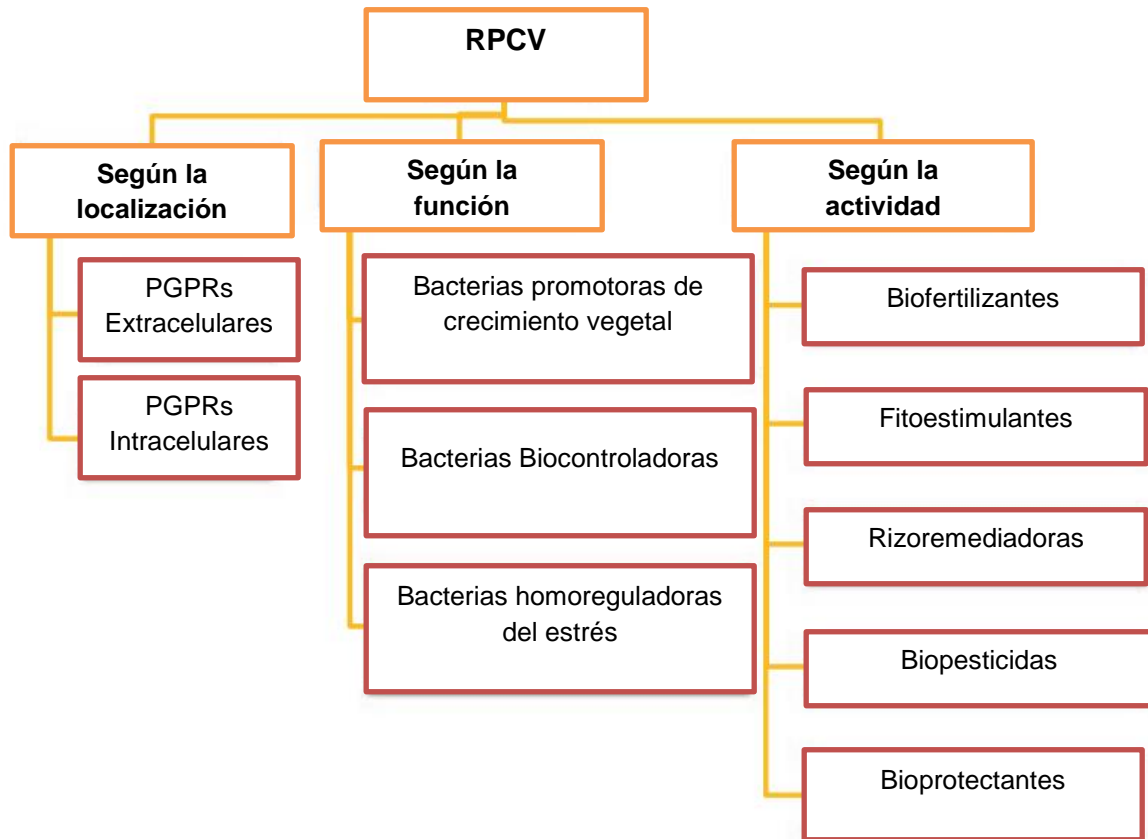


Figura 1-6. Clasificación de las Rizobacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (Modificado de Sharma *et al.*, 2017)

- Según la localización: De acuerdo con su ubicación en la rizosfera, pueden ser clasificadas como RPCV extracelulares (eRPCV) si se encuentran en la rizosfera, el rizoplano o en los espacios intercelulares del córtex de la raíz o como RPCV intracelulares (iRPCV) si se ubican dentro de las células, generalmente, formando una estructura nodular especializada (Martinez-Viveros *et al.*, 2010).
- Según la función: Se dividen a su vez en tres grupos, el primero corresponde a las rizobacterias capaces de promover el crecimiento mediante la fijación biológica de nitrógeno (N), la producción de fitohormonas, la producción de sideróforos o la

solubilización de fosforo (P); El segundo grupo incluye aquellas bacterias que pueden promover de manera indirecta el crecimiento vegetal mediante la liberación de sustancias como ácido cianhídrico, quitinasas, pectinasas, lipopéptidos y antibióticos que son responsables del control de patógenos en plantas; Por último, se encuentran las bacterias homeoreguladoras del estrés o PSHR por sus siglas en inglés, el término fue propuesto por Cassan *et al.*, (2009), para referirse a aquellas bacterias que pueden favorecer el crecimiento vegetal bajo condiciones de estrés, ya sea por la liberación de moléculas activas como el ácido abscísico, el ácido salicílico y el ácido jasmonico, que regulan la tolerancia al estrés en plantas, la liberación de poliaminas como la cadaverina o mediante la actividad de enzimas como la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa (Sharma *et al.*, 2017).

- Según la actividad: Somers *et al.*, (2004) clasifican las RPCV como Biofertilizantes si participan en el ciclaje de nutrientes mediante diferentes mecanismos, fitoestimuladoras si producen sustancias reguladoras de crecimiento vegetal, rizoremediadoras si pueden favorecer la degradación de herbicidas, pesticidas y otros contaminantes del suelo, biopesticidas si producen antibióticos o sustancias que controlan fitopatogenos y bioprotectantes si favorecen la supresión de enfermedades.

1.5.2 Principales mecanismos de las RPCV

- Producción de sustancias reguladoras de crecimiento vegetal

Uno de los mecanismos de promoción de crecimiento de las RPCV que ha sido ampliamente estudiado es la producción de sustancias reguladoras de crecimiento vegetal o fitohormonas (Nadeem *et al.*, 2015), estas sustancias, pueden estimular varios procesos en la planta como la división celular, la elongación de la raíz, la floración o la fructificación (Jordán y Casaretto, 2006; Cassán *et al.*, 2009). Dentro de estas fitohormonas se encuentran las auxinas, las giberelinas, el ácido abscísico y las citoquininas (Nadeem *et al.*, 2015).

La síntesis microbiana de auxinas y en particular del ácido indol-3-acético (AIA) ha sido extensamente estudiada, de hecho, se ha reconocido que actúa como una molécula señal en los microorganismos al regular la expresión génica y que de manera similar,

participa como una molécula señal recíproca en las interacciones planta-microorganismo (Spaepen & Vanderleyden, 2011), lo cual implica que el efecto de promoción de estas sustancias requiera de unas vías de señalización en la planta huésped.

El AIA exógeno controla varios procesos implicados en el desarrollo de las plantas, es así, como bajas concentraciones pueden estimular la elongación de raíces primarias, mientras que altos niveles de AIA estimulan la formación de raíces laterales, disminuyen la longitud de las raíces primarias e incrementan la formación de pelos radiculares (Vacheron *et al.*, 2013).

El AIA de origen microbiano es sintetizado usualmente por las rizobacterias a partir del triptófano, el cual está presente en los exudados radiculares a diferentes concentraciones en función del genotipo de la planta (Kamilova *et al.*, 2006); a partir de este precursor, se han descrito cinco rutas de producción de AIA: la vía indol-3-acetamida, la vía indol-3-piruvato, la vía de la triptamina, vía de la oxidasa-cadena lateral de triptófano y la ruta indol-3-acetonitrilo, algunas de estas rutas, son similares a las descritas para las plantas (Spaepen & Vanderleyden, 2011).

Una de las rutas que han sido ampliamente descritas para la síntesis de AIA es la vía del ácido indol-pirúvico, allí participa la enzima Indol-3-piruvato descarboxilasa, que es codificada por el gen *ipdC*. Patten & Glick (2002) encontraron una disminución entre un 35 y 50% de la longitud de la raíz de plantas de canola inoculadas con una cepa mutante para el gen *ipdC* de *Pseudomonas putida* sugiriendo que el AIA bacteriano cumple un papel relevante en el desarrollo del sistema radicular de plantas huésped.

- Solubilización de fósforo

El P es el segundo elemento más importante en la nutrición de las plantas después del N, debido a su importante papel en procesos metabólicos como la fotosíntesis, la transferencia de energía, la biosíntesis de macromoléculas y la respiración (Khan *et al.*, 2010). Solo el 0,1% del total de P en el suelo existe en formas solubles disponibles para las plantas, el resto, se encuentra formando complejos minerales insolubles o inmovilizado en la materia orgánica del suelo (Sharma *et al.*, 2013), hecho que lo convierte en uno de los elementos más limitantes en la productividad de los cultivos.

La fijación del P o remoción del P disponible de la solución del suelo a la fase sólida del mismo, se da por la sorción del fosfato en la superficie de los minerales del suelo o por la precipitación con iones como Fe^{+3} y Al^{+3} , este fenómeno se da en 1018 millones de hectáreas en el trópico y lleva al uso excesivo de fertilizantes, cuya eficiencia no supera el 30% (Sharma *et al.*, 2013).

El uso de RPCV con capacidad de solubilización de P es considerada como una alternativa para hacer un uso eficiente de este elemento y para favorecer el crecimiento de las plantas (Figueiredo *et al.*, 2016). Entre los géneros bacterianos más estudiados por su capacidad para solubilizar fosfatos se encuentran *Pseudomonas* y *Bacillus*, así como también especies de *Rhizobium* y varios hongos como *Aspergillus* y *Penicillium* (Shahid *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2010).

Desde 1948 Pikovskaya sugirió que los microorganismos podrían mejorar la disponibilidad de P en los suelos y a partir de allí, se han empleado diferentes metodologías y medios de cultivo para su evaluación, entre ellos el medio Pikovskaya (1948) y el medio NBRIP (National Botanical Research Institute's phosphate) (Nautiyal, 1999), sin embargo la selección de la fuente de fósforo insoluble a emplear para la bioprospección de solubilizadores de P dependerá del tipo de suelo donde el microorganismo será usado, Bashan *et al.*, (2013) han sugerido emplear fosfatos de calcio incluyendo la roca fosfórica para suelos alcalinos, fosfatos de aluminio e hierro para suelos ácidos y fitatos para suelos ricos en materia orgánica.

Varios estudios han sugerido diferentes mecanismos que median la solubilización de P por parte de los microorganismos, entre ellos se incluye la producción de ácidos orgánicos, sideróforos, protones, iones hidroxilo, CO_2 y H_2S (Alori *et al.*, 2017).

Los ácidos orgánicos producidos en el espacio periplásmico por el metabolismo oxidativo (Zhao *et al.*, 2014) pueden generar una disminución en el pH, quelación de los cationes unidos al P, formación de complejos con los iones metálicos que se unen al P o competir de manera directa con el P por los sitios de adsorción en el suelo (Sharma *et al.*, 2013).

Los principales ácidos asociados a esta actividad incluyen el ácido gluconico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico y ácido aspártico (Sharma *et al.*, 2013), sin embargo, se ha encontrado que no siempre existe una correlación entre la disminución de pH producto de ácidos orgánicos y la cantidad de P solubilizado. Alori *et al.*, (2017)

relacionan que un mecanismo alternativo es la liberación de H^+ a cambio de la captación de cationes. Se ha reportado que la asimilación de NH_4^+ está acompañado de la liberación de protones que llevan a la solubilización de P por reacciones de sustitución sin la producción de ácidos orgánicos (Sharma *et al.*, 2013).

- Mineralización de ácido fitico

La mineralización del P orgánico del suelo tiene un papel muy relevante en el ciclo del P dentro los sistemas agrícolas, sobre todo, si se tiene en cuenta que el P orgánico puede constituir hasta el 50% del P total en el suelo, encontrándose en su mayoría como inositol fosfato o fitato (Sharma *et al.*, 2013; Alori *et al.*, 2017).

Diferentes enzimas están involucradas en la mineralización de P, entre estas, se encuentran las fosfatasas ácidas-no específicas o NSAPs y las fitasas, estas últimas median la degradación del fitato y la presencia de mineralizadores de fitato en la rizosfera pueden compensar la incapacidad de la planta de adquirir P directamente de este compuesto (Richardson & Simpson, 2009).

Una amplia proporción de microorganismos del suelo y la rizosfera son capaces de utilizar el fitato como fuente de carbono y de P, entre estos se encuentran cepas microbianas pertenecientes a los géneros *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Sporotrichum* sp, *Aspergillus* sp y *Chaetomium* sp (Ryu *et al.*, 2005; Singh & Satyanarayana, 2010; Hayes *et al.*, 2000; Tarafdar & Gharu, 2006; Singh & Satyanarayana, 2011).

- Actividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa

La productividad de los cultivos puede verse afectada por diversos tipos de estreses bióticos y abióticos que incluyen la alta radiación, inundación, sequía, presencia de metales tóxicos y contaminantes en el suelo, así como presencia de patógenos, incluidos virus, bacterias, hongos y nemátodos (Govindasamy *et al.*, 2011), la inhibición del crecimiento vegetal ocurre generalmente por los elevados niveles de etileno que se producen bajo estas condiciones. El etileno es sintetizado en los tejidos de la planta a partir del precursor 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) y retarda el crecimiento de la raíz a la vez que genera senescencia en la planta (Nadeem *et al.*, 2012).

Hay RPCV que pueden emplear ACC como fuente de nitrógeno haciendo uso de la enzima ACC deaminasa, la cual cliva el precursor ACC y esto genera una disminución en los niveles de etileno en la planta (Nadeem *et al.*, 2012).

Glick *et al.*, (1998) propusieron un modelo para explicar lo anterior (Figura 1-7), según el cual, la rizobacteria se une a la superficie de la planta, generalmente la raíz y en respuesta al triptófano y otras pequeñas moléculas presentes en los exudados, sintetiza y secreta AIA, el cual es captado por la planta. El AIA de origen microbiano junto con el AIA endógeno, puede estimular la proliferación y elongación celular o inducir la transcripción de la ACC-sintasa, enzima que cataliza la producción de ACC, parte del ACC es exudado a través de las raíces u hojas, y es en ese momento donde puede ser metabolizado por las bacterias que se encuentran asociadas para producir amoníaco y α -cetobutirato. En este modelo, las bacterias que posean esta enzima, pueden disminuir el efecto deletéreo del etileno bajo condiciones de estrés (Govindasamy *et al.*, 2011).

Varios estudios relacionan que la actividad ACC deaminasa está ampliamente distribuida en bacterias del suelo pertenecientes a los géneros *Alcaligenes*, *Variovorax*, *Rhodococcus*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, así como en especies de *Rhizobium*. También se han reportado bacterias filoféricas del género *Methylobacterium* de arroz, positivas para esta actividad (Chinnadurai *et al.*, 2009; Govindasamy *et al.*, 2011).

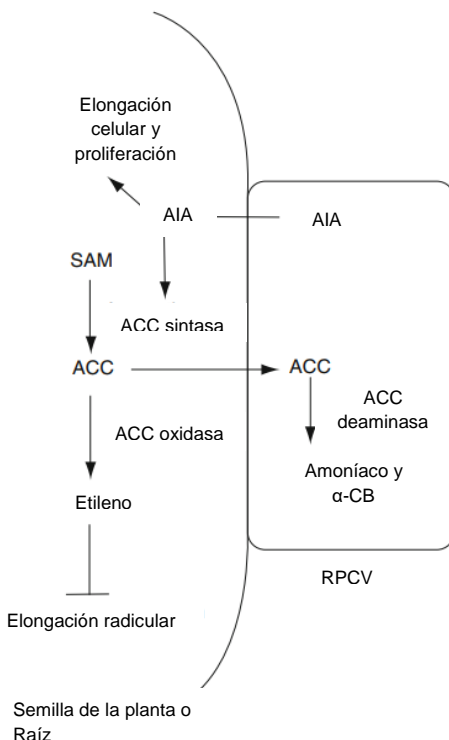


Figura 1-7. Modelo explicativo de como las RPCV acc deaminasa positivas disminuyen la concentración de etileno y, por tanto, evitan la inhibición de la elongación radicular. AIA: ácido indolacético, SAM: S-adenosil metionina, ACC: 1-aminociclopropano-1-carboxilato, α -CB: α -cetobutirato. (Modificado de Glick *et al.*, 1998)

- Actividad biocontroladora

Existen RPCV que pueden promover de manera indirecta el crecimiento de las plantas al tener actividad biocontroladora sobre organismos fitopatogenos que afectan diferentes cultivos, dicho efecto, se puede dar mediante diferentes mecanismos como la producción de sideroforos, que limitan la disponibilidad de hierro (Fe) para los fitopatogenos, producción de antibióticos, producción de sustancias antifúngicas e inducción de resistencia sistémica en las plantas (Akhtar & Siddiqui, 2010).

Uno de los mecanismos más efectivos para controlar la proliferación de fitopatogenos es la síntesis de antibióticos por RPCV; se han reportado diferentes metabolitos como butirolactonas, 2,4 diacetilfloroglucinol (DAPG), lipopéptidos cíclicos, ácido cianhídrico (HCN), oligomicina A y fenacinas, entre otros (Akhtar & Siddiqui, 2010). De hecho, con el fin de demostrar el papel de los antibióticos en el biocontrol, se han desarrollado mutantes incapaces de producir los antibióticos o con genes sobre-expresados, y se han usado genes reporteros o sondas para evidenciar la producción directamente en la rizosfera (Compant *et al.*, 2005; Akhtar & Siddiqui, 2010).

Otro de los mecanismos usados por los agentes de control biológico involucra la producción de enzimas degradadoras de pared celular; enzimas como la β -1-3 glucanasa, quitinasas, celulasas y proteasas secretadas por cepas Biocontroladoras ejercen un efecto inhibitorio en el crecimiento de las hifas de hongos fitopatogenos (Labuschagne, *et al.*, 2010).

Las RPCV también pueden elicitar inducción de resistencia sistémica (ISR) en las plantas al aumentar la resistencia física y mecánica de la pared celular y generar cambios en las reacciones fisiológicas y bioquímicas del huésped, llevando a la síntesis de sustancias como quitinasas, peroxidasas y proteínas relacionadas con patogénesis (PR) (Labuschagne *et al.*, 2010).

- Fijación biológica de Nitrógeno

El N es un elemento fundamental para la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y otros compuestos orgánicos, hecho que lo convierte en uno de los principales nutrientes de las plantas, y a su vez, en uno de los más limitantes dentro de los sistemas agrícolas, debido a las pérdidas por volatilización, escorrentía y lixiviación (Reddy, 2014).

La fijación biológica de N aporta cerca del 60% de la entrada de N anual a la biosfera, y es desarrollada por un grupo limitado de bacterias y arqueas, que son conocidos como diazotróficos y poseen el complejo enzimático conocido como nitrogenasa (Newton, 2007).

Los organismos diazotróficos generalmente son categorizados como bacterias simbióticas o no simbióticas, las primeras incluyen a miembros de la familia Rhizobiaceae, los cuales forman simbiosis con plantas leguminosas (*Rhizobium*) y con no leguminosas (*Frankia*) y las segundas (de vida libre, asociativas o endofíticas) incluyen algunas cianobacterias (*Anabaena*, *Nostoc*), y los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter* y *Azoarcus*, entre otros (Bhattacharyya y Jha, 2012). De hecho, también se ha relacionado la actividad nitrogenasa en bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* (Park *et al.*, 2005; Madhaiyan *et al.*, 2011).

La estructura del complejo enzimático de la nitrogenasa fue dilucidada por Dean y Jacobson (1992) como una metaloenzima de dos componentes proteicos. El componente homodimérico NifH (proteína de hierro) transfiere electrones al segundo componente: la proteína heterotetramérica hierro-molibdeno (NifDK), la cual alberga el sitio catalítico que contiene un único cofactor hierro-molibdeno donde ocurre la reducción del N₂. (Fernandes *et al.*, 2014).

1.6 Bacterias aerobias formadoras de endospora (BAFEs)

Las Bacterias Aerobias Formadoras de Endosporas (BAFEs) corresponden a un grupo de bacterias, generalmente pertenecientes al género *Bacillus* que se caracterizan por la capacidad de producir un tipo de célula latente denominada endospora en presencia de oxígeno. Sin embargo, se ha relacionado recientemente que el género *Bacillus* puede incluir algunos anaerobios estrictos y organismos no esporulados. Existen más de 150 especies de *Bacillus* y al menos la mitad de ellos han sido encontrados en suelos. (Stanier *et al.*, 1992; Logan & Halket, 2011).

Se ha reconocido que las BAFEs son ubicuas y muy cosmopolitas en los sistemas agrícolas y que dentro de las características que permiten su amplia distribución y supervivencia se encuentran además de la formación de endosporas, la formación de una

pared celular “multicapa”, la secreción de péptidos antibióticos y enzimas extracelulares (Beneduzi y Pasaglia, 2011).

Logan & Halket (2011) relacionan que las especies más conocidas de *Bacillus* son *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* y *B. thuringiensis*, además, refieren que existen subgrupos filogenéticos o “cluster” en la taxonomía de *Bacillus*: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides* y *B. weihenstephanensis* conforman el grupo de “*Bacillus cereus*” y son especies patógenas, el otro subgrupo es el de “*Bacillus subtilis*” e incluye a *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformes* y otras especies cercanas.

Muchos termófilos obligados que fueron ubicados originalmente en el género *Bacillus*, fueron transferidos al género *Geobacillus*, que ahora comprende cerca de 16 especies, y especies como *B. sphaericus* y *B. fusiformis* con características distintivas como la presencia de lisina en el polímero peptidoglicano de la pared celular han sido ubicados en el género *Lysinibacillus*.

Luego del género *Bacillus*, *Paenibacillus*, con 110 especies, es el segundo grupo más grande de Bacterias aerobias formadoras de endosporas; Los miembros de este género están ampliamente distribuidos en el suelo, asociados con plantas y varias especies tienen capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Logan & Halket, 2011).

1.6.1 Ecotipos de *Bacillus*

Cohan y Perry (2007) relacionan que en los últimos años varios estudios ecológicos han demostrado que una especie bacteriana puede ser típicamente un conjunto de organismos estrechamente relacionados que representan poblaciones ecológicamente distintas. Usan el término “ecotipo”, para referirse a “un grupo de bacterias que son ecológicamente similares entre sí y cuya diversidad genética está limitada por una fuerza cohesiva, ya sea selección periódica o deriva genética, o ambas”.

Koeppel *et al.*, (2008) relacionan que, debido a la ausencia de unas directrices teóricas, los métodos actuales de sistemática bacteriana no contemplan la división del dominio bacteriano en unidades significativas de ecología y evolución, en este sentido, ellos proponen un enfoque conocido como “simulación de ecotipos” para modelar la dinámica evolutiva de poblaciones bacterianas e identificar ecotipos dentro de una comunidad

natural. Connor *et al.*, (2010) muestrearon bacterias del clado *B.subtilis*-*B.licheniformis* de sitios que resultan contrastantes en exposición solar y textura del suelo, en el “Parque nacional del valle de la muerte” en California, EEUU; dentro de este clado, hipotetizaron demarcaciones de ecotipos basados en diversidad de secuencias de ADN empleando dos algoritmos conocidos como ES (ecotype simulation) y AdaptML. Producto de estas investigaciones, encontraron que los ecotipos demarcados son diferentes en sus asociaciones con la exposición solar y la textura del suelo y sugieren que estos y los parámetros ambientales se encuentran entre las dimensiones de la divergencia ecológica para los ecotipos de *Bacillus* recientemente divergentes.

En este contexto, se sugiere que un ecotipo bacteriano estaría más cerca del concepto de especie: grupos ecológicamente distintos que pertenecen a linajes evolutivos genéticamente cohesivos e irreversiblemente separados. El estudio de los ecotipos, por tanto, enriquecería la sistemática bacteriana al identificar grupos bacterianos no reconocidos previamente, y proporcionaría una base natural muy necesaria para la ecología microbiana, de hecho, estas diferencias, que llevan a la demarcación de los ecotipos, permitirían inferir sobre los tipos de adaptaciones ecológicas que pueden acumularse en periodos de tiempo muy cortos y que pueden fomentar la coexistencia entre las poblaciones más estrechamente relacionadas (Cohan & Perry, 2007; Logan & Halket, 2011).

1.6.2 BAFEs como RPCV

Varias especies de *Bacillus* y *Paenibacillus* son reconocidos como promotores de crecimiento vegetal, los principales mecanismos de promoción incluyen la producción de fitohormonas, solubilización y movilización de P, producción de antibióticos e inducción de resistencia sistémica (Richardson *et al.*, 2009; Kumar & Johri, 2011).

Entre la amplia variedad de antibióticos que producen las bacterias de este género se encuentran la gramicidina, tirotricina (*B.brevis*), bacitracina (*B.licheniformis*), Polimixina, colistina (*B.polymyxa*), pumulina (*B.pumilus*), subtilina, micobacilina (*B.subtilis*), entre otros (Reddy, 2014). También se reporta la producción de péptidos antifúngicos (iturinas) que incluyen las micosubtilinas, bacilomicinas, surfactinas, fungistatinas y subsporinas, así como la producción de otros metabolitos como fitoalexinas, quitinasas, enzimas degradadoras de pared celular y compuestos orgánicos volátiles que elicitán mecanismos

de resistencia en la planta contra el ataque de hongos, bacterias y nematodos (Reddy, 2014).

Son varias las investigaciones que han relacionado la asociación de BAFEs con plantas de caña de azúcar, tal es el caso, de cepas de *Bacillus subtilis*, *B. cereus* y *B. pumilus* que han sido aislados de rizósfera, raíces, tallo y apoplasto de esta planta. (Antwerpen *et al.*, 2002; Hassan *et al.*, 2010; Velazquez *et al.*, 2008).

Madhaiyan *et al.*, (2011) aislaron de suelo rizosférico de caña de azúcar una nueva especie bacteriana diazotrófica que llamaron *Bacillus rhizospareae*, esta cepa presentó actividad ACC deaminasa correspondiente a una producción de 21,2 nmoles de α -cetobutirato.mg proteína⁻¹.h⁻¹, producción de ácido indolacético y actividad de reducción de acetileno de 42,5 nmoles de etileno.h⁻¹.mg de proteína⁻¹, por otra parte, Orberá Ratón *et al.*, (2012) caracterizaron BAFEs aisladas de la rizósfera de plantas de caña de azúcar, estos aislados fueron identificados empleando el marcador filogenético 16S rRNA, en cuatro géneros: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* y *Cohnella*, algunos de ellos, con actividad inhibitoria in vitro contra *Curvularia* y *Fusarium*, el 74% presentaron actividad poligalacturonasa, el 100% actividad endoglucanasa y el 83,3% de los aislamientos fueron capaces de solubilizar fosfato de calcio.

Shankaraiah *et al.*, (2000) estudiaron el efecto de diferentes niveles y fuentes de P bajo la inoculación de microorganismos solubilizadores de P en el crecimiento de la caña de azúcar, encontrando que bajo la inoculación de *B. megaterium* el rendimiento fue más alto (25, 46 t azúcar.ha⁻¹) con un 75% de la fertilización de P en comparación con el control sin inocular y con un 100% de fertilización de P (25, 16 ton azúcar.ha⁻¹), de modo similar, Sundara *et al.*, (2002) encontraron que la aplicación de una bacteria solubilizadora de P (PSB), *Bacillus megatherium* var. *Phosphaticum* incrementa en un 12, 6% el rendimiento de la caña de azúcar, además de que reduce en un 25% las dosis de P requeridos para el cultivo.

Kruasuwan y Thamchaipenet (2016) obtuvieron 135 aislamientos de bacterias endófitas a partir de raíces de plantas de caña de azúcar; basados en análisis del gen rRNA 16S, los endófitos se distribuyeron en 14 géneros, destacándose dentro de los más dominantes, el género *Bacillus*. Para experimentos de promoción de crecimiento vegetal en plántulas de caña de azúcar, se seleccionaron 4 aislamientos y se desarrollaron co-inoculaciones con *Bacillus amyloliquefaciens*, *Enterobacter asburiae* y dos cepas de actinomicetos:

Microbispora hainanensis y *Streptomyces canus* encontrando 60 días después, en los tratamientos inoculados con el aislamiento de *Bacillus* un aumento en la longitud de la raíz (11,43 cm) en comparación con el control sin inocular (6,25 cm) y diferencias en el peso seco de los brotes (5,07g) en comparación con el control sin inocular (2,65 g).

En este contexto, las BAFEs se muestran como un grupo funcional que se ha asociado exitosamente con la caña de azúcar, lo cual las convierte en un grupo de estudio con gran potencial en aras de establecer estrategias de biofertilización para este cultivo.

2. Problema de investigación y objetivos

2.1 Problema de Investigación

2.1.1 Planteamiento del problema

La heterogeneidad en las condiciones socioeconómicas y tecnológicas del cultivo de caña panelera incide en que se encuentren altos y bajos rendimientos en las diferentes regiones productoras del país (Osorio, 2007). Tal es el caso que, en regiones como Santander, el rendimiento es de 13,48 t. ha⁻¹ mientras que en zonas como Cundinamarca, con el doble de área cultivada, el rendimiento solo alcanza las 4,7 t.ha⁻¹ (MADR,2016a), esto, ha llevado a que se reconozcan dos escenarios en torno a este cultivo, el primero donde existe una alta demanda de fertilizantes, que según los productores puede alcanzar hasta 100 Kg de N, 200 Kg de P y 200 Kg de K por hectárea cultivada, lo cual tiene implicaciones no solo ambientales sino relacionadas con un incremento en los costos de producción, de hecho, en la Hoya del río Suárez, se ha relacionado que la fertilización del cultivo representa el 15% de los costos de producción de la panela (Osorio, 2007). Por otro lado, se encuentra el escenario representativo del occidente de Cundinamarca, donde el esquema es netamente extractivo, con ausencia de fertilización y sin renovación de semilla, lo cual ha repercutido en la nutrición de los cultivos y en los bajos rendimientos.

En torno a este panorama, surge la necesidad de poder desarrollar estrategias que mejoren la sostenibilidad de los cultivos, ya sea para lograr la disminución de dosis de fertilización empleadas, en el caso de la Hoya del Rio Suarez o para mejorar la disponibilidad de nutrientes en aquellos cultivos donde no se hace uso de fertilizantes químicos y se ha buscado diversificar el manejo de la panela para poder satisfacer la demanda de mercados orgánicos como es el caso de la zona de Cundinamarca.

El desarrollo de biofertilizantes ha sido una de las estrategias exploradas de manera creciente e implica un amplio proceso de Bioprospeccion, sin embargo, de manera regular, aspectos ecológicos no son tenidos en cuenta, como el hecho de que diferentes condiciones bióticas y abióticas pueden afectar a la comunidad microbiana y sus rasgos bioquímicos, así como su capacidad de promoción de crecimiento vegetal.

En este sentido, las dos regiones en las que se desarrolla el cultivo de la caña panelera de donde fueron obtenidos los aislamientos de BAFEs contempladas en este estudio, presentan unas condiciones contrastantes en términos de características físicas y químicas de los suelos, así como de las condiciones de manejo del cultivo, particularmente en términos de fertilización y renovación de la semilla. Esta situación, plantea una oportunidad para evaluar si dichas condiciones determinan la selección de ecotipos de BAFEs diferentes, que a su vez se evidencien por sus atributos fenotípicos en función de las actividades relacionadas con promoción de crecimiento vegetal.

2.1.2 Justificación

Alrededor del cultivo de la caña panelera se ha consolidado una agroindustria de gran importancia para el país, no solo por los empleos que genera en el sector rural, sino también por la tendencia al alza en las exportaciones de panela, al igual que del precio promedio nacional al productor (MADR, 2016b; Fedepanela, 2012), sin embargo, como se mencionó anteriormente, resulta indispensable ahondar esfuerzos en la búsqueda de estrategias que puedan reducir el uso de fertilizantes químicos y los impactos que esto conlleva, así como mejorar la disponibilidad de nutrientes, bajo esquemas que puedan responder a demandas nacionales e internacionales.

El suelo es uno de los actores más importantes en el mantenimiento de la productividad de los cultivos, por lo que es de gran relevancia entender que allí se desarrollan diversidad de procesos determinados por los microorganismos que lo habitan (Uribe, 2011), al igual, que reconocer que en la rizósfera de las plantas coexisten diferentes organismos que pueden establecer relaciones benéficas con ellas (Barriuso *et al.*, 2008).

En este sentido, el manejo del cultivo de caña panelera en Cundinamarca y la Hoya del Río Suárez bajo las condiciones contrastantes mencionadas anteriormente, en cuanto a edad de cultivo, cultivariedad sembrada y fertilización, podría llevar a la generación de dos nichos ecológicos particulares en la rizosfera de las plantas de caña de cada sitio. Esta situación resulta interesante tanto en procesos de bioprospección de biofertilizantes como en estudios ecológicos y de las características de grupos funcionales que han establecido interacciones allí.

Las BAFEs conforman un grupo funcional con especies que han sido relacionadas como RPCV, por otra parte, la capacidad de desarrollar endosporas se muestra como una

ventaja diferencial puesto que facilita su aislamiento, el desarrollo de formulaciones y potencializa su aplicación en campo (Kumar, Prakash y Johri, 2011; Mondal y Verma, 2002; Perez-García et al, 2011).

En este sentido, y teniendo en cuenta que la aplicación exitosa de estos microorganismos, la obtención de nuevas cepas y el desarrollo de inoculantes, requiere un conocimiento comprensivo de su ecología (Beneduzi y Pasaglia, 2011), lo cual incluye reconocer cómo el manejo agronómico de los cultivos puede determinar o no la funcionalidad de bacterias cultivables, el presente trabajo está orientado a caracterizar un conjunto de BAFEs rizosféricas obtenidas de cultivos de caña con prácticas de cultivo contrastantes y seleccionar aislamientos que puedan favorecer el crecimiento de plantas de caña panelera bajo condiciones de invernadero.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Seleccionar Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora provenientes de cultivos de caña con manejos agronómicos contrastantes, capaces de promover el crecimiento de plantas de caña panelera.

2.2.2 Objetivos específicos

Caracterizar funcionalmente BAFEs aisladas de rizósfera de caña panelera en actividades relacionadas con promoción de crecimiento vegetal bajo condiciones *in vitro*.

Identificar a nivel molecular BAFEs aisladas de rizósfera de caña panelera.

Evaluar bajo condiciones de invernadero aislamientos de BAFEs seleccionadas según sus características *in vitro*.

3. Materiales y métodos

3.1 Aislamientos bacterianos

Los microorganismos empleados en este trabajo provienen de la colección de cepas de Bacterias Aerobias Formadoras de Endosporas de caña panelera establecida por el grupo de investigación en Microbiología Agrícola del IBUN, en el marco del proyecto “Generación de recomendaciones agronómicas y nuevas tecnologías en la producción de panela en Colombia” desarrollado en convenio con CORPOICA. A partir de dicha colección de microorganismos se seleccionaron 25 aislamientos de BAFEs provenientes de la rizosfera de plantas establecidas en Cundinamarca y 27 BAFEs provenientes de la rizósfera de cultivos de la misma especie vegetal establecidos en Santander. La tabla 3-1 muestra las características de los suelos donde se encontraban establecidos los cultivos y las prácticas agronómicas desarrolladas en las fincas donde se realizó el muestreo.

3.2 Identificación molecular de aislamientos de BAFEs

Los aislamientos seleccionados fueron identificados a nivel molecular mediante la amplificación y secuenciación del marcador filogenético 16S rRNA. Para tal fin, se realizó la extracción de ADN genómico a partir de colonias obtenidas en agar TSA luego de 24h de incubación a 30°C siguiendo la metodología de lisis alcalina (Sahoo *et al.*, 2014).

La extracción de ADN se desarrolló a partir de una colonia pura, la cual fue transferida a 50 µL de Buffer de lisis (NaOH (0,05N) y SDS (0,25%)); luego, con el fin de favorecer la disgregación de la pared celular dicha suspensión fue calentada a 95°C durante 15 minutos, posteriormente se adicionaron 200 µL de agua HPLC estéril en cada tubo y se realizó centrifugación a 13 684 xg durante 5 minutos. El ADN obtenido en el sobrenadante fue almacenado a -20°C hasta su uso.

Tabla 3-1. Características químicas y nutricionales de los suelos y cultivos muestreados.

Dpto.	Mpio.	Vereda	Finca	Lote	pH	%MO	P	CIC	%N (calculado a partir de carbono orgánico)	K	Al	Cultivariedad sembrada	Fertilización	Observaciones
Cundinamarca	Nocaima	San Pablo	El Retiro	1	4,8	7,53	14,0	13,4	0,58	0,32	0,27	POJ 2878	Ninguna	Cultivo de 60 años-Corte por entresaque
				2	5,6	9,48	39,3	21,6	0,67	0,96	0,00			
	Villeta	La Masata	El Porvenir	1	6,5	7,15	35,1	32,8	0,49	0,37	0,00	POJ, MZC	Ninguna	Cultivo de 40 años-Corte por entresaque
				2	7,0	7,93	31,4	42,8	0,67	0,24	0,00			
Santander	Güepsa	Platanal	Campo Hermoso	1 y 2	6,0	5,86	86,8	23,3	0,32	1,19	0,00	RD 75-11	NPK a los 2 y 8 meses	Renovación cada 6-7 cortes (5 años)- Corte por parejo
				1	7,4	4,98	5,6	40,9	0,33	0,29	0,00			
	Güepsa	Centro	El Infierno	1	7,4	4,98	5,6	40,9	0,33	0,29	0,00	RD 75-11	NPK a los 3 y 6 meses. Urea, KCl, DAP, Mg	Luego de 100 ton renovación de cultivo-Corte por parejo
				2	5,8	5,51	15,9	25,6	0,33	0,31	0,00			

La amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) se realizó empleando los primers universales 27F y 1492R (Lane, 1991). El volumen final de la mezcla de reacción fue de 50µL, empleando una concentración final de dNTP's, primers y de enzima Biolase DNA pol Bioline®, de 0,2 mM, 0,4 µM y 1U. µL⁻¹, respectivamente.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos seguida de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 55°C por 1 minuto y 72°C por 3 minutos y un ciclo de elongación final de 72°C por 15 minutos. Los productos de PCR obtenidos (aproximadamente 1500 pb) fueron purificados utilizando el kit Promega Wizard® PCR Clean-Up System y secuenciados en el Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular (SSiGMol) del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia.

Las secuencias obtenidas fueron limpiadas empleando el Software Bioedit versión 7.2.5. La identidad de los aislamientos fue confirmada empleando la base de datos curada RDP (Ribosomal Database Project) (Cole *et al.*, 2014), posteriormente, se elaboró un árbol de distancia filogenética mediante el paquete informático MEGA 7 con el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) y haciendo uso de secuencias de referencia obtenidas de la base de datos GenBank del NCBI de las especies de bacterias filogenéticamente más cercanas a las cepas estudiadas.

3.3 Caracterización de BAFEs rizosfericas en actividades relacionadas con promoción de crecimiento vegetal

Los aislamientos fueron reactivados en agar TSA realizando una siembra directa a partir de los crioviales almacenados a -20°C, luego de 24h de incubación a 28±2°C se verificó la viabilidad y pureza y se inocularon en 5 mL de caldo Luria-Bertani (LB); transcurridas 24h de incubación a 28±2°C y 125 rpm, la biomasa fue resuspendida en NaCl 0,85% (P/V) luego de dos lavados sucesivos con la misma solución y ajustada a una densidad óptica de 0.2 medida a 600nm en un espectrofotómetro (Thermo scientific 20 Genesys).

3.3.1 Producción de compuestos indólicos

La determinación de la producción de compuestos indólicos se desarrolló mediante la técnica colorimétrica de Salkowsky (Glickmann y Dessaux, 1995), previo a estos ensayos, se elaboró una curva de calibración de AIA empleando una solución patrón concentrada ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), a partir de la cual, se prepararon soluciones a diferentes concentraciones entre 2 y $30\ \mu\text{g AIA}\cdot\text{mL}^{-1}$, $700\ \mu\text{L}$ de cada una de las soluciones se mezclaron con $700\ \mu\text{L}$ de reactivo de Salkowsky, dicha mezcla reaccionó durante 30 minutos en oscuridad y posteriormente, se realizó la lectura de absorbancia a $540\ \text{nm}$ (Anexo 1).

Para la evaluación de la producción de compuestos indólicos de los aislamientos, se inocularon $100\ \mu\text{L}$ de la suspensión celular ajustada tal como se describe en la sección 3.3, en $9\ \text{mL}$ de caldo LB suplementado con $1\ \text{mL}$ de triptófano a una concentración de $3\ \text{mM}$, luego de tres días de incubación a $28\pm 2^\circ\text{C}$ y $150\ \text{rpm}$, se dispensó $1\ \text{mL}$ de caldo en tubos de microcentrífuga y se centrifugó a $9503\ \text{xg}$ durante 2 minutos, posteriormente, $700\ \mu\text{L}$ del sobrenadante fueron mezclados con $700\ \mu\text{L}$ de reactivo de Salkowsky, la mezcla reaccionó durante 30 minutos y la absorbancia de cada una de las muestras fue leída a $540\ \text{nm}$ en un lector de microplacas.

3.3.2 Solubilización de fosfatos

Se evaluó la capacidad de los aislamientos de BAFEs de solubilizar dos fuentes de fósforo inorgánico siguiendo la prueba analítica del Spectroquant® Fósforo de Merck.

La metodología desarrollada consistió en suplementar $15\ \text{mL}$ de medio líquido NBRIP (Nautiyal, 1999) con $0,5\ \%$ (P/V) de fosfato tricálcico o $0,1\%$ (P/V) de fosfato de aluminio, posteriormente, estos caldos se inocularon por triplicado con $150\ \mu\text{L}$ de la suspensión celular ajustada a una densidad óptica de $0,2$ descrita anteriormente. Luego de 5 días de incubación a $28\pm 2^\circ\text{C}$ y $150\ \text{rpm}$, se centrifugó $1\ \text{mL}$ de caldo a $4\ 656\ \text{xg}$ durante 15 minutos y $250\ \mu\text{L}$ de sobrenadante fueron transferidos a $750\ \mu\text{L}$ de agua destilada estéril, adicionalmente, se dispensaron $240\ \mu\text{L}$ del reactivo Spectroquant® de Merck y se transfirieron $200\ \mu\text{L}$ de la mezcla de reacción de cada una de las muestras al lector de microplacas para medir la absorbancia a $405\ \text{nm}$.

Esta técnica se fundamenta en que los iones ortofosfato libres de la muestra en presencia del ácido sulfúrico que se encuentra en el reactivo, reaccionan con los iones de molibdato, para formar ácido molibdofosfórico; el ácido ascórbico de la solución reduce esta molécula, y forma fosfomolibdeno, un compuesto que puede ser determinado fotométricamente (Merck, 2016).

La curva de calibración, para determinar los mg.L^{-1} de fosfato solubilizado, se construyó a partir de soluciones a diferentes concentraciones conocidas de K_2HPO_4 , la medición se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente (Anexo 1).

3.3.3 Mineralización de ácido fítico

La evaluación de la mineralización de ácido fítico se realizó de manera cualitativa en medio sólido NBRIP suplementado con ácido fítico como fuente de fósforo orgánico, a una concentración de 1% (P/V). El pH del medio fue ajustado a 7.

Se inocularon 10 μL de la suspensión celular ajustada a una densidad óptica de 0,2 descrita anteriormente sobre la superficie del medio empleando 4 réplicas por cada aislamiento. Luego de 5 días de incubación a $28\pm 2^\circ\text{C}$, se realizaron observaciones del crecimiento de colonias y producción de halo con el fin de estimar la eficiencia de mineralización (EM) según la metodología modificada de Kandil (2017):

$$\text{EM} = \frac{\text{diámetro del halo}}{\text{diámetro de la colonia}} * 100$$

3.3.4 Actividad ACC deaminasa

Con el fin de evaluar la actividad 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa en los aislamientos de BAFEs, se siguió la metodología descrita por Jacobson *et al.*, (1994) modificada.

Los aislamientos bacterianos se sembraron en agar TSA y se incubaron a $28\pm 2^\circ\text{C}$, posteriormente, se inocularon 5 mL del medio mínimo M9 modificado, con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de N, luego de 24 horas de incubación a $28\pm 2^\circ\text{C}$ y 150 rpm, la biomasa fue lavada

tres veces con una solución de MgSO_4 (0,1M) y ajustada a una densidad óptica de 0,2 medida a 600 nm en un espectrofotómetro.

En una placa de 96 pozos, 120 μL del medio líquido M9 sin fuente de nitrógeno fue adicionado en cada pozo, en los primeros cuatro carriles de la placa se adicionaron 15 μL de MgSO_4 (0,1M), en los siguientes cuatro, 15 μL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1M) y en los últimos cuatro carriles, 15 μL de ACC (3mM), posteriormente, 15 μL de la suspensión bacteriana de cada una de las BAFEs se colocó en cada pozo con 3 réplicas por aislamiento y fuente de nitrógeno. Las placas fueron incubadas durante 48 horas a $28\pm 2^\circ\text{C}$, transcurrido este tiempo, se midió la densidad óptica a 600nm en un lector de placas. Los valores de densidad óptica obtenidos en los pozos con ACC y con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fueron comparados con la densidad óptica alcanzada por la cepa empleada como control negativo *P.putida* UW4 ACC-deaminase minus facilitada por el Dr Bernard Glick de la Universidad de Waterloo, Canadá, con el fin de determinar si los aislamientos evaluados tienen la capacidad de usar ACC como fuente de nitrógeno para su crecimiento (Habib *et al.*,2016).

3.3.5 Evaluación de la fijación de Nitrógeno

La determinación de la actividad nitrogenasa mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA) se desarrolló siguiendo la metodología modificada de Reis *et al.*, (2015), para este fin, viales de 13 mL con 5 mL de medio NFb suplementado con glucosa y manitol ($4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) se inocularon con 100 μL de una suspensión celular ajustada a una densidad óptica de 0.2 medida a 600 nm, luego de 72h de incubación a $28\pm 2^\circ\text{C}$, los tapones de algodón de los viales fueron reemplazados por tapones de caucho para garantizar condiciones herméticas y el 10% (V/V) del aire atmosférico de cada uno de los viales fue reemplazado por acetileno. Todos los viales fueron llevados nuevamente a incubación a $28\pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas, posteriormente, 1 mL de aire fue retirado de los viales e inyectado en el cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2014, con el fin de detectar la concentración de etileno producido como consecuencia de la actividad de reducción de acetileno. Tanto el acetileno (C_2H_2), como el etileno (C_2H_4), pueden ser identificados mediante cromatografía de gases, usando N como gas de arrastre. La cantidad de etileno producido se calcula mediante una curva estándar.

La técnica de ARA se fundamenta en que la enzima nitrogenasa, que cataliza la reducción biológica del nitrógeno atmosférico puede aceptar otros sustratos además de N₂, caracterizados por tener triple enlace como el acetileno, el cual es reducido a etileno, por tanto, la cantidad de acetileno reducido es una medida de la actividad reductora de la nitrogenasa (Santos *et al.*, 2005).

3.3.6 Antagonismo contra hongos fitopatógenos

Se evaluó la capacidad antagónica de los aislamientos de BAFEs contra tres hongos fitopatógenos, siguiendo el procedimiento descrito por Bautista, Mendoza y Uribe (2007), los hongos empleados fueron *Rhizoctonia solani* aislado de cultivos de arroz, *Botrytis cinerea* aislado de un cultivo de mora y un aislamiento presuntivo de *Sclerotium* aislado de plántulas de caña panelera.

La prueba de antagonismo consistió en sembrar una colonia de los aislamientos reactivados en agar TSA en medio PDA en forma de estría, sobre dos líneas paralelas equidistantes al centro de la caja de Petri. Luego de 24-48 horas de incubación se dispuso en el centro de la caja un cuadrado de agar de 25 mm² con micelio del respectivo hongo.

Las cajas se incubaron por periodos diferentes dependiendo del hongo evaluado: 4 días a 28±2°C para *Rhizoctonia solani*, 5 días a 27°C para *Botrytis cinerea* y 3 días a 28±2°C para el aislamiento presuntivo de *Sclerotium* sp. Como control negativo se sembró un cuadrado de micelio del respectivo hongo en el centro de una caja de Petri sin presencia de las cepas a evaluar, cada aislamiento de BAFE fue evaluado por triplicado. Transcurrido el tiempo respectivo de incubación se procedió a comparar el crecimiento del hongo en las cajas con y sin presencia de bacterias, esto, con el fin de clasificar los aislamientos como positivos para aquellos que inhiben el crecimiento del hongo, limitantes para aquellos que no permiten el crecimiento del micelio más allá de la estría y negativos para aquellos donde el hongo crece sobre la estría alcanzando el borde de la caja.

3.4 Evaluación bajo condiciones de Invernadero

Se evaluaron bajo condiciones de invernadero 5 aislamientos de BAFEs. La tabla 3-2 muestra los tratamientos evaluados.

Tabla 3-2. Tratamientos evaluados en los ensayos de invernadero realizados.

Tratamiento	Aislamiento	Fertilización de N	Fertilización de P
1	2C12	Sin N	120 Kg P ₂ O ₅ .ha ⁻¹ como roca fosfórica
2	2C02	Sin N	120 Kg P ₂ O ₅ .ha ⁻¹ como roca fosfórica
3	6C05	Sin N	120 Kg P ₂ O ₅ .ha ⁻¹ como roca fosfórica
4	6C07	Sin N	120 Kg P ₂ O ₅ .ha ⁻¹ como roca fosfórica
5	S93B1	Sin N	120 Kg P ₂ O ₅ .ha ⁻¹ como roca fosfórica
6	Sin inocular	Sin N	120 Kg P ₂ O ₅ .ha ⁻¹ como roca fosfórica
7	Sin inocular	45 Kg N.ha ⁻¹	120 Kg P ₂ O ₅ .ha ⁻¹ como KH ₂ PO ₄

Se desarrollaron dos evaluaciones a nivel de invernadero, la primera de ellas fue realizada con la variedad POJ 2878 que ha sido cultivada tradicionalmente en la región de Cundinamarca. A partir de un cultivo de caña panelera de aproximadamente 8 meses de edad, establecido en el municipio de Nimaima, Cundinamarca, se obtuvieron las semillas vegetativas que fueron sembradas en bandejas, empleando suelo del mismo cultivo como sustrato; las plántulas de 30 días fueron llevadas al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional (IBUN), sin embargo, dada la heterogeneidad en el tamaño de las plantas y en aras de disminuir la variabilidad de los resultados, se establecieron cuatro rangos de alturas para desarrollar el ensayo, con 6 réplicas por cada tratamiento en cada rango. La definición de los grupos se realizó mediante el método Ward de distancia

euclídeana. Los cuatro rangos de alturas establecidos para las plantas son relacionados en la tabla 3-3.

Tabla 3-3. Rangos de alturas de plantas.

# Rango	Valores
1	21- 30,5 cm
2	30,6- 43 cm
3	43,1 - 51 cm
4	51,1- 66,3 cm

Las plántulas de caña fueron trasplantadas a bolsas con 1 Kg de suelo (Anexo 2, características del suelo empleado), previo al trasplante, se realizó la inoculación de la raíz y la semilla en una suspensión de esporas de cada uno de los aislamientos a evaluar, a una concentración de 1×10^7 esporas. mL⁻¹ durante 30 minutos, en los dos controles sin inocular, la raíz y semilla de las plantas fueron sumergidas en agua destilada durante el mismo periodo de tiempo.

La fertilización con N, P y K se determinó según la aplicación recomendada para caña panelera (Osorio, 2007) y con base en el análisis del suelo empleado. La fertilización fue realizada en el momento del trasplante y adicional a la aplicación de roca fosfórica relacionada en la tabla 3-2, se realizó una fertilización de todas las plantas con KCl (150 Kg K₂O.ha⁻¹ correspondiente a 0,18g KCl.bolsa⁻¹ para los tratamientos 1 al 6 y 0,0026 g KCl.bolsa⁻¹ para el tratamiento 7) y fertilizante Nutrifoliar completo® al momento de la siembra y 8 días después del trasplante, en todos los tratamientos.

Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero durante 60 días, la temperatura osciló entre 20,6 y 40°C, con una humedad relativa entre 12% y 51% y un fotoperiodo de 12 horas luz: 12 horas oscuridad. Como variables de respuesta se midieron el diámetro de tallo, la altura de las plantas y el peso seco de raíz y vástago.

El segundo ensayo de Invernadero fue realizado con la variedad CC93-771 empleada en Santander. La semilla fue obtenida de un cultivo de caña panelera de 8 meses de edad establecido en Güepsa, Santander y sembrada en sustrato inerte (mezcla de ceniza proveniente de residuos de trapiche con gravilla fina de cantera) con el fin de favorecer la germinación, de acuerdo con las especificaciones desarrolladas en el centro de investigación CIMPA de CORPOICA. Luego de 30 días de crecimiento se realizó la selección de plantas de tamaño homogéneo y la inoculación tal como se mencionó para el ensayo con la variedad POJ 2878 y con los mismos tratamientos descritos en la tabla 3-2. Las plantas fueron sembradas luego de la inoculación en bolsas con 1Kg de suelo (Anexo 2) con 26 réplicas por tratamiento. La fertilización en N, P y K se realizó según lo mencionado para el ensayo anterior y al momento de la siembra.

Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de invernadero durante 60 días, la temperatura osciló entre 21 y 43°C, con una humedad relativa entre 11% y 50% y un fotoperiodo de 12 horas luz: 12 horas oscuridad. Como variables de respuesta se midieron el diámetro de tallo, la altura de las plantas y el peso seco de raíz y vástago.

3.5 Análisis estadístico

Para todos los datos se determinó la normalidad a través del Test de Shapiro Wilk y la homocedasticidad a través del test de Bartlett con un nivel de significancia de 0,05. Cuando los datos cumplían con estos supuestos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significancia de 0,05. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para los datos no paramétricos.

El análisis de componentes principales se llevó a cabo en el programa programa R Wizard (Guisande, 2014).

Las pruebas T-student, el test exacto de Fischer y el ANOVA fueron desarrollados con el programa R studio (R core Team, 2012). El nivel de significancia empleado para todas las pruebas fue de 0,05.

4. Resultados y discusión

4.1 Análisis de suelo

Con el objetivo de identificar si existían diferencias en los parámetros fisicoquímicos de los suelos muestreados en las fincas de caña panelera establecidas en Santander y Cundinamarca, de donde se obtuvieron los 52 aislamientos caracterizados en el presente estudio, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) empleando el programa R wizard.

La figura 4-1 muestra que el componente 1 explica el 40.67% de la variación, mientras que el componente 2 explica el 29.98%. Se observa que el pH, el Ca y la CIC se encuentran estrechamente relacionados, al igual que la Materia orgánica, el nitrógeno y el Magnesio en los suelos de estudio.

Las diferencias entre las fincas, explicadas en función del componente 1, podrían estar dadas principalmente por el % de materia orgánica y el % de N de los suelos, sin embargo, el agrupamiento no es totalmente claro, dada la ubicación de los suelos de Campo Hermoso (Santander) y Retiro1 (Cundinamarca) hacia el centro de la figura. El P y el pH por su parte, que son parámetros importantes en suelos, no aportan en la diferenciación o agrupamiento de las fincas.

Sin embargo, La figura 4-2 muestra según un análisis de conglomerados la formación de tres grupos, el primero agrupa a los suelos de las fincas Retiro 1 y Retiro 2, y el segundo agrupa a los suelos provenientes de las fincas Porvenir 1 y Porvenir 2, todas ellas de la región de Cundinamarca, el tercer grupo incluye a los suelos de las fincas Campo Hermoso, Infierno 1 e Infierno 2 provenientes de la región de Santander, sugiriendo de todas formas que los suelos provenientes de ambas zonas se diferencian en función de sus atributos físicos y químicos (Figura 4-2)

Tarazona (2011) relaciona que la materia orgánica cumple un papel decisivo en el mantenimiento de la capacidad productiva de los cultivos de caña panelera, al favorecer el drenaje, la aireación y la actividad biológica del suelo; de acuerdo con los resultados del ACP y la tabla 3-1, estos valores serían mayores en las regiones de Cundinamarca, lo cual

podría relacionarse con el hecho de que en fincas de esta región no se lleva a cabo fertilización química y eventualmente se aplican abonos orgánicos y residuos de cosecha al cultivo. De acuerdo con los rangos críticos de diferentes elementos en caña relacionados por Tarazona (2011), los niveles de materia orgánica de los suelos de fincas de Cundinamarca se encontrarían en un nivel medio, mientras que los suelos de fincas de Santander se encontrarían en nivel medio-bajo.

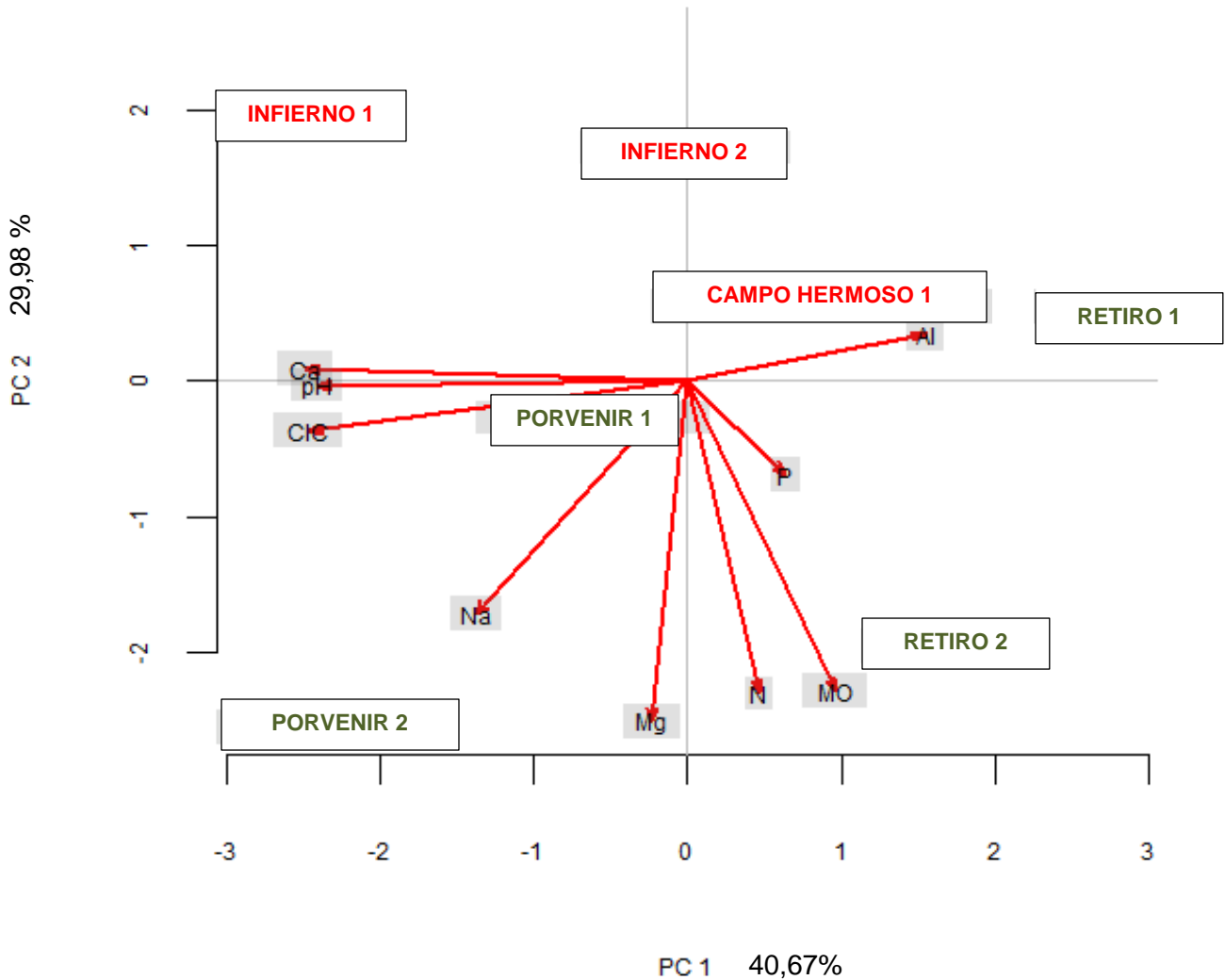


Figura 4-1. Análisis de componentes principales (ACP) de las propiedades fisicoquímicas de suelos de cultivos de caña panelera establecidos en Santander y Cundinamarca. Infierno 1, Infierno 2 y Campo Hermoso corresponden a suelos muestreados en Santander. Retiro 1, Retiro 2, Porvenir 1 y Porvenir 2 corresponden a suelos muestreados en Cundinamarca.

El porcentaje de N también mostró una influencia en el agrupamiento de las fincas establecidas en ambas regiones, siendo mayor en los suelos de las fincas de Cundinamarca (tabla 3-1), lo cual es explicado por el manejo agronómico relacionado con el uso de enmiendas orgánicas mencionado anteriormente, hecho que incidiría en que el balance total de N sea mayor para suelos de las fincas muestreadas en Cundinamarca.

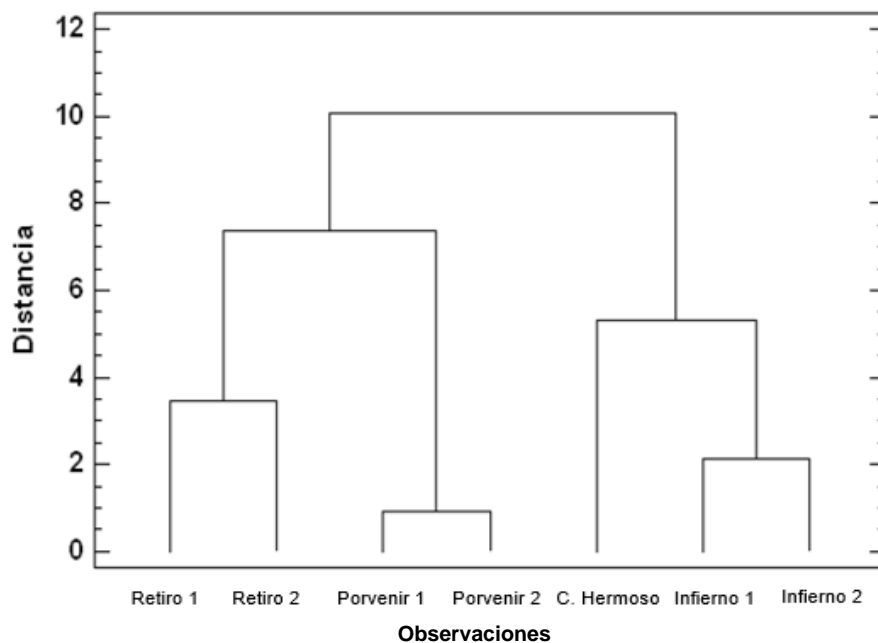


Figura 4-2. Análisis de conglomerados entre los suelos muestreados. Fincas de Cundinamarca (Retiro 1, Retiro 2, Porvenir 1, Porvenir 2), Fincas de Santander (C hermoso, Infierno 1, Infierno 2). Metodo de Ward, distancia euclídeana.

La tabla 4-1 muestra que, al comparar los parámetros fisicoquímicos de los suelos muestreados en las dos regiones de estudio, existen diferencias significativas entre el % de MO y el % de N, con valores de $P < 0,05$. Pese a que estos dos parámetros (%MO y % N) tienen niveles más altos en suelos muestreados en Cundinamarca, es importante relacionar que los rendimientos no son más altos en cultivos establecidos en esta región. De acuerdo a los productores de esta zona, el rendimiento puede estar entre 400 y 2 500 $\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, mientras que en Santander los productores relacionan rendimientos de hasta 16 000 $\text{Kg}\cdot\text{ha}^{-1}$, en este sentido, deben tomarse bajo consideración otros factores, como la tasa de renovación de la semilla, puesto que en Cundinamarca los cultivos pueden tener hasta 60 años, lo cual incide en la disminución del rendimiento, de hecho, Osorio (2007) relaciona que luego 8 de años sin renovar la semilla se disminuye la productividad de caña

y de panela, siendo necesario en ese momento, comenzar un esquema de renovación de cultivo que puede llevarse a cabo de manera gradual, no obstante, el análisis de suelos no contempla las formas inorgánicas de N como NO_3 y NH_4 , que sí podrían llegar a marcar una diferencia entre las dos regiones con relación al rendimiento, producto de la fertilización química que se realiza en cultivos establecidos en Santander.

Tabla 4-1. Comparación de los parámetros fisicoquímicos de suelos provenientes de Cundinamarca y Santander de acuerdo con el test de Kruskal-wallis ($\alpha=0,05$).

Variable	Valor-P
pH	0,479
Materia orgánica	0,033
Fósforo	0,723
CIC	0,723
N	0,030
Ca	0,479
K	1
Mg	0,077
Na	0,857
Al	0,386

Con respecto al pH, las pocas diferencias en este parámetro entre los suelos muestreados de ambas regiones llevaron a que este criterio no influyera en el agrupamiento de las fincas. Los suelos variaron entre ácidos y neutros. El nivel de P también varió entre muestras de las fincas y regiones, sin encontrar una tendencia en este elemento para suelos provenientes de las dos zonas. El K es uno de los elementos más importantes en la caña de azúcar puesto que activa el sistema enzimático, particularmente la invertasa, estimula la asimilación de carbohidratos y la formación de almidones y azúcares (Osorio, 2007), dicho parámetro no reveló un patrón de agrupamiento de las fincas estudiadas, sin embargo, es importante relacionar que 5 de los 7 suelos analizados presentan niveles bajos de K (tabla 3.1) de acuerdo con la tabla de rangos críticos para elementos en caña panelera, lo cual indicaría una deficiencia de este nutriente en la mayoría de los suelos bajo estudio.

4.2 Caracterización de BAFEs rizosfericas en actividades relacionadas con promoción de crecimiento vegetal

Los 52 aislamientos de BAFEs obtenidos de las regiones de Cundinamarca y Santander fueron caracterizados en actividades relacionadas con promoción de crecimiento vegetal. La tabla 4-2 muestra los resultados para producción de compuestos indolicos, solubilización de fosfato tricálcico y solubilización de fosfato de Aluminio.

Tabla 4-2 Caracterización de 52 aislamientos de BAFEs en solubilización de dos fuentes de fosforo inorgánico y producción de compuestos indolicos.

Aislamiento	Región de origen	Finca	Fosfatos (mg.L ⁻¹) a partir de Ca ₃ (PO ₄) ₂	Fosfatos (mg.L ⁻¹) a partir de AlPO ₄	Compuestos indolicos µg.mL ⁻¹
2C10	C	El Retiro	40,02±6,07	0,00±0	1,68±0,25
2C11	C		0,00±0	0,00±0	2,95±0,17
2C12	C		60,38±7,29	0,00±0	1,67±0,19
2C13	C		32,62±9,64	2,00±0,67	4,45±0,25
2C14	C		22,73±6,06	0,00±0	1,38±0,18
2C01	C		4,92±1,79	0,00±0	1,73±0,13
2C02	C		85,90±13,76	0,00±0	5,43±0,33
2C05	C		58,83±5,53	0,00±0	3,81±0,45
2C06	C		25,38±4,27	0,00±0	3,76±0
2C07	C		17,05±0,19	0,00±0	2,09±0,46
2C08	C		1,59±0,79	0,00±0	1,63±0,30
2C09	C		2,00±1,10	0,00±0	1,26±0,48
6C01	C		El porvenir	9,80±3,25	0,00±0
6C02	C	24,57±2,94		0,00±0	2,33±0,77
6C03	C	0,00±0		0,00±0	0,93±0,05
6C04	C	30,19±3,83		4,40±0,86	13,02±0,57
6C05	C	79,80±13,13		3,24±0,50	4,18±0,23
6C06	C	0,00±0		0,00±0	0,00±0
6C07	C	102±3,64		1,43±0,42	5,75±0,40
6C08	C	28,84±1,91		2,84±0,09	0,39±0,02
6C09	C	89,97±4,68		0,00±0	5,77±0,69
6C18	C	2,72±0,26		0,00±0	0,61±0,25
6C19	C	0,00±0		1,15±0,16	0,22±0,09
6C20	C	0,00±0	0,00±0	2,06±0,17	

6C21	C		92,23±11,41	0,00±0	4,24±0,74
S92B3	S	Campo Hermoso	87,05±0,69	0,00±0	4,19±0,08
S92B4	S		22,33±5,42	0,00±0	18,78±2,81
S92B5	S		64,34±13,79	0,00±0	1,59±0,31
S92B7	S		29,00±5,02	0,00±0	2,60±0,15
S92B8	S		37,33±10,79	0,00±0	0,00±0
S93B1	S		177,79±36,63	0,00±0	19,33±0,69
S93B2	S		53,25±3,03	0,00±0	0,62±0,13
S93B3	S		25,44±5,62	0,00±0	18,74±1,34
S93B4	S		47,62±5,60	0,00±0	0,91±0,09
S93B5	S		3,77±1,55	0,00±0	0,56±0,14
S93B6	S		7,05±2,05	0,00±0	4,36±0,16
S93B7	S		16,53±5,81	0,00±0	11,53±2,08
S93B8	S		28,43±6,67	0,00±0	5,31±0,38
S131B10	S		El infierno	70,72±4,50	0,00±0
S131B2	S	82,05±4,45		0,00±0	6,70±0,39
S131B3	S	49,57±3,42		4,02±1,29	2,99±0,36
S131B5	S	1,82±0,49		0,00±0	1,42±0,12
S131B8	S	69,46±12,24		1,41±0,39	3,78±0,39
S131B9	S	70,78±2,99		1,18±0,55	3,85±0,24
S132B2	S	8,89±0,62		0,00±0	1,42±0,39
S132B3	S	16,99±1,80		0,00±0	2,41±0,70
S132B5	S	10,09±1,20		0,00±0	9,15±1,51
S132B6	S	157,28±29,02		0,00±0	0,31±0,07
S133B1	S	39,69±7,80		0,00±0	2,70±1,22
S133B3	S	4,63±0,71		0,00±0	1,51±0,34
S133B4	S	23,89±1,30		0,00±0	2,20±0,25
S133B6	S	9,00±0,26		0,00±0	5,10±0,56
AP304 <i>Bacillus</i> sp.	Control		ND	ND	2,43±0,18
<i>Azospirillum</i> <i>brasiliensis</i> C43SN7-1	Control		ND	ND	29,07±1,55
Pfls095 <i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	Control		249,41±46,01	0,00±0	ND

4.2.1 Producción de compuestos indólicos

Los valores obtenidos para la producción de compuestos indólicos de los aislamientos de BAFEs rizosfericas estudiadas, oscilaron entre 0,216 y 23,33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. El control positivo fue una cepa de *Azospirillum brasiliensis* cuya producción de AIA se mantuvo en 29,07 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ninguno de los aislamientos superó el valor de dicho control, sin embargo, en comparación con el control AP304 perteneciente al género *Bacillus*, cerca de la mitad de los aislamientos presentaron una producción de compuestos indólicos por encima de este umbral.

Con el fin de comparar los niveles de producción de compuestos indólicos de los aislamientos provenientes de ambas regiones, se establecieron cuatro categorías. La figura 4-3 muestra el porcentaje de aislamientos dentro de cada categoría establecida para esta variable.

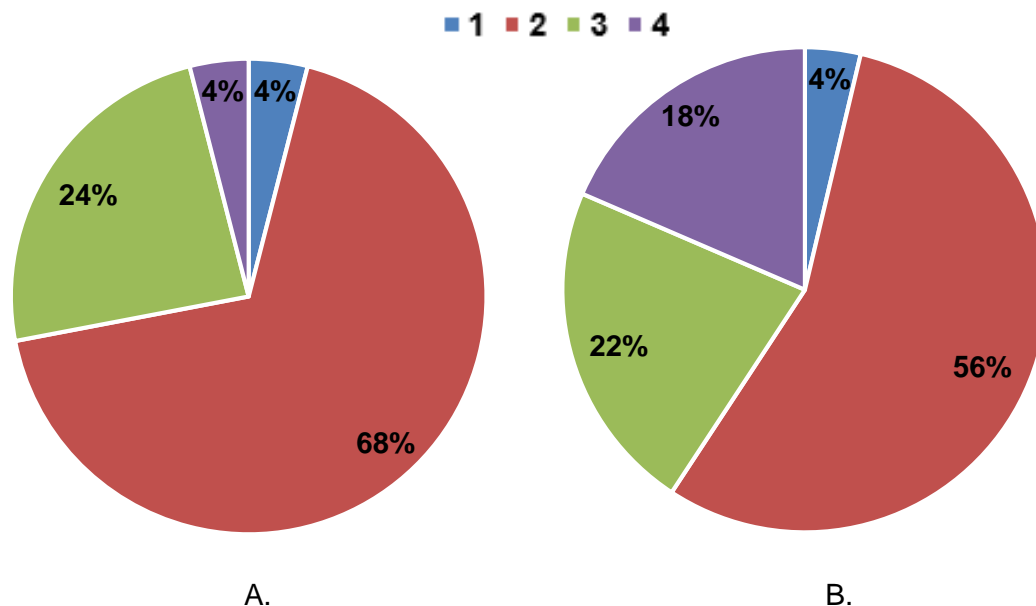


Figura 4-3. Porcentaje de aislamientos dentro de cada nivel de producción de compuestos indólicos. A) Aislamientos provenientes de Cundinamarca. B) Aislamientos provenientes de Santander. 1: 0 $\mu\text{g AIA.mL}^{-1}$, 2: Rango entre 0,1 y 4 $\mu\text{g AIA.mL}^{-1}$, 3: Rango entre 4,1 y 10 $\mu\text{g AIA.mL}^{-1}$, 4: Producción mayor de 10 $\mu\text{g AIA.mL}^{-1}$.

Al comparar el comportamiento de los aislamientos provenientes de cultivos establecidos en cada región, en cuanto a esta actividad, se observa que aunque en ambos casos el 96% de los aislamientos mostraron capacidad de producir compuestos indólicos, el 18% de las BAFEs provenientes de Santander tienen una producción dentro de la categoría más alta ($> 10 \mu\text{g AIA.mL}^{-1}$), mientras que solo el 4% de las BAFEs provenientes de Cundinamarca, caben dentro de este rango, lo anterior, indicaría que existen diferencias en esta actividad para BAFEs que se han asociado en la rizósfera de plantas establecidas en cada región, de hecho, al momento de comparar esta actividad en los aislamientos de ambos orígenes, se encuentran diferencias estadísticas para esta variable ($t = -2,78$; $P=0,006$).

El ácido indolacético de origen microbiano estimula la formación de pelos radiculares, así como el número y la longitud de raíces primarias y laterales cuando se encuentra en un rango de concentración ideal, sin embargo, a concentraciones muy altas puede también inhibir el crecimiento de raíces primarias (Duca *et al.*, 2014). En este sentido, predecir el efecto de una u otra concentración de la fitohormona o relacionar que aislamientos con una mayor producción de AIA como los provenientes de Santander puedan favorecer el crecimiento vegetal por encima de aquellos aislamientos que hayan presentado una producción baja de estos compuestos, es difícil, sobre todo porque el efecto de estos compuestos en las plantas depende de la sensibilidad de la especie vegetal a la fitohormona y de la cantidad producida bajo la interacción planta-microorganismo (Reddy, 2013).

Varias investigaciones relacionan la producción de compuestos indólicos por el grupo funcional de BAFEs, Beneduzi *et al.*, (2008) reportan valores de producción de AIA similares a los encontrados en este trabajo, así, de 155 BAFEs rizosfericas evaluadas, 95 presentaron dicha actividad, con una producción entre 0,1 y $30 \mu\text{g AIA.mL}^{-1}$. Ali *et al.*, (2009) también reportan una producción de AIA entre 5,2 y $47,1 \mu\text{g AIA.mL}^{-1}$ para 16 aislamientos de diferentes especies de *Bacillus*.

Duca *et al.*, (2014) relacionan que en bacterias del género *Bacillus* se ha asociado la producción de AIA mediante la vía IAOX/IAN (Indol-acetaldoxima/Indol-3-acetonitrilo), en la cual, el triptófano es convertido a Indol-3-acetaldoxima, posteriormente, este compuesto es convertido en Indol-3-acetonitrilo, y finalmente, dicho intermediario, es convertido en

AIA por la acción de la enzima nitrilasa en un único paso o por una nitrilo hidratasa y una amidasa en un proceso de dos etapas.

En cuanto a las diferencias encontradas en la producción de compuestos indólicos de BAFEs provenientes de las dos regiones de estudio, Yuan *et al.*, (2011) reportan un resultado similar luego de evaluar el efecto de diferentes tratamientos de fertilización en la producción de AIA de bacterias del suelo, pese a que ellos estudiaron bacterias de diferentes géneros, incluyendo *Bacillus*, encontraron que la media de la producción de AIA de bacterias provenientes de suelos con fertilización química fue mayor ($116,0 \mu\text{g AIA}\cdot\text{mL}^{-1}$) en comparación con la media de la producción de indoles de bacterias originarias de suelos con fertilización orgánica ($25,3 \mu\text{g AIA}\cdot\text{mL}^{-1}$). Lo anterior resulta comparable con el presente trabajo, puesto que, los aislamientos que presentaron los mayores niveles de producción de AIA provienen de cultivos establecidos en Santander donde se emplean altas dosis de fertilizantes químicos. No obstante, esos valores se encontraron por encima de los reportados en el presente trabajo.

Shokri y Emtiazi (2010) relacionan que la producción de AIA microbiano es afectado por factores genéticos y ambientales, tales como la disponibilidad de nutrientes y los sustratos. Medina *et al.*, (2011) encontraron que la fertilización nitrogenada afecta la ocurrencia de rizobacterias cultivables con la capacidad de producir AIA, ellos relacionan que sin fertilización, el 10% de las rizobacterias son cepas productoras de AIA mientras que con una fertilización con urea equivalente a $600 \text{ Kg de N}\cdot\text{año}^{-1}$, solo el 3% de las rizobacterias exhiben esta capacidad.

Varias investigaciones han relacionado diferencias en la distribución de las rizobacterias productoras de compuestos indólicos en los suelos, Beneduzi *et al.*, (2008) por ejemplo, encontraron que en dos de las siete zonas de estudio que, en todos los casos, correspondían a suelos arroceros, se concentraban el mayor número de BAFEs con capacidad de producir AIA, pese a que no refieren una posible relación entre este hecho y las características de los suelos estudiados, lo anterior, indicaría que hay factores que pueden influir en la distribución de bacterias con capacidad de producción de indoles, y que ciertas condiciones relacionadas ya sea con las características fisicoquímicas del suelo o con su manejo agronómico están influenciando los rasgos funcionales de las rizobacterias que han establecidos interacciones en esos nichos ecológicos.

Da costa *et al.*, (2013) evaluaron la influencia de diferentes niveles de fertilización sobre las actividades de promoción de crecimiento vegetal de rizobacterias asociadas a cultivos de arroz, ellos encontraron que no existían diferencias en las proporciones de bacterias productoras de compuestos indólicos bajo los diferentes tratamientos de fertilización, sin embargo, si encontraron que los aislamientos provenientes de suelos con fertilización moderada (60 Kg N, 20 Kg P₂O₅ y 60 Kg K.ha⁻¹.año⁻¹) tienen una producción de indoles más alta y estadísticamente diferente de aquellos aislamientos obtenidos de suelos sin aplicación de fertilización.

Ouyang *et al.*, (2017) refieren que las interacciones que se establecen entre el nitrógeno ambiental, la producción bacteriana de AIA, el metabolismo bacteriano del nitrógeno y el crecimiento de la planta son altamente dinámicas y son consideraciones de gran valor en aplicaciones para una agricultura sostenible.

Por otra parte, es importante relacionar que la interacción planta-microorganismo que se da en la rizosfera está determinada por la rizodeposición, la cual puede llegar a representar en promedio el 11% de los foto-asimilados de las plantas y su composición puede variar no solo entre diferentes especies vegetales, sino entre cultivares y sus estados fenológicos (Ge *et al.*, 2016). Lo anterior, podría indicar que el hecho de que se cultiven diferentes variedades de caña panelera (POJ 2878 en Cundinamarca y RD 75-11 o MZC en Santander) puede influir en la composición de la rizodeposición, y por tanto, en las interacciones que se establecen en cada uno de los microbiomas, sin embargo, no hay estudios que relacionen dichas diferencias para esta especie vegetal en particular y su influencia o no en la actividad de rizobacterias asociadas.

Sumado a lo anterior, se encuentra el hecho de que la tasa de renovación de cultivo en ambas regiones es diferente, puesto que en Santander se hace renovación de la semilla vegetativa cada 5 a 8 años, mientras que en Cundinamarca se pueden encontrar “socas” de hasta 60 años, este escenario, también puede estar influyendo en las diferencias en la actividad biológica de bacterias asociadas en uno u otro nicho. Lin *et al.*, (2013) por ejemplo, en un estudio de meta-proteómica encontraron diferencias en la abundancia de proteínas en suelos con cultivos de caña de azúcar “renovados” y en “soca”, ellos refieren que varias de las enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y de aminoácidos como la succinato deshidrogenasa, fosfofructoquinasa, gliceraldehído-3-

fosfato deshidrogenasa, y la betaína aldehído hidrogenasa, se encuentran “sobre-expresadas” en suelos de caña de retoño de la primera soca, en comparación con los suelos de plantas “renovadas” o suelos control en barbecho desnudo, de hecho, relacionan que proteínas microbianas relacionadas con la capacidad de colonización rizosférica y la utilización de exudados radiculares como spot 30, kinasas sensoras de sistema de dos componentes, transportadores de azúcares ABC y ATPasas tipo ABC, fueron reguladas positivamente en suelos de “soca”, lo cual podría ser una respuesta a la rizodeposición diferencial de este tipo de cultivo, sin embargo, no se relacionan proteínas implicadas en la producción de compuestos indólicos o del metabolismo del triptófano, pero muestran un escenario diferencial en las interacciones rizosféricas que se pueden dar bajo estos dos tipos de manejo del cultivo.

En este sentido, se puede relacionar que el manejo del cultivo de caña panelera bajo las dos condiciones descritas podría afectar las características funcionales de BAFEs establecidas allí, para el caso de la producción de ácido indolacético, lo cual resulta muy importante al momento de desarrollar procesos de bioprospección de biofertilizantes y es un factor que debe ser considerado con el fin de optimizar las estrategias que busquen favorecer el crecimiento de las plantas mediante el empleo de microorganismos.

4.2.2 Solubilización de fosfato tricálcico

Los niveles de solubilización de fosfato tricálcico de los aislamientos evaluados oscilaron entre 1,59 y 177,79 mg $\text{PO}_4\cdot\text{L}^{-1}$ (Tabla 4-1). El 90% de los aislamientos mostraron capacidad de solubilización de esta fuente de fósforo inorgánico, sin embargo, todos los valores se encontraron por debajo del control positivo evaluado correspondiente a la cepa de *Pseudomonas fluorescens* Pfl095 (249,41 mg $\text{PO}_4\cdot\text{L}^{-1}$).

La figura 4-4 muestra los porcentajes de aislamientos en cada uno de los niveles establecidos para esta variable, al comparar dicha distribución, se observa que todos los aislamientos de Santander presentaron capacidad de solubilización de fosfato tricálcico, mientras que el 20% de los aislamientos provenientes de Cundinamarca no exhibieron esta actividad, además, un mayor porcentaje de aislamientos provenientes de Santander lograron liberar concentraciones más altas de P en comparación con las BAFEs evaluadas

originarias de cultivos de Cundinamarca. Se encontraron diferencias estadísticas entre dicha actividad desarrollada por los dos grupos de bacterias ($P=0,049$).

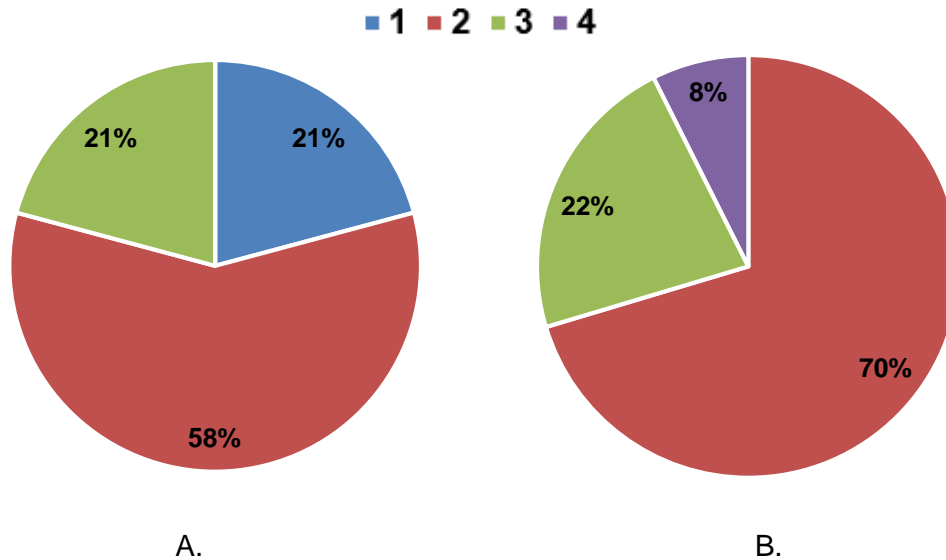


Figura 4-4. Porcentaje de aislamientos dentro de cada nivel de solubilización de fosfato tricálcico. A) Aislamientos provenientes de Cundinamarca. B) Aislamientos provenientes de Santander. 1: $0 \text{ mg PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$, 2: Rango entre $0,1-60 \text{ mg PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$, 3: Rango entre $60,1-120 \text{ mg PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$, 4: $> 120 \text{ mg PO}_4^- \cdot \text{mL}^{-1}$.

Beneduzi *et al.*, (2008) encontraron que solo 5 de 140 (3,5%) aislamientos de BAFEs rizosfericas de trigo tenían la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico, un porcentaje mucho menor al encontrado en el presente estudio, donde la ocurrencia de BAFEs con esta actividad fue mucho mayor (90%), con una diferencia del 20% entre regiones. Kadyan *et al.*, (2013) reportan niveles de solubilización de fosfato tricálcico de BAFEs rizosfericas obtenidas de *Phyllanthus amarus* L. entre $9,51$ y $125,83 \mu\text{g PO}_4^- \cdot \mu\text{L}^{-1}$, valores similares a los encontrados en el presente estudio para este grupo funcional. Chen *et al.*, (2006) evaluaron la capacidad de solubilización de fosfato tricálcico de 10 aislamientos pertenecientes al género *Bacillus*, estos investigadores, reportan 3 aislamientos con niveles de liberación de P de hasta $270,2 \text{ mg PO}_4 \cdot \text{L}^{-1}$, superiores a los encontrados en este trabajo, además, detectaron la producción de ácidos orgánicos en el medio de cultivo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en 9 de los 10 aislamientos de BAFEs, los ácidos correspondieron a ácido cítrico, ácido láctico y ácido propiónico, los cuales podrían estar implicados en la liberación de fósforo a partir de esta fuente de P

inorgánico. Orberá Raton *et al.*, (2012) evaluaron la solubilización de fosfato tricálcico de BAFEs aisladas de rizosfera de plantas de caña de azúcar de 10 meses de edad en la ciudad de Sertãozinho, Brasil, ellos encontraron que el 83,3% de los aislamientos presentan esta actividad, sin embargo, todos mostraron una liberación de P por encima de $146,1 \text{ mg PO}_4\text{-L}^{-1}$. Lo anterior, incluyendo los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran que en el grupo funcional de las BAFEs pueden encontrarse aislamientos con una capacidad destacada de solubilización de esta fuente de P inorgánico, lo que podría representar su uso potencial para incrementar la disponibilidad de P en suelos, no obstante, es necesario evaluar dichas capacidades bajo condiciones *in vitro*, pues como se ha mencionado, la distribución de bacterias con esta capacidad puede estar en función del manejo agronómico, entre otros factores, llevando a que no sea un escenario similar buscar bacterias solubilizadoras de fosforo en Santander, que en Cundinamarca.

Como se mencionó anteriormente, la actividad de solubilización de fosfato tricálcico no fue diferente estadísticamente en los dos grupos de BAFEs con diferente origen, sin embargo, se observa una tendencia en la cual los aislamientos obtenidos de Santander son más destacados en esta actividad. Da Costa *et al.*, (2013) evaluaron el efecto de diferentes tratamientos de fertilización con NPK en actividades de promoción de crecimiento vegetal, encontrando que las condiciones de fertilización no afectan la ocurrencia o número de solubilizadores de P, sin embargo, relacionan que los aislamientos obtenidos de suelos donde no se aplicó fertilización tienen una capacidad más alta de solubilización de fosforo, Hu *et al.*, (2009) también relacionan que las bacterias solubilizadoras de P son metabólicamente más activas en suelos deficientes en fertilización de P, esto resulta diferente a lo encontrado en el presente estudio, puesto que en cultivos establecidos en Santander si se desarrolla un esquema de fertilización química. No obstante, es importante relacionar que de acuerdo con el análisis de componentes principales desarrollado (figura 4-1), el P no permitió diferenciar los suelos de ambas regiones y esto puede influir en el hecho de que no se observen diferencias estadísticas, ni similitudes con los trabajos mencionados anteriormente, a pesar de la tendencia observada. Sumado a lo anterior resulta relevante mencionar que no solo el manejo de fertilización hace que las dos regiones de estudio sean contrastantes, sino que otros factores como la cultivariedad sembrada y la edad de la semilla empleada, pueden influir en la selección de bacterias con ciertas características asociadas a promoción de crecimiento vegetal.

Oliveira *et al.*, (2009) por ejemplo, evaluaron la actividad de solubilización de fosfato tricálcico de microorganismos rizosféricos aislados de cuatro variedades de maíz, ellos encontraron, que los aislamientos que exhibieron una mayor capacidad de solubilizar esta fuente de fósforo, estaban asociados a una variedad en particular, la cual además había sido reconocida por hacer un uso eficiente del fósforo. Sin embargo, no se encuentran estudios que puedan relacionar este efecto, por ejemplo, en diferentes variedades de caña de azúcar que sean empleadas a nivel comercial.

4.2.3 Solubilización de fosfato de aluminio

Los resultados de la tabla 4-2 muestran que los niveles de solubilización de fosfato de aluminio por parte de los aislamientos de BAFEs evaluadas, no superaron los $4,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de PO_4 y solo el 17 % de los aislamientos fueron capaces de solubilizar esta fuente de fósforo inorgánico. Lo anterior, indica que dicha actividad no es destacada dentro del grupo de bacterias estudiada bajo las condiciones evaluadas.

La figura 4-5 muestra que el 24% de los aislamientos provenientes de Cundinamarca presentaron esta actividad, mientras que solo estuvo presente en el 11% de los aislamientos provenientes de Santander, sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas para esta variable al comparar las dos regiones de estudio.

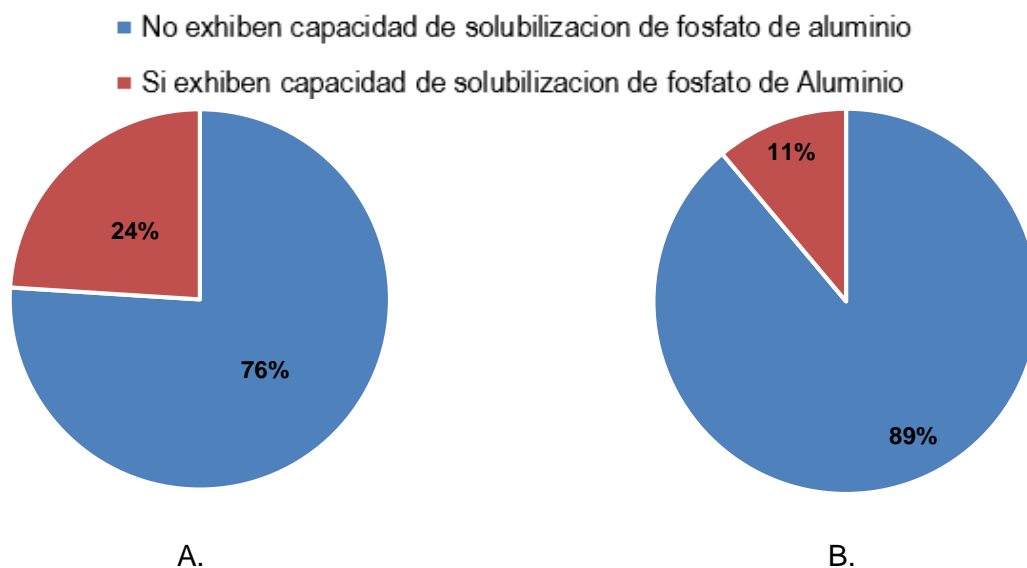


Figura 4-5. Porcentaje de aislamientos que presentaron o no la actividad de solubilización de fosfato de Aluminio según el origen. A) Aislamientos provenientes de Cundinamarca. B) Aislamientos provenientes de Santander.

Banik y Dey (1983) reportan cepas de *Bacillus subtilis* B-7655, y *Bacillus* sp. LAB5 como eficientes solubilizadoras de fosfato tricálcico, pero con una solubilización de fosfato de aluminio menos eficiente, resultados similares a los encontrados en el presente trabajo. Oliveira *et al.*, (2009) también reportan tasas de solubilización de fosfato de aluminio de microorganismos rizosféricos, más bajas en comparación con las obtenidas de fosfato tricálcico, de hecho, reportan un aislamiento perteneciente al género *Paenibacillus* con una liberación de tan solo 0,03 mg PO₄.L⁻¹. Pérez *et al.*, (2007) aislaron 130 cepas capaces de solubilizar fosfato tricálcico en medio NBRIP, sin embargo, ninguna de ellas mostró actividad sobre fosfato de hierro o fosfato de Aluminio, lo cual hace que su utilidad sea muy reducida en suelos ácidos.

Varios autores relacionan que la supresión de esta actividad en los microorganismos puede estar dada por la toxicidad del Al⁺³ en solución luego de la liberación del fósforo, además porque los mecanismos de solubilización de estos compuestos no implican la acidificación del medio sino la producción de agentes quelantes u otras estrategias que pueden representar un costo energético mayor para el microorganismo (Bashan *et al.*, 2013).

La tabla 4-2 muestra que 8 de los 9 aislamientos que mostraron capacidad de solubilización de fosfato de aluminio, también tienen capacidad de solubilizar fosfato tricálcico, con valores entre 28,84 y 102 mg PO₄.L⁻¹, hecho que las hace interesantes al ser potencialmente útiles bajo condiciones de suelos alcalinos y ácidos, no obstante, es necesario poder desarrollar otro tipo de evaluaciones con el fin de conocer el efecto de estas bacterias que pueden llegar a considerarse más versátiles, en la movilización real de fósforo.

4.2.4 Mineralización de ácido fítico

Todos los aislamientos obtenidos en el marco de este estudio fueron evaluados en su capacidad para mineralizar ácido fítico *in vitro* como única fuente de fósforo. La formación de halos de mineralización fue evaluada como variable de respuesta y como un indicativo de una posible actividad fitasa.

La figura 4-6 muestra que el 59% de los aislamientos provenientes de Santander tienen capacidad de mineralización de ácido fítico, mientras que el 36% de los aislamientos de Cundinamarca presentaron esta actividad. Estos resultados, mostrarían que existe un

comportamiento diferencial para esta actividad en los dos grupos de BAFEs, de hecho, se encontraron diferencias estadísticas al comparar ambas regiones para esta variable ($t = 3,00932$ y $p = 0,004$).

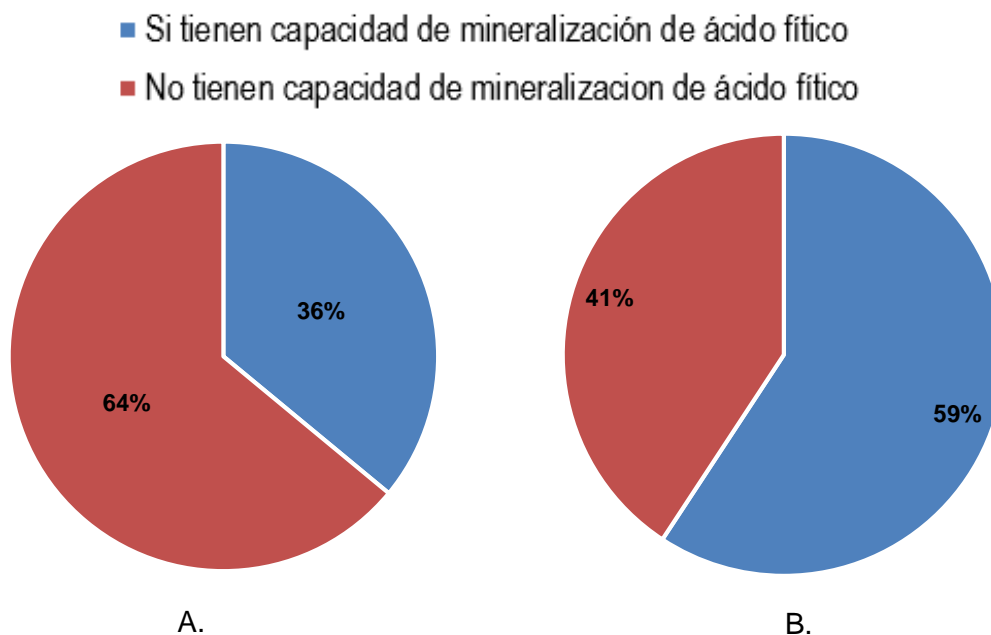


Figura 4-6. Porcentaje de aislamientos que presentaron o no la actividad de mineralización de ácido fítico. A) Aislamientos provenientes de Cundinamarca. B) Aislamientos provenientes de Santander.

La tabla 4-3 muestra los valores de eficiencia de mineralización de los aislamientos que resultaron positivos para esta actividad, en estos, se destacan los aislamientos 6C21, S93B8 y 2C02, sin embargo, ninguno de los aislamientos de BAFEs mostraron una actividad por encima del control positivo *Pseudomonas fluorescens* Pfl095 cuya eficiencia de mineralización fue de 244,94 %, lo cual significa que el tamaño del halo para esta cepa fue 2,5 veces el diámetro de la colonia.

Tabla 4-3. Eficiencia de mineralización en % obtenida mediante la fórmula: de los aislamientos de BAFEs positivos para la actividad de mineralización de ácido fítico $EM = ((\text{Diámetro de halo} / \text{Diámetro de la colonia}) * 100)$. Letras diferentes indican diferencias significativas con un $\alpha=0,05$ mediante el test de Kruskal-wallis.

Aislamiento	Región de origen	Eficiencia de mineralización EM (%)
2C02	C	134,76±8,23 abcd
2C05	C	113,47±9,22 fghi
2C06	C	132,89±10,35 bcde
6C02	C	113,84±4,14 fgh
6C04	C	121,12±9,91 defg
6C05	C	122,88±13,34 cde
6C07	C	122,45±11,11 def
6C09	C	142,06±14,83 abc
6C21	C	195,93±5,52 ab
S92B3	S	111,18±4,50 hijk
S92B4	S	116,46±6,18 efg
S92B5	S	118,40±5,24 def
S92B7	S	109,75±5,95 k
S93B2	S	148,70±16,22 abc
S93B3	S	116,89±8,67 efg
S93B7	S	108,91±3,13 k
S93B8	S	145,98±20,58 abc
S131B10	S	117,11±5,30 efg
S131B2	S	113,17±4,63 ghij
S131B8	S	111,80±5,70 hijk
S131B9	S	111,85±3,04 ijk
S132B3	S	116,02±5,49 fgh
S132B5	S	109,90±1,34 jk
S132B6	S	111,43±4,40 hijk
S133B6	S	115,94±5,09 hijk
Pfls095 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Control	244,94±22,28 a

Varias investigaciones han reportado la actividad fitasa por aislamientos pertenecientes al grupo funcional de las BAFEs. Idriss *et al.*, (2002) relacionan esta actividad en tres cepas pertenecientes al grupo de *B.subtilis/B.amyloliquefaciens*, destacándose la actividad de la cepa FZB45, los investigadores encontraron que filtrados del cultivo de esta cepa favorecen el crecimiento de plántulas de maíz bajo condiciones limitantes de fosforo en presencia de fitato, además, desarrollaron un mutante de esta cepa, reemplazando el gen

phyA por un cassette de resistencia a kanamicina y encontraron que los filtrados del cultivo de la cepa mutante no estimularon el crecimiento de la planta, lo cual indica que la actividad de la fitasa extracelular de esta cepa es importante para favorecer el crecimiento de plántulas de maíz. Kumar *et al.*, (2013) aislaron 60 bacterias productoras de fitasas seleccionadas por la formación de halos de hidrólisis en medio PSM (phytase screening medium agar), aproximación similar a la desarrollada en el presente trabajo, de allí, seleccionaron un aislamiento perteneciente al género *Bacillus* con la actividad fitasa más alta y encontraron que la bacterización de semillas de *Brassica juncea* con esta cepa, incrementaba la biomasa y el contenido de P de plántulas de 30 días de edad en un 33% y 25% en comparación con el control sin inocular, respectivamente.

En cuanto a las diferencias encontradas para el porcentaje de aislamientos con capacidad de mineralización de fitato provenientes de cultivos con manejos diferenciales, Martínez *et al.*, (2011), por ejemplo, no encontraron diferencias en el porcentaje de rizobacterias cultivables mineralizadoras de fitato aisladas de la rizosfera de pasturas con dos esquemas de fertilización diferentes (con y sin fertilización nitrogenada), lo cual no resulta en concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio, sin embargo, si encontraron que el porcentaje de rizobacterias cultivables tanto con la capacidad de mineralizar ácido fítico como de solubilizar fosfato tricálcico, era mayor en suelos con un esquema de fertilización nitrogenada ($600 \text{ Kg N.ha}^{-1}.\text{año}^{-1}$). Harapiak *et al.*, (2004) relacionan que uno de los efectos de la fertilización nitrogenada es la alteración de la dinámica y la concentración de P soluble, el cual es mantenido en el suelo dependiendo de las diferencias en la demanda de C, N y P durante la descomposición de la materia orgánica y por tanto, este factor puede influir en el comportamiento de microorganismos asociados al ciclo de este elemento.

Otro factor que puede influir en la selección de bacterias con mayor o menor capacidad de mineralización de fitato es la planta, aunque no se reportan investigaciones que relacionen el efecto de cultivariedades de caña de azúcar en la asociación de estas bacterias de manera diferencial. Jorquera *et al.*, (2008) por ejemplo, aislaron bacterias mineralizadoras de fitato de la rizosfera de diferentes plantas y obtuvieron un mayor porcentaje de bacterias con esta capacidad, provenientes de la rizosfera de raigrás perenne y de trébol blanco, (34% y 38% respectivamente) en comparación con rizosferas de especies como trigo y avena, donde los porcentajes de mineralizadores de ácido fítico no superaron el 10%.

Musarrat y Khan (2014), relacionan que el crecimiento y la actividad de bacterias que puedan movilizar P también se ve afectado por la presencia de varias fuentes de carbono, como la glucosa, la galactosa, la fructosa y el manitol, en los fotosintatos de muchas plantas, y refieren que tales fuentes de carbono pueden afectar la producción de enzimas que están involucradas en la mineralización de fósforo orgánico. En este sentido, podría hipotetizarse que el empleo de dos variedades de caña diferentes en las dos regiones de estudio de donde se obtuvieron los aislamientos, al igual que una edad diferencial en la semilla del cultivo, pueden llevar a la producción de fotosintatos diferentes por parte de las plantas y por tanto, conducir a la selección de microorganismos con diferente capacidad de movilización de P.

Musarrat y Khan (2014) también relacionan que hay otros factores que pueden afectar la mineralización de fuentes de P orgánico, refieren, que las prácticas de cultivo inciden en la actividad microbiana, ya sea, por ejemplo, favoreciendo la aireación, además, que la adición de residuos orgánicos podría potenciar la actividad de mineralización de P orgánico por los microorganismos, sin embargo, y pese a que la materia orgánica fue uno de los parámetros que permitió agrupar los suelos provenientes de ambas regiones según el ACP, el % de materia orgánica fue mayor en suelos de Cundinamarca que en Santander, y el mayor número de bacterias con capacidad de mineralización de fitato fue obtenido de Santander, hecho que resultaría en contradicción con dicha afirmación. No obstante, es relevante relacionar que tal como se ha mencionado, la diferencia entre regiones está marcada por varios factores y que es difícil asociar la actividad diferencial de las BAFEs bajo estudio a uno u otro factor, además, porque posiblemente la interacción entre varios hechos es la que puede llevar a la generación de nichos particulares y, por tanto, incidir en diferencias en la actividad biológica del grupo funcional estudiado. En este sentido, resultaría interesante plantear un experimento donde se evalúen varias variables que permitan identificar cuáles son los factores que más inciden en la mineralización de P en el suelo y por tanto en la presencia o no de esta actividad en bacterias rizosfericas.

4.2.5 Actividad ACC deaminasa

Dentro de la caracterización funcional de los aislamientos de BAFEs se buscó identificar la actividad de la enzima ACC deaminasa, la cual está relacionada con la promoción de crecimiento en función de su capacidad de inhibir la síntesis de etileno en las plantas hospederas, esto reviste importancia al favorecer el desarrollo de las plantas bajo diferentes condiciones de estrés. La metodología consistió en evaluar la capacidad de los aislamientos de emplear el compuesto ACC como única fuente de nitrógeno.

La tabla 4-4 muestra los resultados de las densidades ópticas alcanzadas luego de 48 horas de crecimiento de las BAFEs en medio mínimo M9 suplementado con diferentes fuentes de nitrógeno, también, muestra las densidades ópticas obtenidas de los dos controles empleados, el primero, correspondiente al control positivo: la cepa *Pseudomonas putida* UW4 wild type que ha sido reconocida por su capacidad de usar ACC como única fuente de Nitrógeno y promover el crecimiento de plántulas de canola bajo condiciones gnotobioticas (Glick *et al.*, 1995). El control negativo empleado corresponde a *P. putida* UW4/AcdS⁻ una cepa en la cual un gen de resistencia a la tetraciclina fue insertado para reemplazar el gen bacteriano de la ACC deaminasa (Cheng *et al.*, 2007). Los resultados de la tabla 4-4 muestran que estos dos controles tuvieron un comportamiento acorde con lo esperado, el control positivo alcanzó una densidad óptica cercana a 0,3 en el medio con ACC como fuente única de Nitrógeno y el control negativo tuvo una densidad óptica baja, cercana al blanco que contenía MgSO₄, además las dos cepas crecieron de manera similar en el medio con NH₄(SO₄)₂ como fuente de nitrógeno, alcanzando luego de 48 horas de crecimiento una densidad óptica cercana a 0.6.

La metodología desarrollada se sustenta en que los valores de densidad óptica alcanzados en los pozos que contienen ACC como fuente de nitrógeno, deben ser comparados con los valores obtenidos en los que contienen NH₄(SO₄)₂ y MgSO₄, así, los aislamientos que tienen la tasa más alta de utilización de ACC deben alcanzar una densidad óptica cercana a las obtenidas cuando crecen con NH₄(SO₄)₂, los aislamientos que tienen una tasa más baja de utilización de ACC alcanzan una densidad óptica menor en comparación con la alcanzada en presencia de NH₄(SO₄)₂ y aquellos con una tasa muy baja o nula, alcanzan valores de densidad óptica muy cercanos a los obtenidos en los pozos control, con MgSO₄ (Habib *et al.*, 2016)

Tabla 4-4. Densidad óptica luego de 48 horas de crecimiento de los aislamientos de BAFEs en medio mínimo M9 con NH_4SO_4 y ACC como fuentes de N. El medio M9 suplementado con MgSO_4 se empleó como blanco.

Aislamiento	Región de origen	DO (MgSO_4)	DO (NH_4SO_4)	DO (ACC)
2C14	C	0,000±0,000	0,102±0,006	0,000±0,000
2C01	C	0,027±0,008	0,270±0,031	0,000±0,015
2C02	C	0,065±0,004	0,470±0,115	0,064±0,012
2C05	C	0,070±0,007	0,847±0,153	0,097±0,015
2C06	C	0,000±0,013	0,571±0,01	0,104±0,05
2C07	C	0,013±0,013	0,325±0,210	0,002±0,003
2C08	C	0,000±0,000	0,325±0,073	0,000±0,000
2C09	C	0,000±0,010	0,303±0,003	0,000±0,018
6C02	C	0,000±0,021	0,545±0,095	0,159±0,012
6C05	C	0,049±0,012	0,587±0,250	0,009±0,002
6C07	C	0,000±0,030	0,481±0,009	0,010±0,001
6C09	C	0,058±0,000	0,591±0,032	0,046±0,024
6C21	C	0,067±0,014	0,551±0,013	0,006±0,004
S92B3	S	0,073±0,009	1,010±0,104	0,030±0,027
S92B4	S	0,000±0,003	0,598±0,113	0,000±0,004
S92B5	S	0,008±0,005	0,653±0,210	0,000±0,003
S92B7	S	0,013±0,001	0,272±0,049	0,000±0,000
S92B8	S	0,010±0,017	0,088±0,004	0,000±0,004
S93B1	S	0,000±0,046	0,910±0,109	0,021±0,001
S93B2	S	0,000±0,002	0,231±0,009	0,002±0,006
S93B3	S	0,000±0,002	0,370±0,028	0,012±0,003
S93B4	S	0,081±0,008	0,104±0,002	0,071±0,013
S93B5	S	0,070±0,049	0,197±0,010	0,091±0,042
S93B6	S	0,057±0,025	0,755±0,325	0,108±0,051
S93B7	S	0,079±0,066	0,892±0,120	0,044±0,029
S93B8	S	0,064±0,021	0,592±0,055	0,077±0,054
S131B10	S	0,000±0,012	0,463±0,049	0,000±0,007
S131B3	S	0,030±0,006	0,145±0,029	0,037±0,008
S131B5	S	0,003±0,005	0,513±0,313	0,039±0,056
S131B8	S	0,047±0,004	0,394±0,009	0,057±0,007
S131B9	S	0,077±0,084	0,496±0,085	0,039±0,009
S132B2	S	0,099±0,002	0,608±0,048	0,000±0,006
S132B3	S	0,161±0,024	0,343±0,007	0,005±0,000
S132B5	S	0,025±0,002	0,217±0,071	0,000±0,000
S132B6	S	0,087±0,005	0,434±0,076	0,010±0,009
S133B1	S	0,158±0,007	0,314±0,151	0,049±0,049
S133B6	S	0,051±0,26	0,406±0,227	0,051±0,05
<i>P.putida</i> UW4 wild type	Control	0,158±0,007	0,643±0,017	0,297±0,008
<i>P.putida</i> UW4/AcdS ⁻	Control	0,042±0,011	0,573±0,023	0,037±0,003

En cuanto a los resultados obtenidos para las BAFEs evaluadas, se encontró que 15 aislamientos no crecieron en medio M9 con $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ como fuente de nitrógeno. Entre las 37 BAFEs que sí pudieron crecer en el medio de cultivo empleado, se resaltan 6 aislamientos, cuyos valores de densidad óptica alcanzados luego de 48 horas de crecimiento con ACC como fuente de nitrógeno, fueron intermedios entre los valores alcanzados en el blanco (MgSO_4) y con $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, sin embargo, solo en los aislamientos 2C05, 2C06, 6C02 y S93B1 se encontró que los valores de densidad óptica alcanzados en ACC eran más altos y estadísticamente diferentes de los alcanzados en el control con MgSO_4 . (test de Duncan, $\alpha=0,05$). Govindasamy *et al.*, (2009) evaluaron la actividad ACC deaminasa de 236 aislamientos bacterianos provenientes de diferentes especies vegetales, ellos realizaron un tamizaje inicial de los aislamientos en medio mínimo DF sólido suplementado con ACC a una concentración de 3 mM como fuente de N, y seleccionaron los aislamientos ACC positivos comparando el crecimiento en el medio con ACC y con $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$, luego, realizaron una aproximación similar a la desarrollada en el presente trabajo, en donde crecieron cada uno de los aislamientos en medio líquido DF con y sin ACC y midieron la densidad óptica a 600 nm, finalmente, seleccionaron 20 aislamientos que alcanzaron valores de densidad óptica desde 0.1, pese a que se empleó un medio de cultivo mínimo diferente al del presente trabajo. Este resultado resulta comparable con los valores de densidad óptica obtenidos para tres de los aislamientos seleccionados. Gontia-Mishra *et al.*, (2017) evaluaron la diversidad de bacterias productoras de ACC deaminasa de la rizosfera de plantas de trigo, de 38 aislamientos obtenidos, solo un aislamiento fue identificado dentro del género *Bacillus*, siendo todos en su mayoría del género *Klebsiella* y *Enterobacter*. Govindasamy *et al.*, (2017) aislaron 280 bacterias endófitas de raíz de sorgo y evaluaron diferentes actividades relacionadas con promoción de crecimiento vegetal, entre ellas, la actividad ACC deaminasa, solo 24 aislamientos mostraron esta actividad y dentro de ellos, cinco aislamientos pertenecieron al género *Bacillus*. Con un enfoque similar, Kumar *et al.*, (2012) caracterizaron siete aislamientos de *Bacillus* obtenidos de suelo rizosférico de frijol común, de los cuales, solo uno mostró actividad ACC deaminasa.

Todo lo anterior indica, de manera similar a lo obtenido en el presente estudio, que la actividad ACC deaminasa no es una actividad común dentro del grupo funcional de las BAFEs. No obstante, hay reportes que indican el efecto positivo de la inoculación de

Bacillus que presentan dicha actividad en el crecimiento de las plantas. En este sentido, Barnawal *et al.*, (2013) , evaluaron el efecto de la inoculación de una cepa de *B. subtilis* ACC deaminasa positiva en el crecimiento de plantas de *Trigonella foenum-graecum* bajo condiciones de estrés hídrico, y encontraron que la presencia de dicha bacteria mejoro la colonización de la micorriza *Rhizophagus irregularis* y del rizobio *Ensifer meliloti*, y que bajo el sistema tripartita con estos dos microorganismos se mejoró el crecimiento de la planta en un 56%, se redujo la concentración de ACC en las plantas en un 39% con respecto a las plantas estresadas no inoculadas y se indujeron cambios en los marcadores bioquímicos asociados a la respuesta a estrés como el contenido de clorofila, prolina y peroxidación de lípidos.

En cuanto a la metodología desarrollada, se puede mencionar, que esta técnica puede resultar en una estrategia rápida para poder seleccionar aislamientos con posible actividad ACC deaminasa, sin embargo, de permanecer trazas de nitrógeno en el inóculo empleado, se puede llevar a la obtención de falsos positivos. Varias investigaciones reportan otro tipo de metodologías que pueden resultar más sensibles y certeras para seleccionar microorganismos con esta actividad. De hecho, Penrose & Glick (2003) relacionan que la evaluación de la actividad ACC deaminasa requiere unas condiciones de crecimiento bacteriano que favorezcan la inducción de la actividad. Varios trabajos reportan la evaluación de la actividad ACC deaminasa de acuerdo con la metodología de Honma & Shimomura (1978), en la cual, luego de inducir la actividad en un medio mínimo suplementado con ACC, se obtienen extractos celulares que actúan sobre el sustrato ACC y posteriormente se cuantifica directamente uno de los productos de la hidrolisis del ACC, que es el α -cetobutirato, aproximación que sería más precisa y confiable para atribuir esta actividad a los aislamientos de interés y que podría ser aplicada para verificar la actividad de los aislamientos presuntamente positivos que se obtuvieron en el presente estudio.

4.2.6 Fijación biológica de Nitrógeno

Con el fin de evaluar si los aislamientos de BAFEs bajo estudio tenían la actividad de fijación biológica de N, se llevó a cabo el ensayo de reducción de acetileno en medio NFb suplementado con glucosa y manitol, estas fuentes de carbono fueron seleccionadas luego de encontrar que varias investigaciones reportaron el uso de ellas para evaluar dicha actividad en bacterias de géneros pertenecientes al grupo funcional de BAFEs (Halsall & Gibson, 1989; Seldin *et al.*, 1983; Mollica *et al.*, 1985; Chávez-Ambriz *et al.*, 2016).

De los 52 aislamientos evaluados, solo cuatro mostraron actividad de reducción de acetileno (tabla 4-5), sin embargo, las concentraciones de etileno producidas fueron muy bajas en comparación con una cepa control perteneciente al género *Azospirillum* reconocida como diazotrófica. Mollica *et al.*, (1985) relacionan que la actividad de la fijación biológica de nitrógeno en bacterias del género *Bacillus* no es ampliamente reconocida, y que se ha encontrado principalmente en cuatro especies: *B.polymyxa*, *B.macerans*, *B.circulans* y *B.azotofixans*.

Tabla 4-5. Actividad de reducción de acetileno (ARA) de aislamientos de BAFEs que resultaron positivos para esta actividad.

Aislamiento de BAFE	nmol C ₂ H ₂ . vial ⁻¹ .h ⁻¹
S93B1	0,476±0,169
S93B5	0,517±0,356
S132B3	0,209±0,024
S132B5	0,284±0,080
<i>Azospirillum brasiliensis</i>	266,917±15,567

Navarro-Noya *et al.*, (2012) evaluaron la actividad de reducción de acetileno en 8 aislamientos de BAFEs pertenecientes al género *Paenibacillus*, encontrando que todos ellos eran positivos para esta actividad, con rangos de producción de etileno que oscilaron entre 0,1 y 169,4 nmol C₂H₂. cultivo⁻¹.h⁻¹, los valores de ARA más bajos encontrados resultan similares a los reportados en el presente estudio, de hecho, los autores reportan la amplificación de los genes *nifH* y *nifD* en dos aislamientos cuya actividad no superó los 0,6 nmol C₂H₂. cultivo⁻¹.h⁻¹, lo cual no descartaría la idea de que los aislamientos que mostraron algún nivel de actividad en el presente estudio puedan presentar realmente la

actividad nitrogenasa, sin embargo, estos valores son muy bajos en comparación con la actividad nitrogenasa de bacterias diazotróficas de otros géneros que han sido ampliamente estudiados en la caña de azúcar como *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* o *Herbaspirillum* (Muangthong *et al.*, 2015; Suman *et al.*, 2008).

Otros trabajos relacionan una actividad nitrogenasa de bacterias del género *Bacillus* por encima de la obtenida en el presente estudio, Park *et al.*, (2005) por ejemplo, reportan una producción de 3677,81 nmol etileno. h⁻¹ mg⁻¹ proteína para una cepa identificada como *Bacillus fusiformis* aislada de suelo rizosferico de plantas de arroz. Madhaiyan *et al.*, (2011) relacionan una actividad ARA de 42,5 nm etileno. h⁻¹.mg⁻¹ proteína para un aislamiento que identificaron como *Bacillus rhizosphaerae* aislado de suelo rizosferico de un cultivo de caña de azúcar, además encontraron que dicho aislamiento exhibía otras actividades relacionadas con promoción de crecimiento vegetal como actividad ACC deaminasa y producción de compuestos indólicos. Lo anterior indica, que, pese a que la actividad nitrogenasa no es una actividad destacada dentro de los aislamientos de BAFEs del presente estudio, si se reportan cepas de este grupo bacteriano que puedan destacarse en esta actividad y convertirse en potenciales promotores de crecimiento vegetal por más de un mecanismo asociado a su metabolismo.

4.2.7 Antagonismo contra hongos fitopatógenos

- Capacidad antagónica frente a un aislamiento presuntivo de *Sclerotium*

Se evaluó la capacidad antagónica de los 52 aislamientos de BAFEs frente a un aislamiento presuntivo del hongo *Sclerotium* aislado de plántulas de caña panelera establecidas en el centro de investigación CIMPA, la figura 4-8 relaciona el porcentaje de aislamientos que fueron obtenidos de cada una de las regiones de estudio, dentro de cada categoría de inhibición, como se observa, solo el 4% de los aislamientos mostraron un antagonismo positivo. La figura 4-7 muestra el crecimiento del hongo sin presencia de bacteria y en presencia de los dos aislamientos de BAFEs que fueron capaces de controlar el hongo bajo condiciones *in vitro*.



Figura 4-7. Crecimiento del hongo *Sclerotium* luego de 3 días en medio PDA. A) Control negativo. B) En presencia de la BAFE S93B1. C) En presencia de la BAFE 2C11.

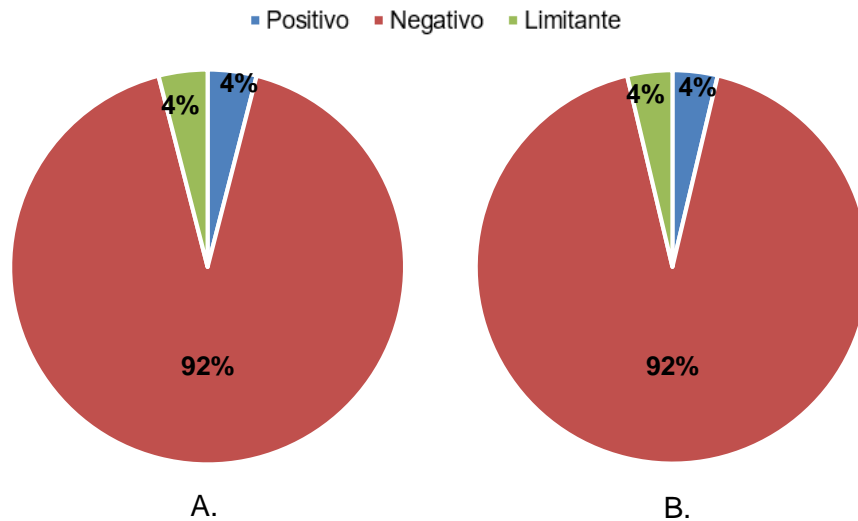


Figura 4-8. Porcentaje de aislamientos pertenecientes a cada una de las categorías de inhibición de crecimiento del aislamiento presuntivo de *Sclerotium*. A. Aislamientos provenientes de Cundinamarca. B. Aislamientos provenientes de Santander

En total, solo el 8% de los aislamientos evaluados tendrían la capacidad de limitar el crecimiento de este hongo, lo cual indicaría la resistencia del mismo frente al biocontrol. Otras investigaciones han relacionado especies de *Bacillus* que poseen un potencial uso en el control de enfermedades ocasionadas por este agente. Backhouse y Stewart (1989) por ejemplo, relacionan que se han aislado cepas de *Bacillus* a partir de esclerocios no viables de *Sclerotium cepivorum*, lo cual sugiere según los autores, que la bacteria puede parasitar estas estructuras de resistencia,

de hecho, relacionan, que varios aislados han mostrado un nivel de protección importante frente a la pudrición blanca cuando se aplica en semillas de cebolla al momento de la siembra.

Farizan (2006) reporta un aislamiento de *Bacillus subtilis* con actividad antagonica frente a *Sclerotium rolfsii* y relaciona que dicha cepa produce compuestos bioactivos contra el hongo, estables a altas temperaturas y en un amplio rango de pH, que oscila entre 3 y 11.

Hameeda, Rupela y Reddy (2006) reportan que, de 207 aislamientos de bacterias obtenidas de 3 tipos de compost y macrofauna, 18 aislamientos presentaron actividad antagonica frente a hongos fitopatógenos y 12 de ellos pertenecieron al género *Bacillus*, todos con algún nivel de antagonismo frente a *Sclerotium rolfsii*.

La figura 4-9 muestra el área de inhibición de crecimiento micelial de *Sclerotium* en presencia de las dos BAFEs con antagonismo positivo, medida mediante el programa Rhinoceros 5.0, el aislamiento 2C11 proveniente de Cundinamarca presento un área de inhibición estadísticamente similar al control positivo AP188, esta cepa podría ser posteriormente estudiada con el fin de establecer su efecto en el biocontrol del hongo *in vivo* o de dilucidar posibles mecanismos que estén implicados en el antagonismo frente a este hongo fitopatógeno.

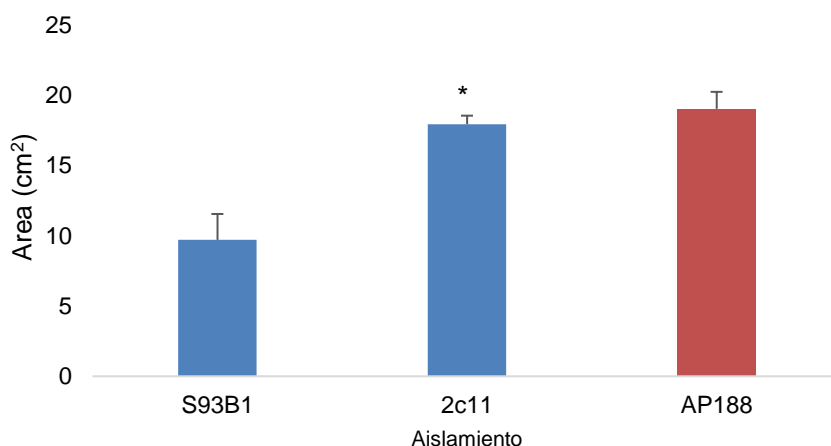


Figura 4-9. Área de Inhibición de crecimiento micelial de *Sclerotium* por aislamientos de BAFEs categorizados como positivos para esta actividad. Las barras de error corresponden al error estándar. Los asteriscos (*) señalan las medidas estadísticamente similares al control positivo AP188 con un $\alpha=0,05$.

- Capacidad antagonística frente a *Rhizoctonia solani*.

La evaluación de la capacidad antagonística de los 52 aislamientos de BAFEs frente a *Rhizoctonia solani* mostró que el 40% de los aislamientos provenientes de plantas de caña panelera establecidas en Cundinamarca pueden limitar o controlar positivamente este hongo fitopatógeno *in vitro*, un porcentaje mayor, en comparación con los aislamientos provenientes de Santander (Figura 4-10), sin embargo, de acuerdo con el test exacto de Fisher desarrollado para comparar la distribución de los antagonismos en ambas regiones, no se encontraron diferencias estadísticas ($P=0,11$). La figura 4-11 muestra las áreas de inhibición micelial de *Rhizoctonia solani* por aislamientos que mostraron antagonismo positivo.

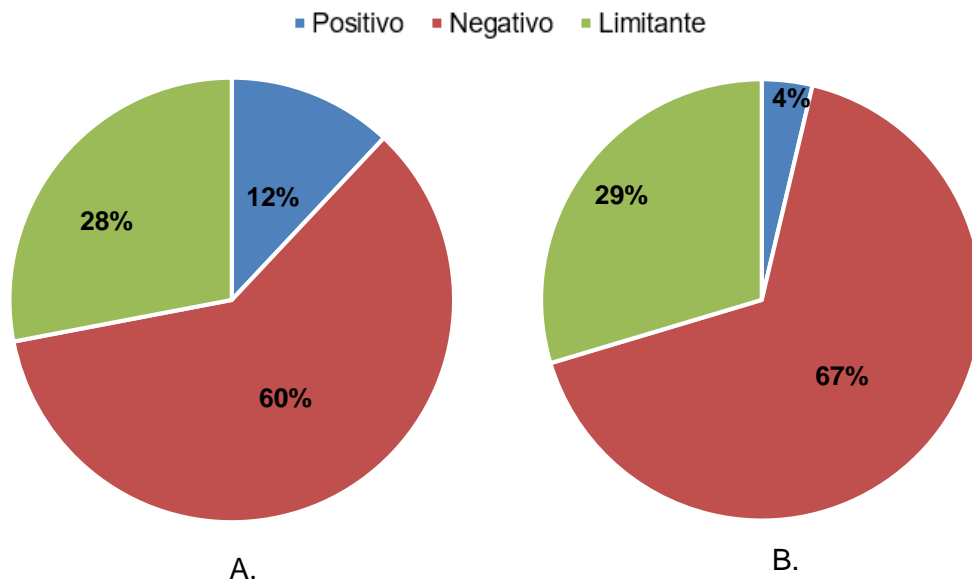


Figura 4-10. Porcentaje de aislamientos pertenecientes a cada una de las categorías de inhibición de crecimiento micelial del hongo *Rhizoctonia solani*. A. Aislamientos provenientes de Cundinamarca. B. Aislamientos provenientes de Santander

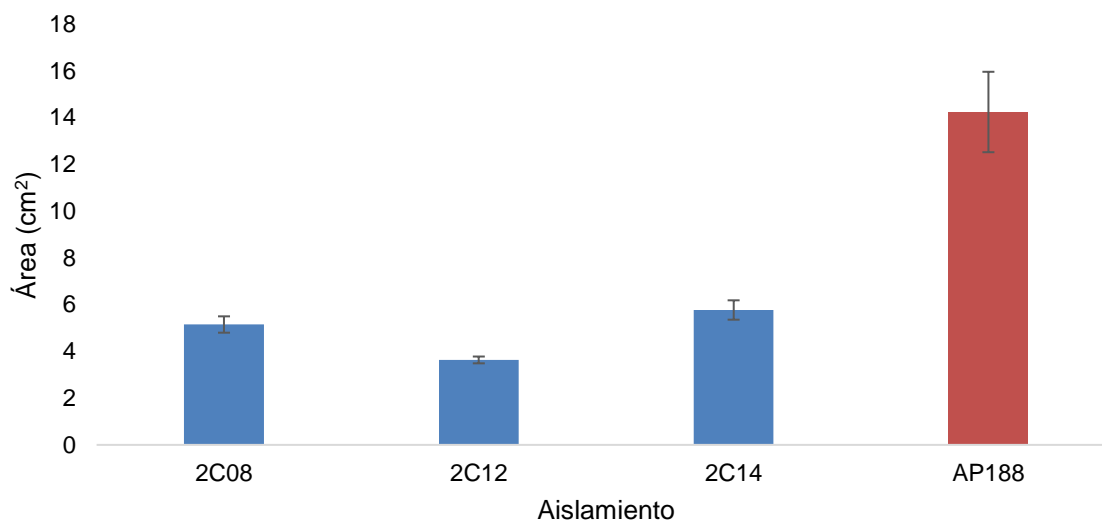


Figura 4-11. Área de Inhibición de crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* por aislamientos de BAFEs categorizados como positivos para esta actividad. Las barras de error corresponden al error estándar. No se encontraron medidas estadísticamente similares al control positivo AP188.

En general, el 36,5 % de los aislamientos evaluados mostraron capacidad antifúngica frente a *Rhizoctonia*, ya sea por antagonismo positivo o limitante. Haque *et al.*, (2016) reportan dentro de un grupo de aislamientos de endófitos de raíz de col china, 11 pertenecientes al grupo de las BAFEs, de los cuales 6 presentaron capacidad antifúngica frente a *Rhizoctonia solani*, una proporción mayor a la encontrada en el presente trabajo. Todorova & Kozhuharova (2010) aislaron 9 BAFEs, de las cuales 3 presentaron actividad antifúngica no solo frente a *Rhizoctonia solani*, sino también frente a otros hongos fitopatogenos como *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Sclerotinia sp* y *Fusarium graminearum*, ellos encontraron una proporción de antagonistas similar a la reportada en este trabajo, y, además, resaltan el amplio espectro de acción de las bacterias pertenecientes al grupo de *Bacillus* que caracterizaron.

En cuanto a la tendencia observada, relacionada con una mayor capacidad antagonica frente a *Rhizoctonia solani*, de los aislamientos provenientes de Cundinamarca, varios trabajos han relacionado que los diferentes manejos de los cultivos pueden influir en la estructura de la comunidad microbiana y en los mecanismos involucrados en la promoción de crecimiento vegetal de las rizobacterias (Melo *et al.*, 2016).

En este sentido, Kim *et al.*, (2011), encontraron en suelos tratados con compost, una mayor abundancia de bacterias con capacidad antifúngica de los géneros *Bacillus* y *Burkholderia*, en comparación con suelos sin esta enmienda orgánica. Este resultado de alguna forma se relaciona con los resultados obtenidos en el presente trabajo, puesto que en cultivos de caña panelera establecidos en Cundinamarca, de donde se obtuvo el mayor número de BAFEs antagonistas, los productores incorporan el bagazo y la materia orgánica del cultivo de la caña, lo cual se puede interpretar como el uso de enmiendas orgánicas, y de acuerdo al análisis de componentes principales de las características físicas y químicas del suelo, la materia orgánica y el nitrógeno fueron los parámetros que permitieron diferenciar las dos regiones de estudio. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, no se encontraron diferencias estadísticas al comparar la distribución de las tres categorías de antagonismos en ambas regiones, probablemente por la evaluación de un número insuficiente de aislamientos en actividad antagónica frente a *Rhizoctonia solani*. Kim *et al.*, (2011) indican que aún no es claro cuál es el efecto de este tipo de enmiendas orgánicas en el enriquecimiento de bacterias con capacidad de biocontrol.

Garbeva *et al.*, (2004) encontraron también, un efecto en el manejo del suelo sobre la actividad antifúngica de microorganismos, estos investigadores relacionan la obtención de un mayor número de aislamientos de *Pseudomonas* con capacidad antagónica frente al patógeno *Rhizoctonia solani* AG3 provenientes de suelos con pastos permanentes en comparación con suelos arados. De forma similar, Kravchenko *et al.*, (2003) relacionan que la actividad antagónica de las rizobacterias depende de las propiedades “eco-químicas” que se dan en la rizosfera, y, por tanto, la síntesis de compuestos relacionados con la actividad biocontroladora va a depender de las fuentes de carbono presentes en los exudados radiculares de una planta en particular.

En este contexto, sería importante señalar que la tendencia observada en esta actividad, puede estar dada por factores como el manejo diferencial de la fertilización en las dos regiones, la presencia de una composición diferente de los exudados radiculares de plantas de caña panelera establecidas en las dos regiones (producto de la siembra de cultivariedades diferentes) o la generación de nichos ecológicos particulares, dado por la interacción de los factores diferenciales que se pueden dar en una u otra región. No obstante, hipótesis de este tipo deben ser evaluadas rigurosamente con el fin de poder explicar de manera real la selección de bacterias con actividad biológica diferencial en

cultivos con regímenes de manejo diferentes, evaluaciones que estarían por fuera de los objetivos del presente trabajo.

- Capacidad antagonica frente a *Botrytis* sp.

La figura 4-12 muestra el porcentaje de aislamientos dentro de cada categoría de antagonismo que fueron obtenidos de las dos regiones de estudio, se observa, que de manera similar al escenario anteriormente descrito en las evaluaciones frente a *Rhizoctonia solani*, existe un mayor porcentaje de aislamientos que provienen de Cundinamarca con capacidad antifúngica frente a *Botrytis* sp, y de acuerdo con el test exacto de Fischer desarrollado para esta variable categórica, existen diferencias estadísticas entre la distribución de los antagonismos de las dos regiones de estudio ($\alpha=0,05$; $P=0,000407$). La figura 4-13 muestra el área de inhibición micelial de los aislamientos que mostraron antagonismo positivo frente a *Botrytis* sp.

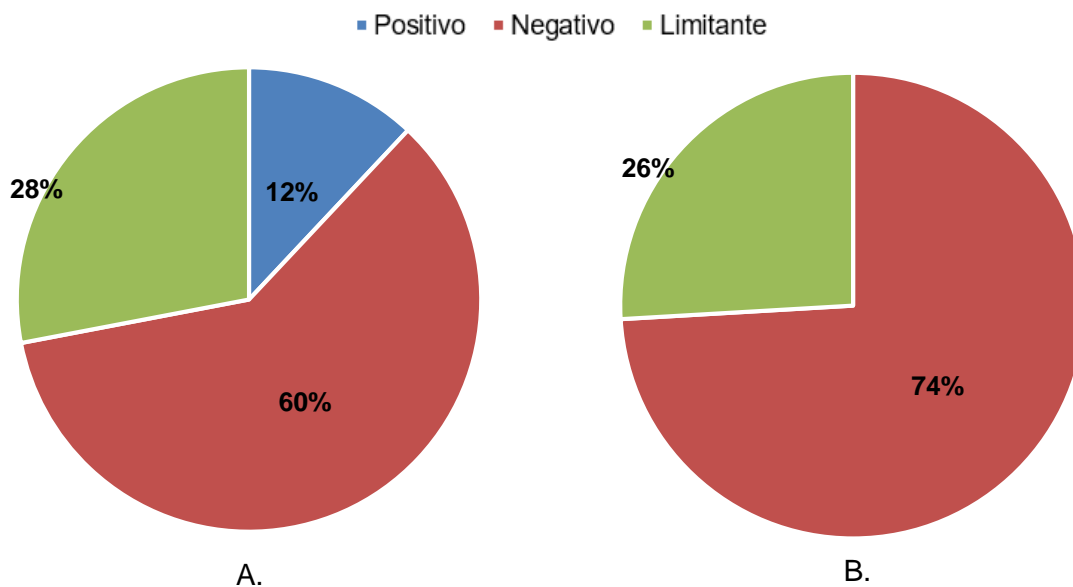


Figura 4-12. Porcentaje de aislamientos pertenecientes a cada una de las categorías de inhibición de crecimiento micelial del hongo *Botrytis*. A. Aislamientos provenientes de Cundinamarca. B. Aislamientos provenientes de Santander

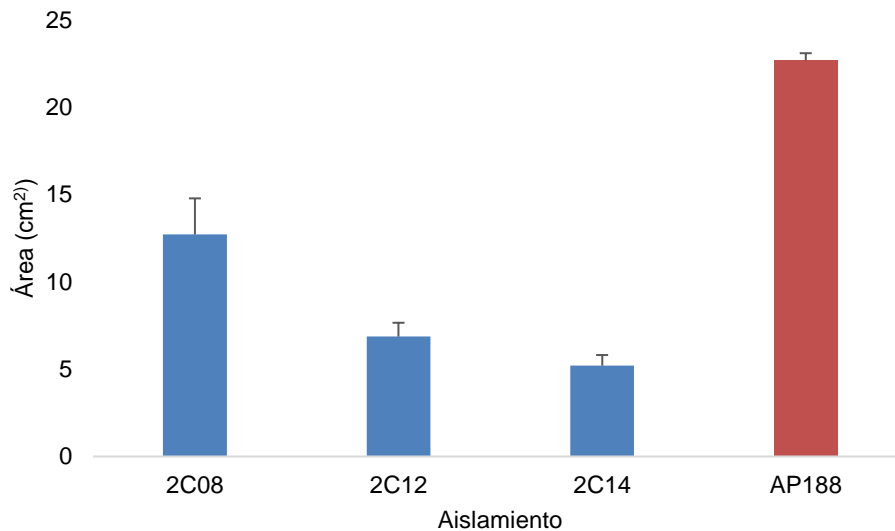


Figura 4-13. Área de Inhibición de crecimiento micelial de *Botrytis* por aislamientos de BAFEs categorizados como positivos para esta actividad. Las barras de error corresponden al error estándar. No se encontraron medidas estadísticamente similares al control positivo AP188.

En general, el 32,6 % del total de aislamientos evaluados mostraron capacidad antifúngica frente a *Botrytis* sp, incluyendo los antagonismos positivos y limitantes. Un porcentaje similar al encontrado en las evaluaciones frente a *Rhizoctonia solani*. Kefi *et al.*, (2015) en una aproximación similar a la aquí desarrollada, evaluaron la actividad antifúngica frente a *Botrytis cinerea* Pers, de 80 bacterias endófitas obtenidas de diferentes tejidos de *Lycopersicon esculentum*, aunque no relacionan el porcentaje de aislamientos que fueron positivos en sus ensayos de antagonismo dual, relacionan que cuatro cepas, las cuales pertenecieron al género *Bacillus*, fueron las más activas, inhibiendo el crecimiento del micelio del hongo entre un 27 y 53% con respecto el control. Los lipopéptidos de los sobrenadantes de las cepas endófitas fueron identificados mediante espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS), encontrando la presencia de surfactinas, Bacilomicina D y fengicinas, de hecho, relacionan que en los sobrenadantes de la cepa que exhibió la actividad más alta, estaban presentes tanto compuestos tipo fengicinas como Bacilomicina D. Ait kaki *et al.*, (2014) evaluaron la capacidad antagónica frente a varios hongos fitopatógenos de 14 aislamientos de BAFEs provenientes de ambientes extremos (salinidad y temperatura) de Argelia Oriental, el 50% de ellos exhibieron capacidad antagónica *in vitro* frente a *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*, y en cinco

de ellos, fue detectada la producción de lipopéptidos tipo fengicinas y surfactinas, así como las actividades proteasa y celulasas, asociadas con la degradación de pared celular. Estas aproximaciones muestran que en el grupo de las BAFEs se pueden encontrar aislamientos potencialmente útiles en el manejo de enfermedades asociadas a este hongo fitopatógeno.

Tal como se mencionó anteriormente, los aislamientos provenientes de Cundinamarca resultaron mas destacados en la actividad antagónica frente a *Botrytis* sp., en comparación con las BAFEs de Santander, hecho que podría reafirmar que un manejo diferencial de los suelos y cultivos puede incidir en las actividades de promoción de crecimiento vegetal de los microorganismos asociados. Balaraju *et al.*, (2014), por ejemplo, encontraron que la eficacia de una cepa de *Bacillus subtilis* en el control de *Botrytis cinerea* fue favorecida en suelos orgánicos en comparación con “suelos de cama de siembra” que tienen una fertilización química. No obstante, otro factor que puede incidir en la selección de bacterias con una u otra actividad es la composición de los exudados radiculares de las plantas, Miller *et al.*, (1989) señalan que la especificidad de los aislamientos bacterianos en la rizosfera se debe a la cantidad y composición de los exudados radiculares los cuales pueden variar entre especies vegetales e incluso de un cultivar a otro. Das *et al.*, (2010) encontraron en este sentido, por ejemplo, que los exudados radiculares del tabaco favorecen la actividad de promoción de crecimiento vegetal y actividad quitinolítica de una cepa de *Paenibacillus elgii* en comparación con medios de cultivo que no fueron suplementados con exudados radiculares de esta planta.

4.3 Identificación molecular de aislamientos

La tabla 4-6 muestra la identidad de los 52 aislamientos de BAFEs luego de la secuenciación del marcador filogenético rRNA 16S y posterior alineamiento con secuencias de la base de datos Ribosomal Database Project .

Tabla 4-6. Identidad de los aislamientos según la amplificación del gen rRNA 16S.

Aislamiento	Origen	S_ab score	Identidad
2C10	Cundinamarca	1.000	<i>Bacillus cereus</i>
2C11	Cundinamarca	0.985	<i>B.cereus</i>
2C12	Cundinamarca	1.000	<i>B.cereus/B.thuringiensis</i>
2C13	Cundinamarca	1.000	<i>Bacillus sp./B.cereus</i>
2C14	Cundinamarca	1.000	<i>Bacillus sp./B.cereus</i>
2C01	Cundinamarca	1.000	<i>Bacillus sp./B.cereus</i>
2C02	Cundinamarca	1.000	<i>Bacillus sp./B.megaterium</i>
2C05	Cundinamarca	1.000	<i>Bacillus sp./B.megaterium</i>
2C06	Cundinamarca	1.000	<i>Bacillus sp./B.megaterium</i>
2C07	Cundinamarca	1.000	<i>B.thuringiensis</i>
2C08	Cundinamarca	1.000	<i>B.thuringiensis</i>
2C09	Cundinamarca	0.993	<i>B.thuringiensis</i>
6C01	Cundinamarca	1.000	<i>B.atrophaeus</i>
6C02	Cundinamarca	0.985	<i>B.megaterium</i>
6C03	Cundinamarca	1.000	<i>B.thuringiensis</i>
6C04	Cundinamarca	1.000	<i>B.macroides</i>
6C05	Cundinamarca	1.000	<i>B.megaterium</i>
6C06	Cundinamarca	1.000	<i>Bacillus sp./B.cereus</i>
6C07	Cundinamarca	1.000	<i>Bacillus sp./B.megaterium</i>
6C08	Cundinamarca	1.000	<i>B.pumilus</i>
6C09	Cundinamarca	1.000	<i>Bacillus sp./B.megaterium</i>
6C18	Cundinamarca	1.000	<i>Bacillus sp./B.cereus</i>
6C19	Cundinamarca	1.000	<i>Bacillus sp./B.cereus</i>
6C20	Cundinamarca	1.000	<i>Bacillus sp./B.cereus</i>
6C21	Cundinamarca	1.000	<i>Bacillus sp./B.megaterium</i>

S92B3	Santander	1.000	<i>Bacillus sp./B.megaterium</i>
S92B4	Santander	1.000	<i>B.macroides</i>
S92B5	Santander	1.000	<i>Bacillus sp./B.megaterium</i>
S92B7	Santander	1.000	<i>B.macroides</i>
S92B8	Santander	0.991	<i>B.pumilus</i>
S93B1	Santander	1.000	<i>Bacillus sp./B.cereus</i>
S93B2	Santander	0.995	<i>B.pumilus</i>
S93B3	Santander	1.000	<i>B.macroides</i>
S93B4	Santander	0.994	<i>B.thuringiensis</i>
S93B5	Santander	1.000	<i>B.cereus</i>
S93B6	Santander	1.000	<i>B.macroides</i>
S93B7	Santander	1.000	<i>Bacillus sp./B.macroides</i>
S93B8	Santander	1.000	<i>Bacillus sp./B.megaterium</i>
S131B10	Santander	1.000	<i>B.macroides</i>
S131B2	Santander	1.000	<i>Bacillus sp./B.macroides</i>
S131B3	Santander	1.000	<i>B.cereus</i>
S131B5	Santander	1.000	<i>Bacillus sp./B.cereus</i>
S131B8	Santander	0.995	<i>Bacillus sp.</i>
S131B9	Santander	1.000	<i>B.megaterium</i>
S132B2	Santander	1.000	<i>B.cereus/B.thuringiensis</i>
S132B3	Santander	1.000	<i>Bacillus sp./B.megaterium</i>
S132B5	Santander	1.000	<i>B.macroides</i>
S132B6	Santander	1.000	<i>B.macroides</i>
S133B1	Santander	1.000	<i>B.megaterium</i>
S133B3	Santander	1.000	<i>Bacillus sp.</i>
S133B4	Santander	1.000	<i>Bacillus sp.</i>
S133B6	Santander	0.999	<i>B.macroides/B.simplex</i>



Figura 4-14. Árbol de distancia genética construido mediante el método Neighbor-Joining basado en secuencias de la región 16S rRNA.

De acuerdo con la tabla 4-6 los alineamientos de las secuencias de las BAFEs estudiadas con las secuencias de la base de datos RDP presentaron un S_{ab} score alto, sin embargo, aquí mismo se observa que en 24 aislamientos la secuencia tuvo un S_{ab} score igual para *Bacillus* sp. que para una especie de *Bacillus* en particular, lo anterior, indicaría la limitación que existe al usar el marcador filogenético rRNA 16S para poder obtener con certeza una identificación bacteriana a nivel de especie.

Pese a lo descrito anteriormente, la figura 4-14 muestra que todos los aislamientos de BAFEs se agruparon en alguno de los subgrupos formados en el árbol de distancia genética, esta figura muestra la formación de 5 grupos o clados, el primero corresponde al subgrupo de *B. cereus/B. thuringiensis* y reunió a 40,3% de los aislamientos estudiados, el segundo clado agrupó al único aislamiento identificado como *Bacillus atrophaeus*, proveniente de la región de Cundinamarca, el tercer clado agrupó al 21,1 % de los aislamientos con dos secuencias de referencias correspondientes a *Bacillus macroides*, el cuarto clado reunió al 28,8 % de los aislamientos en asociación con las dos secuencias de referencia de *Bacillus megaterium* y por último, tres aislamientos, dos provenientes de Santander y uno de Cundinamarca se agruparon con las dos secuencias de referencia para *Bacillus pumilus*.

Orberá Ratón *et al.*, (2012) en una aproximación similar a la del presente estudio, aislaron 18 BAFEs de la rizósfera de plantas de caña de azúcar mediante una metodología comparable con la desarrollada para obtener los aislamientos del presente trabajo, estos investigadores, identificaron los aislamientos empleando también el marcador filogenético rRNA 16S y encontraron una distribución de los aislados en 4 géneros: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* y *Cohnella*. Siendo el primero de ellos el más abundante dentro de las bacterias obtenidas.

Antunes *et al.*, (2017) reportan el aislamiento de varias especies de *Bacillus* endófitos de caña de azúcar, relacionan la asociación de *B. megaterium* y *B. pumilus*, los cuales fueron también identificados dentro del grupo de bacterias del presente estudio, sin embargo, estos investigadores también reportan el aislamiento de otras especies como *B. subtilis* y *B. methylotrophicus*, que no fueron identificados dentro del grupo funcional estudiado.

Varias investigaciones reportan el aislamiento de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* sp. de rizosfera, raíces y tallos de caña de azúcar (Antwerpen et al., 2002; Hassan et al., 2010). Velásquez *et al.*, (2008) reportan el aislamiento de *B. cereus*, *B. pumilus* y *B. subtilis* del apoplasto de esta planta, Kruasuwan & Thamchaipenet (2016) también relacionan el aislamiento de cinco bacterias endófitas de caña de azúcar pertenecientes a las especies de *B. amyloliquefaciens*, *B. aryabhatai*, *B. safensis*, *B. aerophilus* y *B. subtilis*. En este sentido, llama la atención que sea posible aislar bacterias de este grupo funcional de tejidos internos de la planta, puesto que esto indicaría que hay especies de *Bacillus* que tienen buena capacidad de colonización de plantas de caña de azúcar, lo cual representaría una ventaja frente a otras rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Minh & Ngoc (2017) reportan un aislamiento obtenido de tallo de caña de azúcar que fue identificado mediante el marcador filogenético rRNA 16S como *B. atropheus*, sin embargo, tuvo el mismo porcentaje de identidad con una cepa de *B. amyloliquefaciens*, lo cual reafirma la limitación del uso de este gen para poder establecer con cierto nivel de confianza la especie de aislamientos pertenecientes a este grupo funcional.

B. atropheus no es ampliamente reportado en la literatura como un habitante común de la rizosfera de caña de azúcar, sin embargo, Vos *et al.*, (2009) relacionan que esta especie de *Bacillus* también es relacionada en la literatura como “*B. subtilis* var *subtilis*”, “*Bacillus globigii*” o “*Bacillus niger*” y que esa diferenciación entre *B. atropheus* y *B. subtilis* está dada básicamente por la producción de un pigmento cuando la cepa es cultivada en un medio que contiene una fuente de nitrógeno orgánico (Sella *et al.*, 2015). No obstante, esta especie de BAFE se ha relacionado dentro del grupo de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal, Kardilag *et al.*, (2013) relacionan, por ejemplo, que la inoculación con cepas de esta y otras especies de *Bacillus* (*B. subtilis* y *B. sphaericus*) incrementaron el contenido de clorofila, nutrientes y rendimiento de plantas de *Fragaria ananassa* creciendo bajo condiciones de estrés osmótico. Sella *et al.*, (2015) también relacionan que cepas de esta especie son empleadas para estudios de la inactivación de esporas y como indicadores biológicos de esterilización, así como promotoras de crecimiento vegetal y estudios de control biológico por la producción de diferentes biomoléculas.

Como se mencionó anteriormente, el 21,1% de los aislamientos fueron identificados como *B. macroides*, sin embargo, Coorevits *et al.*, (2012) relacionan que esta especie ha sido

constantemente reclasificada y desarrollaron estudios de huella genética y peptídica (DNA y MALDI fingerprinting) donde encontraron que *Bacillus macroides* comparte la composición del peptidoglicano de la pared celular con el género *Lysinibacillus*, esto, sumado a otras características fenotípicas llevaron a clasificar una cepa tipo originalmente identificada como *B.macroides* (LGM 18474) dentro de la especie *Lysinibacillus macroides*. *B.macroides* no es reportado en la literatura como un habitante común de la rizosfera de la caña de azúcar, no obstante, Kruasuwan & Thamchaipenet (2016) si reportan un aislamiento con 100% de similaridad con la cepa tipo de *Lysinibacillus macroides* LGM 18474 obtenida de la raíz de plantas de caña de azúcar en la provincia de Chaiyaphum, Tailandia, además, relacionan que esta cepa tiene actividad de reducción de acetileno y presencia del gen *nifH*, así como actividad ACC deaminasa. Sin embargo, todo lo anterior indicaría, que es necesario poder llevar a cabo otros tipos de estudios a nivel molecular con el fin de esclarecer la identidad de los aislamientos que fueron agrupados en ese clado dentro del árbol de distancia genética construido. Además de esto, el 90% de los aislamientos que se asociaron a este clado provienen de Santander, lo cual indicaría que las condiciones de manejo de dicho cultivo (planta-suelo) podrían estar seleccionando este grupo de bacterias en particular.

Varias investigaciones reportan el aislamiento de Bacterias pertenecientes al grupo de *B.megaterium* a partir de tejidos y suelo rizosferico de plantas de caña, Solanki *et al.*, (2017) por ejemplo, relacionan el aislamiento de dos cepas identificadas como *B. megaterium* a partir de suelo de cultivos de caña de azúcar y encontraron que los dos aislamientos, presentaban actividades relacionadas con promoción de crecimiento vegetal como producción de sideróforos, producción de ácido indolacético en ausencia de triptófano, actividad ACC deaminasa y actividad nitrogenasa. Tam & Diep (2015) también reportan el aislamiento de BAFEs identificadas como *B.megaterium* a partir de suelo rizosférico de plantas de caña de azúcar establecidas en la provincia de Dong Nai, Vietnam, encontraron además que todos los aislamientos obtenidos asociados a este grupo tenían capacidad de solubilizar fosfato tricálcico y producir compuestos indólicos en ausencia de triptófano como precursor del AIA.

4.4 Evaluación bajo condiciones de Invernadero

4.4.1 Evaluación de Invernadero con la variedad POJ 2878

Con el fin de evaluar el efecto de la inoculación de cinco aislamientos de BAFEs sobre el crecimiento de plantas de caña panelera de la variedad POJ 2878, se desarrolló un ensayo bajo condiciones de invernadero, en el cual, transcurridos 60 días desde la inoculación, se evaluaron como variables de respuesta la longitud del vástago, el diámetro del tallo, el peso seco del vástago y el peso seco de la raíz de las plantas. Se seleccionaron los aislamientos con alta capacidad de solubilización de fosfato tricálcico *in vitro*.

Tal como se mencionó en la sección 3.4, dada la heterogeneidad en el tamaño de las plántulas de 30 días que fueron empleadas para el ensayo, se establecieron cuatro rangos de alturas de plantas o bloques, y dentro de cada rango se aplicaron los diferentes tratamientos.

Los resultados fueron analizados mediante un diseño de bloques completamente aleatorizados (BCA) en el programa R studio, y se empleó para todas las variables el test de comparaciones múltiples de Duncan con un nivel de significancia (α) de 0,05, cabe mencionar, que todas las medidas de las variables cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas evaluados mediante el test de shapiro-wilk y el test de Bartlett, respectivamente. Según el modelo de ANOVA desarrollado, se encontró efecto tanto del bloque (Rango de altura de las plantas) como de los tratamientos en todas las variables evaluadas ($p < 0,05$).

La figura 4-15 muestra los resultados obtenidos para la variable longitud de vástago medida en cm, la gráfica relaciona la media de longitudes dentro de todos los rangos de alturas. Se observa que el tratamiento 4 correspondiente al aislamiento 6C07 asociado dentro del clado de *B. megaterium*, fue el único que resultó estadísticamente similar al tratamiento 7 de fertilización completa y diferente al tratamiento 6 sin inocular y con roca fosfórica.

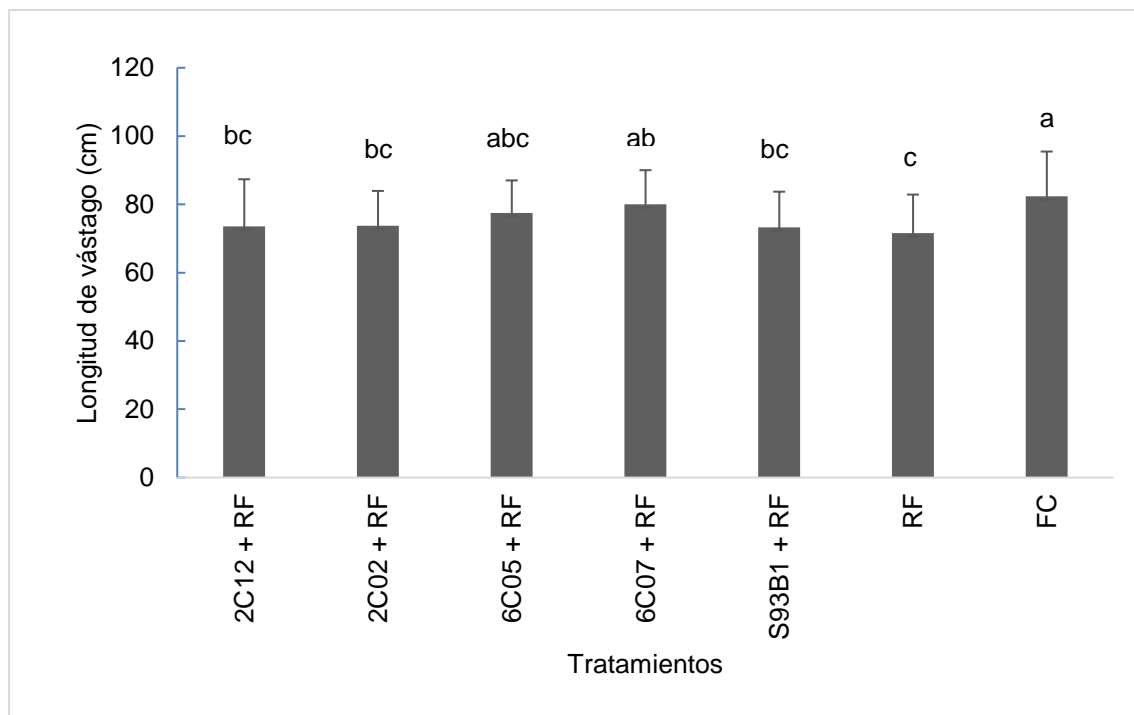


Figura 4-15. Longitud de vástago de plantas de caña panelera para cada tratamiento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). 2C12, 2C02, 6C05, 6C07 y S93B1 corresponden a los diferentes aislamientos de BAFEs inoculados, RF= roca fosfórica, FC= Tratamiento de fertilización completa.

La figura 4-16 muestra los resultados obtenidos para la variable diámetro de tallo medida en mm, la gráfica relaciona la media de los diámetros dentro de todos los rangos de alturas. Se observan diferencias estadísticas únicamente entre el control con fertilización completa y el tratamiento con roca fosfórica sin inocular, lo cual indica que el modelo vegetal empleado es adecuado para observar diferencias en términos de las variables de fertilización empleadas. Ningún tratamiento inoculado fue estadísticamente diferente al control sin inocular, sin embargo, los tratamientos 1 y 5 mostraron una tendencia a parecerse más al control de fertilización completa (T7) que al control sin inocular (T6).

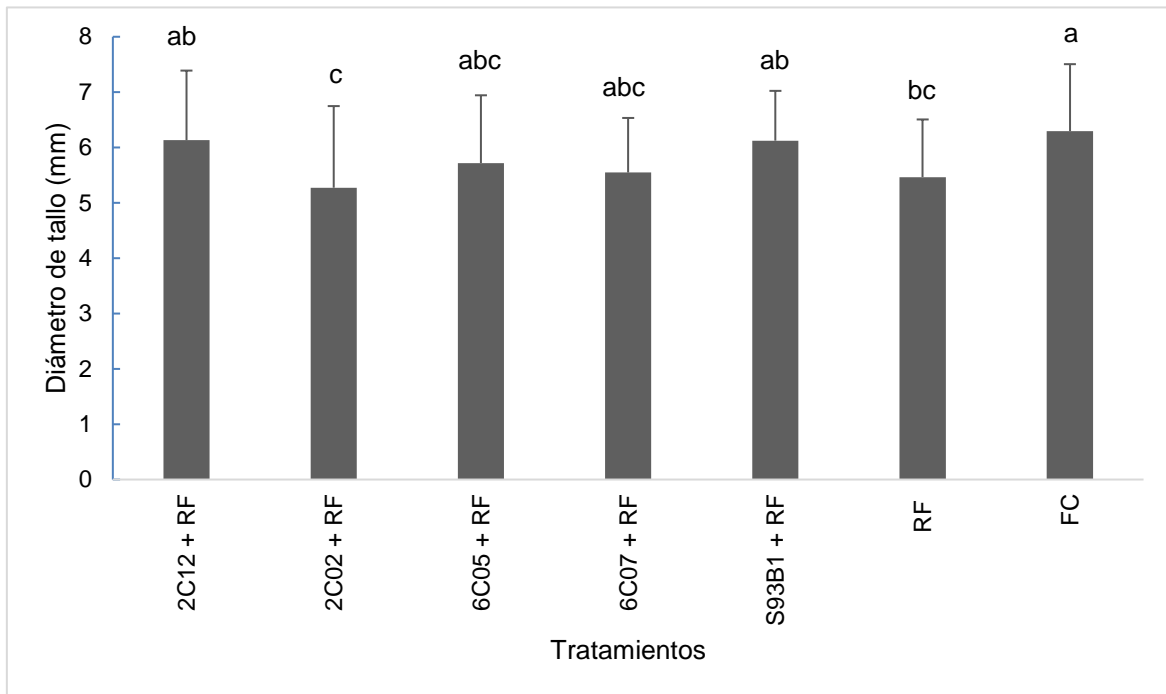


Figura 4-16. Diámetro de tallo para cada tratamiento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). 2C12, 2C02, 6C05, 6C07 y S93B1 corresponden a los diferentes aislamientos de BAFEs inoculados, RF= roca fosfórica, FC= Tratamiento de fertilización completa.

En cuanto a los resultados obtenidos para la variable peso seco de vástago (Figura 4-17), no se encontraron diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos inoculados y el control sin inocular (Tratamiento RF). El tratamiento 2 (2CO2 + RF) y el tratamiento 6 (RF) fueron diferentes estadísticamente del tratamiento 7 correspondiente al control con fertilización completa.

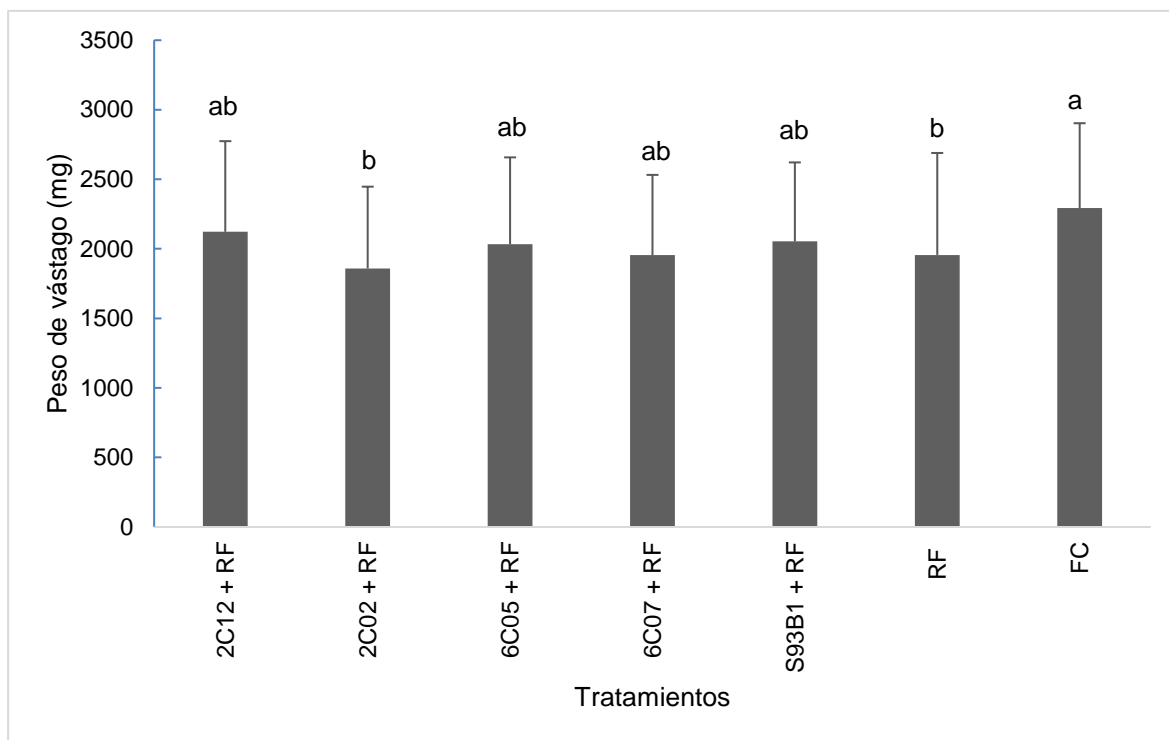


Figura 4-17. Peso seco de vástago para cada tratamiento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($\alpha= 0,05$). 2C12, 2C02, 6C05, 6C07 y S93B1 corresponden a los diferentes aislamientos de BAFEs inoculados, RF= roca fosfórica, FC= Tratamiento de fertilización completa.

La figura 4-18 muestra que con respecto al peso seco de la raíz no se encontraron diferencias entre los dos tratamientos control: RF y FC, además, los tratamientos 1, 3 y 4 fueron estadísticamente similares al control sin inocular, y los tratamientos 2 y 5 fueron estadísticamente diferentes a este, mostrando una media por debajo del mismo.

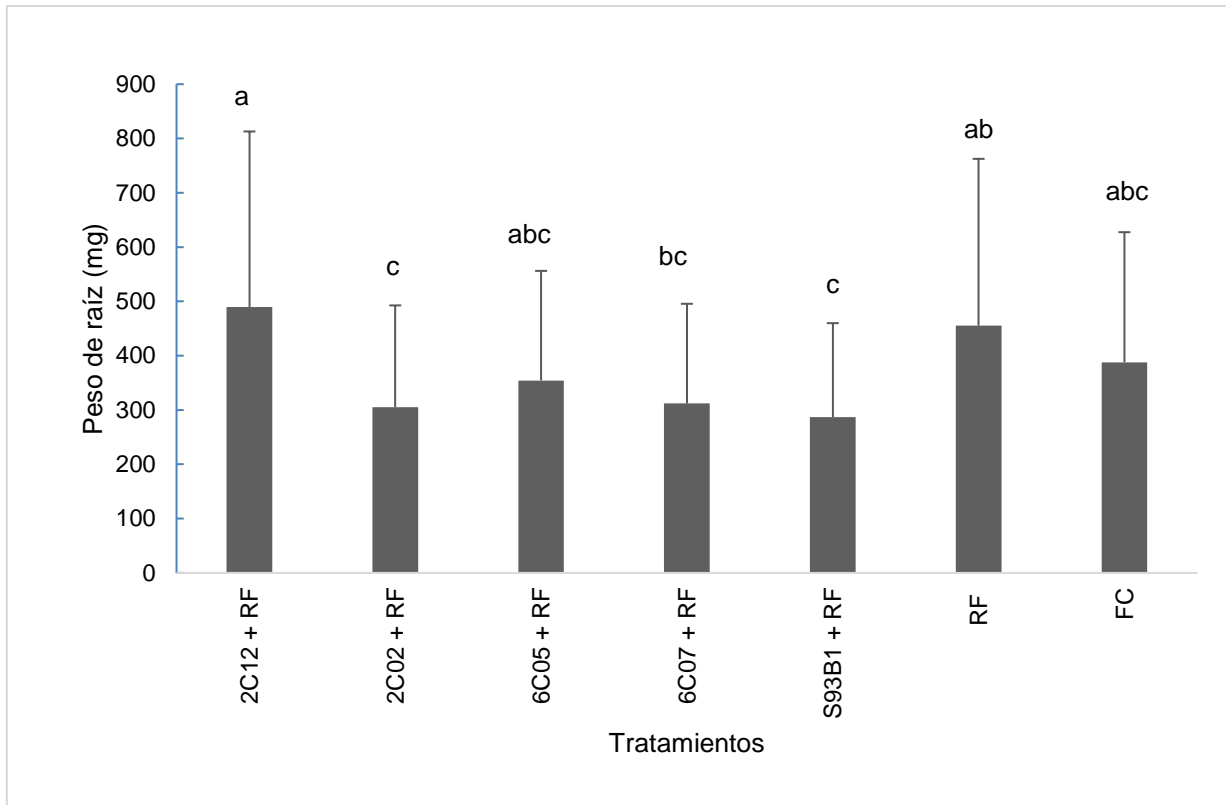


Figura 4-18. Peso seco de Raíz para cada tratamiento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). 2C12, 2C02, 6C05, 6C07 y S93B1 corresponden a los diferentes aislamientos de BAFEs inoculados, RF= roca fosfórica, FC= Tratamiento de fertilización completa.

Los resultados obtenidos, muestran que, bajo el diseño experimental desarrollado, dada la limitación que aporta a este tipo de ensayos el empleo de semilla vegetativa para la obtención de plántulas de caña, la única variable que permitió ver el efecto de alguno de los tratamientos de inoculación fue la altura del vástago. Cabe resaltar, que, al comparar los controles empleados, FC correspondiente al control con fertilización completa y RF correspondiente al control sin inocular con Roca fosfórica, estos se comportaron de acuerdo con lo esperado en las variables longitud de vástago, diámetro de tallo y peso seco de vástago, siendo mayores las medias del tratamiento con fertilización completa. No obstante, en cuanto al peso seco de raíz estos resultados no fueron consistentes con los anteriores y no se encontraron diferencias entre estos dos tratamientos control.

El aislamiento 6C07 asociado al clado de *B. megaterium* de acuerdo con el árbol de distancia genética construido, incrementó en un 11,77% la longitud del vástago con respecto al control no inoculado, este aislamiento, en la caracterización de actividades relacionadas con promoción de crecimiento vegetal mostró un nivel destacado de solubilización de fosfato tricálcico (102 mg $\text{PO}_4^- \cdot \text{L}$), mostró una liberación de P a partir de fosfato de aluminio de 1,43 mg $\text{PO}_4^- \cdot \text{L}$, tuvo capacidad de mineralizar ácido fítico y presentó una producción baja de compuestos indólicos (5,75 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Lo anterior, podría indicar que este aislamiento pudo favorecer el crecimiento de las plantas con algún mecanismo asociado al incremento en la disponibilidad de P, no obstante, no presentó diferencias con el control no inoculado en el resto de las variables evaluadas, lo cual limita las conclusiones que se puedan realizar con respecto a su efecto.

Shankaraiah *et al.*, (2000) evaluaron el efecto de la inoculación de microorganismos solubilizadores de P de los géneros *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus megaterium* y *Aspergillus awamori* en cultivos de caña de azúcar bajo diferentes esquemas de fertilización fosforada, los investigadores relacionan que la inoculación de la cepa de *B. megaterium* en un esquema de fertilización donde el 50% del P era aportado por super fosfato simple y el otro 50% era aportado por roca fosfórica, mejoró la producción de materia seca (44,37 $\text{ton} \cdot \text{ha}^{-1}$), con respecto al control (41.47 $\text{ton} \cdot \text{ha}^{-1}$). Estos autores, también relacionan un efecto en otras variables como la tasa de crecimiento del cultivo, que fue de 31,55 $\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$ para el tratamiento inoculado y de 28,75 $\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{dia}^{-1}$ para el control, en cuanto a la altura de las plantas, que fue la única variable que mostró diferencias en el presente trabajo, los investigadores relacionan que la inoculación de la bacteria incrementó esta medida, siendo la media de 2,84 m para plantas inoculadas y de 2,65 m para el tratamiento control, observando el mismo efecto en cultivos renovados y no renovados, sin embargo, no relacionan si hubo o no diferencias estadísticas.

En un estudio más reciente, Kruasuwan &Thamchaipenet (2016) encontraron que la inoculación de una cepa perteneciente al género *Bacillus* sp. incrementó la longitud de los brotes (42,66 cm) con respecto al control no inoculado (30,58 cm), sin embargo, en esta variable no encontraron diferencias estadísticas, como sí fueron encontradas en el peso seco y fresco de las plantas, siendo mayor en ambos casos para las plantas inoculadas con esta bacteria, además encontraron un mayor efecto de promoción de crecimiento,

cuando esta cepa era co-inoculada con otros dos aislamientos que también exhibieron actividades de promoción de crecimiento vegetal *in vitro*, pertenecientes a los géneros *Microbispora sp.* y *Enterobacter sp.*

En cuanto a la variable diámetro de tallo, no se encontró un efecto de los tratamientos inoculados, a excepción, de la cepa 2C02 que mostró una disminución en esta variable con respecto al control de fertilización completa y mostró una media menor con respecto a los demás tratamientos, sin embargo, en la tendencia observada, los tratamientos 2C12 y S93B1 mostraron un ligero aumento en esta variable, no obstante, y pese a que en la caracterización funcional estas dos cepas fueron diferentes, sobre todo en los niveles de producción de compuestos indólicos, ambos aislamientos se asociaron al clado de *Bacillus thuringiensis/B.cereus*, sin embargo, no se encontraron estudios que relacionen efectos de cepas de estas especies en plantas de caña de azúcar, posiblemente debido a que la mayoría de estudios que se han desarrollado de biofertilización en esta especie vegetal están orientados al uso de bacterias diazotróficas como *Azospirillum*, *Herbaspirillum* y *Gluconacetobacter* (Beneduzi *et al.*, 2013; Bashan *et al.*, 2004).

En cuanto a la variable de peso seco de vástago no se encontraron diferencias entre los tratamientos, a excepción de los tratamientos 2 y 6 que tuvieron una acumulación de biomasa seca por debajo del control con fertilización completa, lo cual se correspondió con los resultados obtenidos para diámetro de tallo. A pesar de que no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos 2 y 6, el tratamiento 2 mostró una media por debajo del resto de los tratamientos. Meng *et al.*, (2016) por ejemplo, reportan un efecto negativo de una cepa de *Bacillus velezensis* BAC03 en la germinación y crecimiento de 6 de 8 especies de plantas estudiadas, de hecho, relacionan un efecto dosis-respuesta, donde la mayor concentración de inóculo empleado (10^7 UFC.mL⁻¹) afectó en mayor proporción la germinación y el crecimiento de las plantas, aunque en dicho estudio, no se desarrollaron ensayos con caña de azúcar, esto permite relacionar que es posible encontrar efectos contrarios a los deseados al evaluar la promoción de crecimiento vegetal de BAFEs, los autores en este sentido, relacionan que el efecto negativo de BAC03 en el crecimiento temprano de las plantas, puede estar asociado con la liberación de compuestos orgánicos volátiles por la bacteria y refieren, que pese a que estos compuestos son una estrategia útil empleada por muchas rizobacterias para limitar el crecimiento de otros microorganismos, las plantas también pueden verse afectadas en su crecimiento. No

obstante, con el fin de corroborar parcialmente dicha hipótesis, y teniendo en cuenta, que la producción de compuestos indólicos de este aislamiento no es muy alto ($5,43 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), tendría que ser evaluada la producción de compuestos orgánicos volátiles del aislamiento 2C02, lo cual se encuentra fuera de los objetivos del presente estudio.

La variable peso seco de raíz mostró que las plantas con fertilización completa presentaron una media más baja en comparación con las plantas fertilizadas únicamente con roca fosfórica. Lo anterior podría relacionarse con el hecho de que en presencia de P soluble las plantas tienen un rápido acceso a este nutriente y no está implicado el desarrollo de diferentes estrategias para aumentar la exploración del suelo como el incremento en la masa radicular y la tasa de elongación de la raíz (Richardson et al., 2009). Ma et al (2001) también relacionan en un experimento realizado con *Arabidopsis thaliana* que la densidad radicular está regulada por la disponibilidad de P, para ese caso, los autores encontraron que la densidad radicular de las plantas incrementó en 5 veces a bajos niveles de P ($1 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-3}$) en comparación con altos niveles de este elemento ($1000 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-3}$).

De acuerdo con esto, podría hipotetizarse que los tratamientos que mostraron un menor peso seco de raíz, como el inoculado con la cepa S93B1, pudieron mejorar la disponibilidad de P para la planta a partir de la roca fosfórica, y por tanto, mejorar la tasa de difusión de este nutriente en el suelo llevando a que la raíz de estas plantas limitara su crecimiento, de hecho, cabe relacionar que el aislamiento S93B1 fue el que mostró la más alta tasa de liberación de P in vitro a partir de fosfato tricálcico ($177,79 \text{ mg PO}_4\cdot\text{L}$).

4.4.2 Evaluación de Invernadero con la variedad CC93-771

Tal como se mencionó en la sección 3.4 se realizó la evaluación de la inoculación de plantas de caña panelera de la variedad CC93-771 con 5 aislamientos de BAFEs. Transcurridos 60 días de crecimiento, se evaluaron como variables de respuesta la longitud del vástago, el diámetro del tallo, el peso seco del vástago y el peso seco de la raíz. Todas las variables cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas evaluados mediante el test de shapiro-wilk y el test de Bartlett, respectivamente, a excepción de la variable peso seco de raíz.

La figura 4-19 muestra que para la variable longitud de vástago, no se encontraron diferencias estadísticas entre los dos controles empleados en el experimento, no obstante, la media fue más alta para las plantas del tratamiento de fertilización completa (FC) en comparación con el tratamiento control sin inocular y con roca fosfórica (RF). Se observa, además, que el tratamiento 4 inoculado con el aislamiento 6C07 fue el único tratamiento estadísticamente diferente al control sin inocular y similar al control de fertilización completa, con una media por encima del resto de los tratamientos. Cabe mencionar, que de acuerdo con los resultados del ensayo de invernadero desarrollado con la variedad POJ 2878, este tratamiento también fue el único que mostró efecto positivo en la longitud de vástago de plantas de caña panelera.

La figura 4-20 muestra los resultados con respecto a la variable diámetro de tallo, se observa que los dos controles empleados en el experimento fueron estadísticamente diferentes, y se comportaron de acuerdo con lo esperado, siendo mayor la media para esta variable en el tratamiento de fertilización completa. Con respecto a los tratamientos de inoculación, se destacó el tratamiento inoculado con la cepa 6C07, de manera consistente con los resultados de la variable longitud de vástago, lo anterior resulta interesante, puesto que esto eventualmente podría traducirse en una disminución en las dosis de fertilización empleadas o en la utilización de una fuente de P más económica, como lo es la roca fosfórica. Los tratamientos con las cepas 2C12 y S93B1 también fueron estadísticamente diferentes y con una media por encima del control sin inocular.

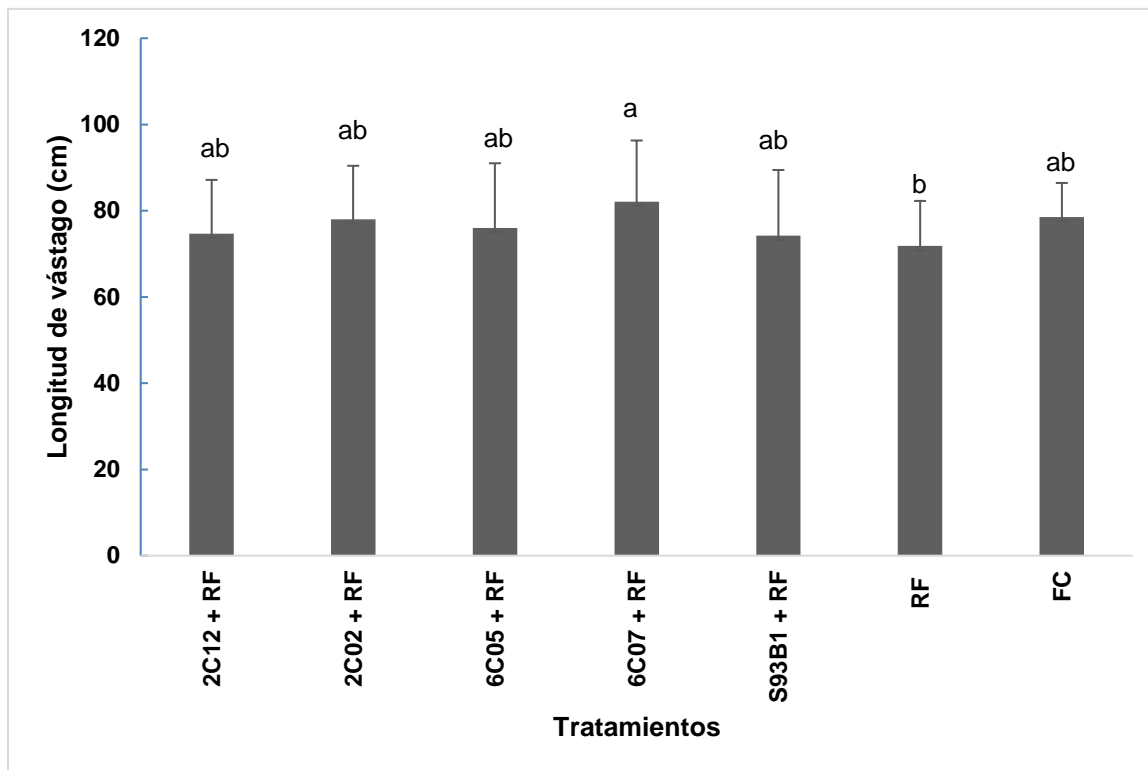


Figura 4-19. Longitud de vástago de plantas de caña panelera para cada tratamiento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($\alpha= 0,05$). 2C12, 2C02, 6C05, 6C07 y S93B1 corresponden a los diferentes aislamientos de BAFEs inoculados. RF= roca fosfórica. FC= Tratamiento de fertilización completa.

La figura 4-21 muestra los resultados para la variable peso seco de vástago, se observa que no existen diferencias estadísticas entre los dos controles de fertilización, sin embargo, la media fue mayor en el tratamiento de fertilización completa en comparación con el control de roca fosfórica sin inocular. Nuevamente, el tratamiento 4 con la cepa 6C07 fue el único estadísticamente diferente al control sin inocular.

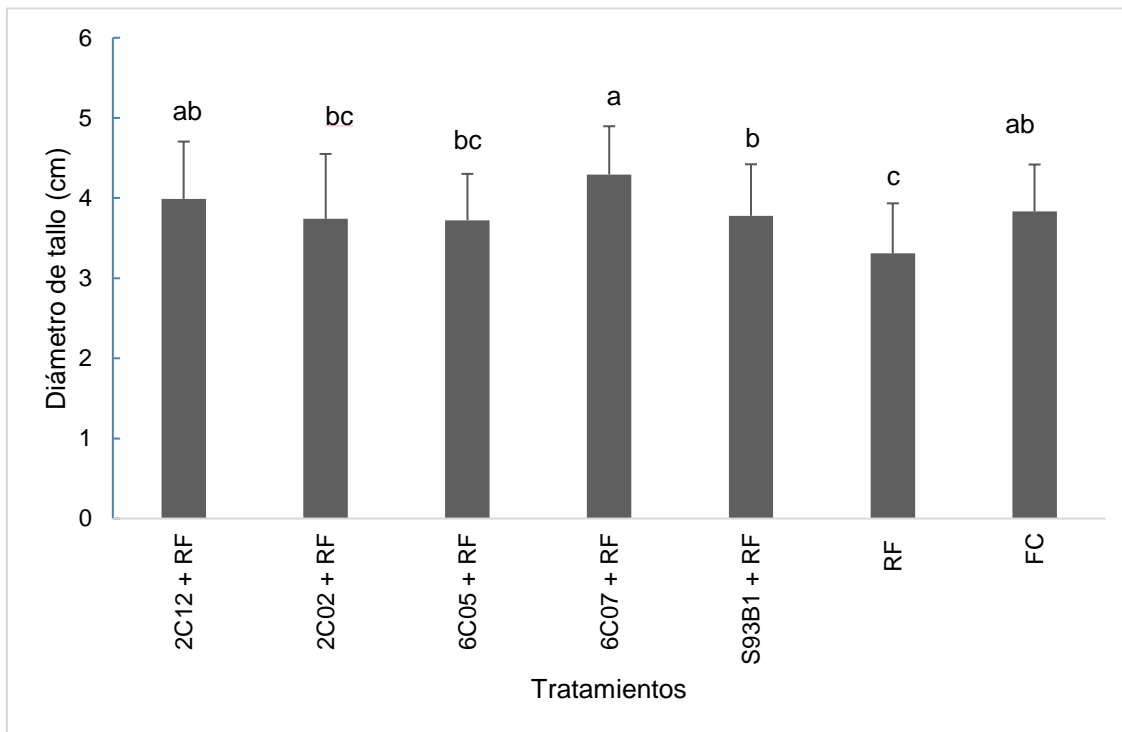


Figura 4-20. Diámetro de tallo para cada tratamiento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). 2C12, 2C02, 6C05, 6C07 y S93B1 corresponden a los diferentes aislamientos de BAFEs inoculados, RF= roca fosfórica, FC= Tratamiento de fertilización completa.

La figura 4-22 muestra los resultados para la variable peso seco de raíz, se puede observar que de manera similar a lo encontrado en el ensayo de invernadero desarrollado con la variedad POJ 2878, las plantas con fertilización completa presentaron una media más baja en comparación con las plantas fertilizadas únicamente con roca fosfórica, lo cual de cierta manera mantendría la hipótesis de que una menor disponibilidad de P en el suelo está influyendo en el desarrollo radicular de la planta, se observa además que los dos tratamientos que mostraron el peso seco de raíz más bajo fueron los que mostraron una mayor liberación de P *in vitro* a partir de fosfato tricálcico, no obstante, sería necesario desarrollar otros experimentos con el fin de evaluar dicha hipótesis y poder asociar la promoción de crecimiento vegetal, sobre todo de la cepa 6C07 con un aumento en la disponibilidad de fósforo para la planta.

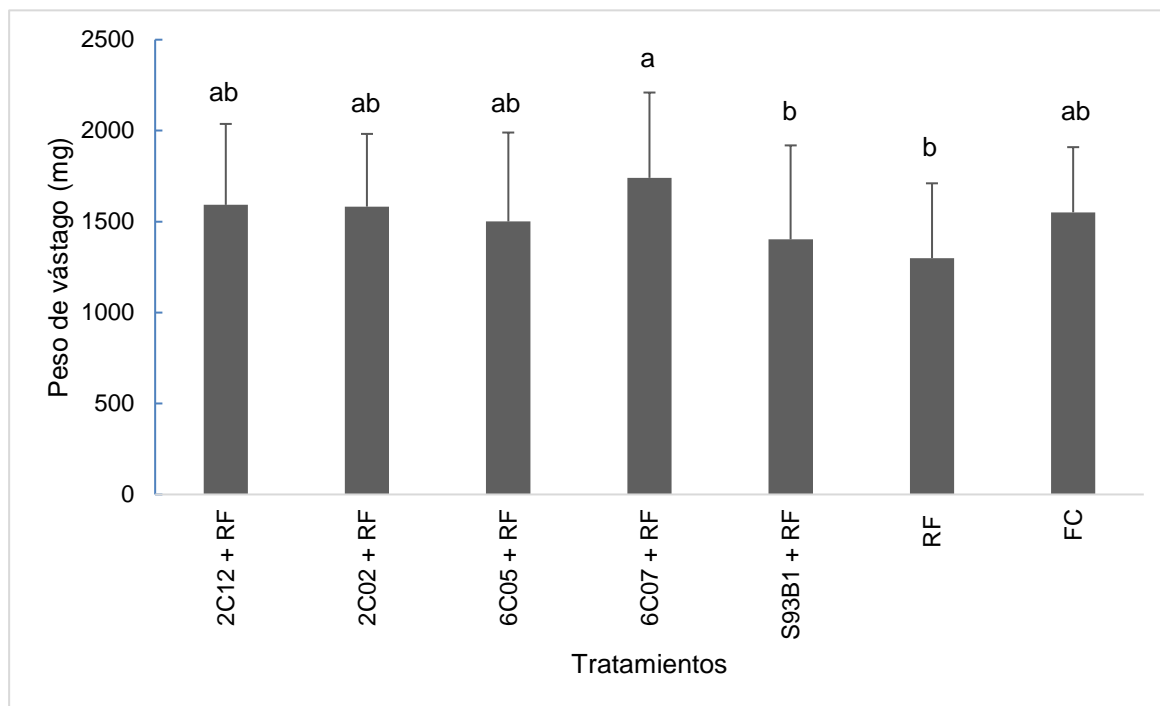


Figura 4-21. Peso seco de vástago para cada tratamiento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($\alpha = 0,05$). 2C12, 2C02, 6C05, 6C07 y S93B1 corresponden a los diferentes aislamientos de BAFEs inoculados, RF= roca fosfórica, FC= Tratamiento de fertilización completa.

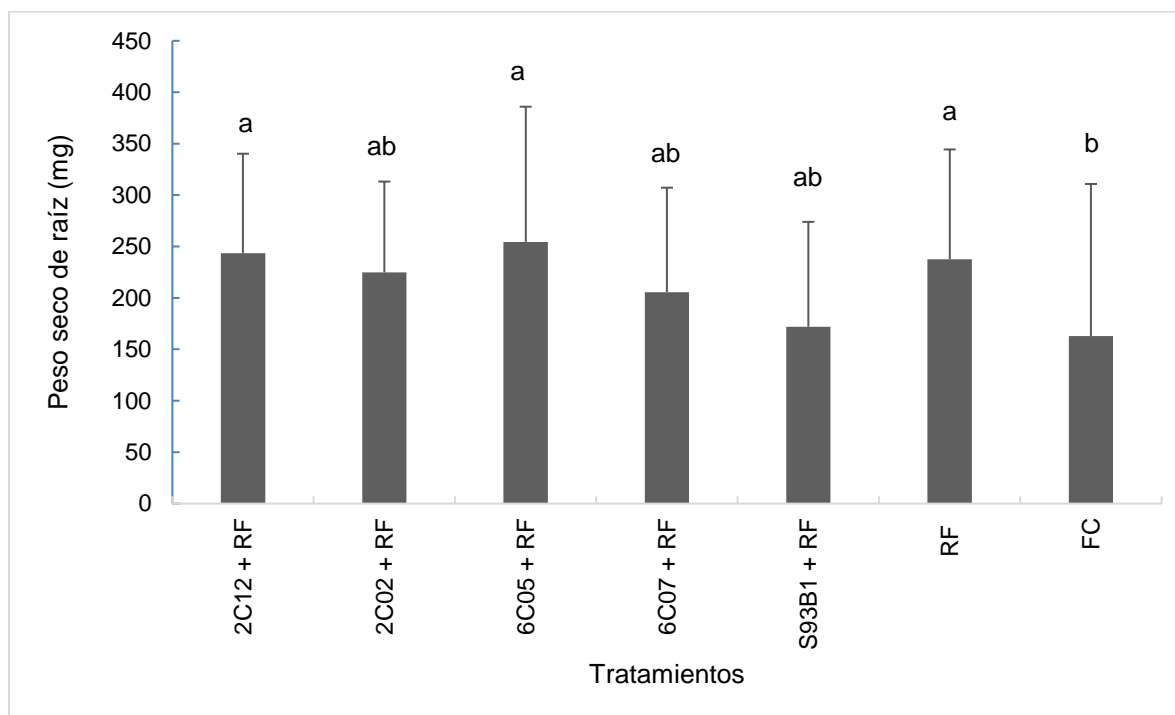


Figura 4-22. Peso seco de Raíz para cada tratamiento. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de Kruskal-Wallis ($\alpha= 0,05$). 2C12, 2C02, 6C05, 6C07 y S93B1 corresponden a los diferentes aislamientos de BAFEs inoculados, RF= roca fosfórica, FC= Tratamiento de fertilización completa.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se caracterizaron 52 aislamientos del grupo funcional de BAFEs en actividades relacionadas con promoción de crecimiento vegetal, provenientes de dos regiones productoras de caña panelera con manejos agronómicos contrastantes, encontrando, que en los aislamientos provenientes de Santander la producción de compuestos indólicos, la solubilización de fosfato tricálcico y la mineralización de ácido fítico son actividades que están más presentes, mientras que un mayor número de aislamientos con capacidad antagónica frente a *Rhizoctonia solani* y *Botrytis* sp provienen de cultivos establecidos en Cundinamarca.

Un escaso número de aislamientos de BAFEs fueron capaces de solubilizar fosfato de aluminio, lo cual indica que esta actividad no es común dentro del grupo de bacterias estudiada y que hay mecanismos diferenciales para poder hacer uso de las dos fuentes de P inorgánico evaluados, lo cual también puede estar relacionado con la baja disponibilidad de Al presente en las muestras de suelos de las fincas analizadas.

Las actividades ACC deaminasa y nitrogenasa fueron evaluadas, sin embargo, no fueron comunes en el grupo de BAFEs estudiadas, encontrándose solo tres aislamientos con presuntiva actividad ACC deaminasa y cuatro aislamientos con una actividad de reducción de acetileno muy baja en comparación con lo reportado en otros trabajos.

La identificación molecular de los aislamientos de BAFEs mostraron que la mayoría de ellos están relacionados con el clado de *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* y *B. megaterium*, sin embargo, se reporta también la ocurrencia de aislamientos relacionados con *Bacillus macroides*, provenientes en su mayoría de las fincas de la región de Santander.

Los ensayos de invernadero desarrollados mostraron un efecto consistente del aislamiento 6C07 en la longitud del vástago de la variedad POJ 2878, y en la longitud y peso de vástago, así como diámetro de tallo, en la variedad CC93-771, lo cual permitiría seleccionar este aislamiento como potencial promotor de crecimiento vegetal en plantas de caña panelera, además, esta cepa mostró capacidad de solubilización de fosfato tricálcico, fosfato de aluminio y mineralización de ácido fítico, lo cual podría dar un indicio de un mecanismo asociado al aumento en la disponibilidad de P para las plantas.

5.2 Recomendaciones

Confirmar la actividad ACC deaminasa de los aislamientos que mostraron indicios de esta actividad bajo la metodología desarrollada mediante la cuantificación del producto de la enzima, α -cetobutirato y amplificar el gen *acdS* empleando primers específicos.

Confirmar la actividad de reducción de acetileno de los aislamientos que mostraron producción de etileno, mediante el uso de técnicas más específicas como el N radiomarcado.

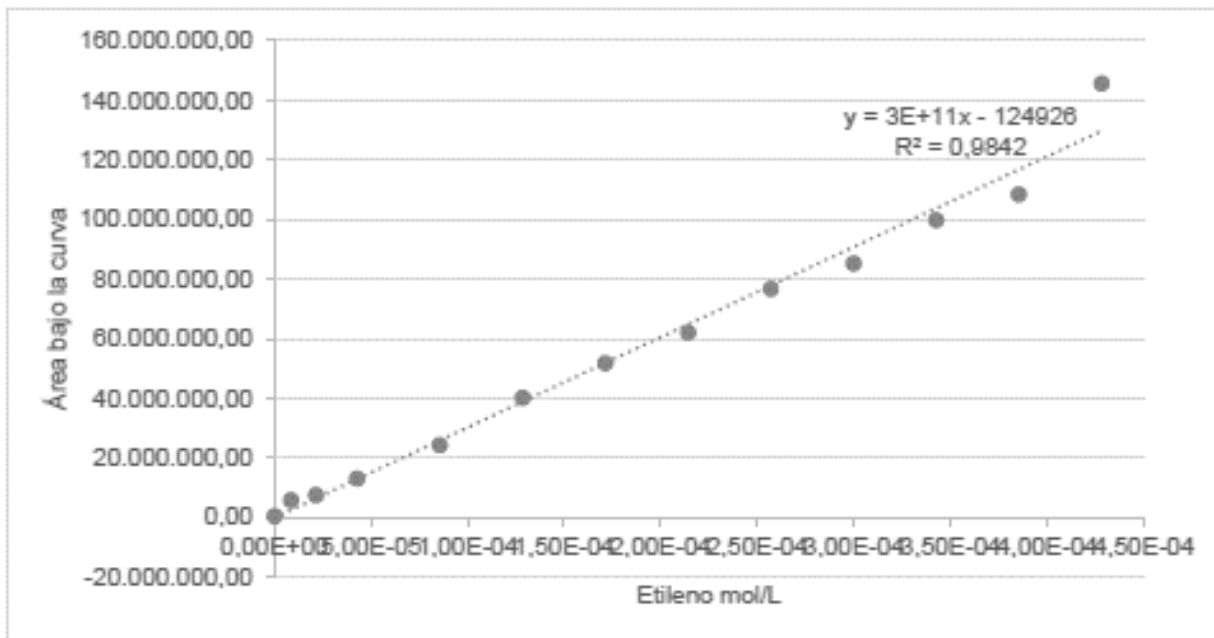
Realizar la amplificación de genes asociados a la actividad nitrogenasa como *nifH* y *nifDK* empleando primers específicos.

Confirmar la identidad de los aislamientos a nivel de especie empleando otros marcadores filogenéticos como *gyrA* y *gyrB* o una tipificación multilocus de secuencias (MLST).

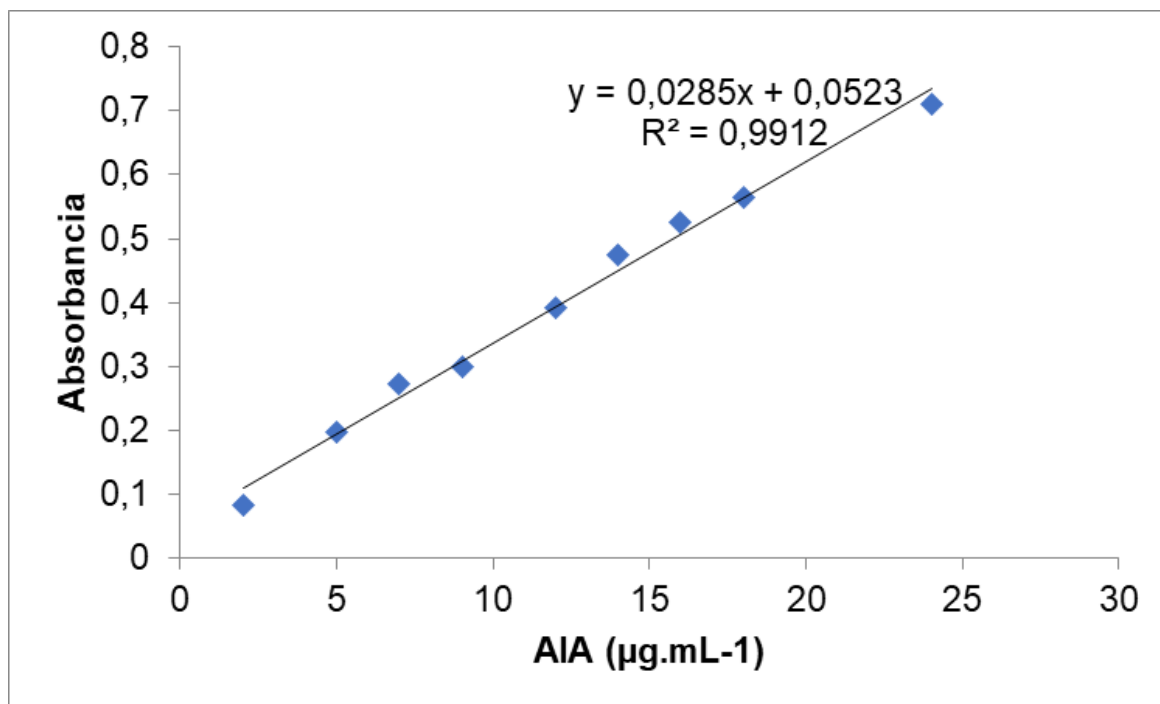
Desarrollar una repetición en el tiempo del ensayo de invernadero buscando estrategias para disminuir la variabilidad de la germinación de las semillas vegetativas de caña panelera y, por tanto, del tamaño de las plantas con el que se inicien los ensayos, esto, con el fin de poder observar con más claridad el efecto de la inoculación de microorganismos.

Desarrollar ensayos a nivel de campo con el aislamiento 6C07 con el fin de tener una evidencia más clara del efecto positivo que podría tener esta cepa en el crecimiento de plantas de caña panelera, así como evaluar posibles mecanismos que podrían estar asociados a su eventual actividad.

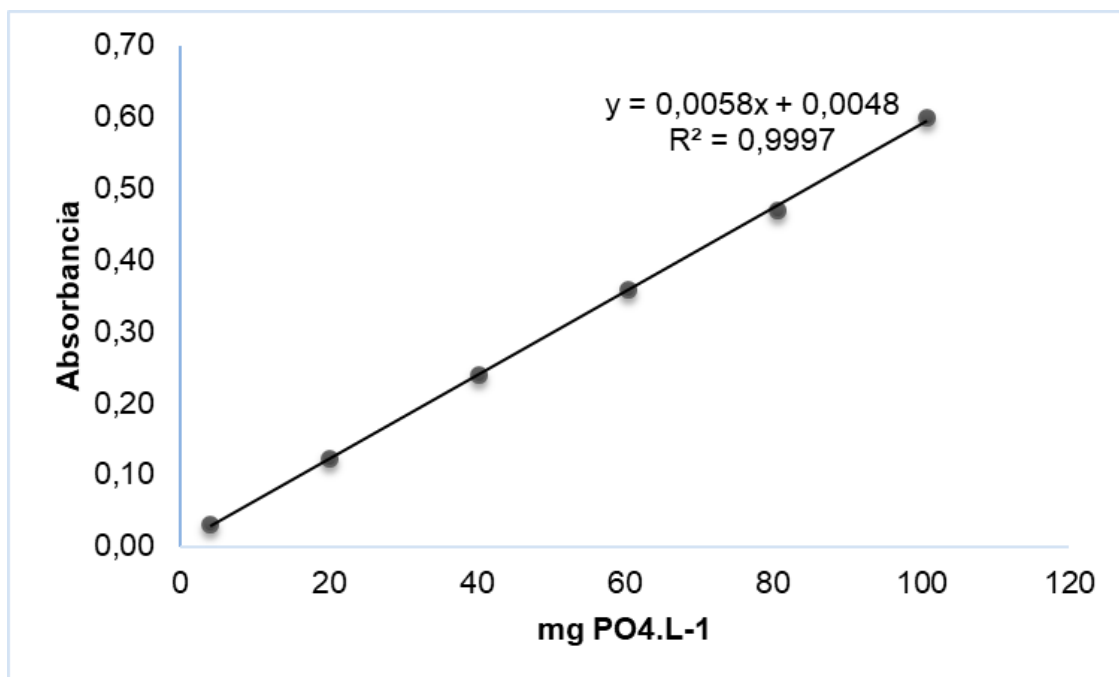
ANEXO 1: Curvas de calibración



Anexo 1a. Curva de calibración de etileno.



Anexo 1b. Curva de calibración de ácido indolacético.



Anexo 1c. Curva de calibración de fosatos.

Anexo 2. Análisis del suelo empleado en los ensayos de Invernadero

pH	CE dS/m	CO	N	Ca	K	Mg	Na	AI	CICE	CIC
		%		meq / 100g						
5,0	ns	15,4	0,72	2,76	0,38	1,54	0,16	0,98	5,83	ns

ns: no solicitado

P	S	Cu	Fe	Mn	Zn	B	Ar	L	A	Textura
mg / kg							%			
12,5	ns	0,09	31,2	0,46	0,21	0,16	8	23	69	FA

Los resultados corresponden únicamente a las muestras suministradas por el usuario y analizadas en el laboratorio

PARÁMETRO

pH

CE: Conductividad eléctrica

CO: Carbono orgánico oxidable

N: Nitrógeno total

Ca, K, Mg, Na: Bases intercambiables

CIC: Capacidad de intercambio catiónico

CICE: CIC Efectiva

AI: Acidez intercambiable

P: Fósforo disponible

S: Azufre disponible

Cu, Fe, Mn, Zn: Microelementos

B: Boro

Arcilla (**Ar**), limo (**L**), arena (**A**)

Textura

MÉTODOS DE ANÁLISIS

Suspensión suelo:agua (relación peso:volúmen 1:1)

Extracto de la pasta de saturación

Walkley-Black

Estimado a partir del CO (factor empleado 0,0862)

Extracción con NH₄ -Acetato 1M pH 7

Desplazamiento del NH₄ intercambiado con NaCl

Estimado por suma de bases y acidez intercambiables

Extracción con KCl 1M

Bray II

Extracción con fosfato monocálcico

Extracción con DTPA

Extracción con fosfato monocálcico

Bouyoucos, dispersión con Na-Hexametafosfato

Triángulo de clasificación textural USDA

VALORACIÓN

Potenciométrica

Conductimétrica

Colorimétrica

Absorción Atómica

Volumétrica

Volumétrica

Colorimétrica

Turbidimétrica

Absorción Atómica

Colorimétrica

Densimétrica

Bibliografía

- Ahemad, M & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 26, 1-20.
- Ait-kaki, A., & Kacem-chaouche, N. (2014). In Vitro and In Vivo Characterization of Plant Growth Promoting Bacillus Strains Isolated from Extreme Environments of Eastern Algeria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1735–1746.
- Akhtar, M & Siddiqui, Z.(2010) Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Biocontrol of Plant Diseases and Sustainable Agriculture. In D.K. Maheshwari (ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Ali, B., Sabri, A., Ljung, K & Hasnain, S. (2009). Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated Bacillus spp . and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L .). *World Journal of microbiology and biotechnology*. 519–526.
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, (8), 1–8.
- Antunes, J.E.L., Lyra, M., Ollero, F.J., Freitas, A et al., (2017). Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane, *Genetics and molecular Research*. 16(2), 1–10.
- Antwerpen TV, Rutherford RS & Vogel JL (2002) Assessment of sugarcane endophytic bacteria and rhizospheric Burkholderia species as antifungal agents. *Proc S Afr Sug Technol Assoc*, 76:301–304.
- Barriuso, J., Solano, B. R., Lucas, J. a, Lobo, A. P., García-villaraco, A., & Mañero, F. J. G. (2008). Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). In Ahmad, P. Pichtel, J and Hayat, S(Eds). *Plant-Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*. (pp 1-13). Microbial Ecology. Weinheim: Wiley.
- Barnawal, D., Maji, D., Bharti, N., Chanotiya, C. S., & Kalra, A. (2013). ACC Deaminase-Containing *Bacillus subtilis* Reduces Stress Ethylene-Induced Damage and Improves Mycorrhizal Colonization and Rhizobial Nodulation in *Trigonella foenum-graecum* Under Drought Stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(4), 809–822.
- Banik, S & Dey, BK. (1983) Phosphate-solubilizing potentiality of the microorganisms capable of utilizing aluminium phosphate as a sole phosphate source. *Zentralblatt Fur Mikrobiologie*. 138(1):17-23.
- Bashan, Y., Kamnev, A. A., & de-Bashan, L. E. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: A proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils*, 49(4), 465–479.

- Bashan, Y., Holguin, G., & De-Bashan, L. E. (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50(8), 521–577.
- Bautista, G., Mendoza, H., & Uribe, D. (2007). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in *Solanum phureja* plants using native *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Biológica Colombiana*, 12, 19-32.
- Beneduzi, A & Passaglia, L (2011). Genetic and Phenotypic Diversity of Plant Growth promoting Bacilli in: *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth responses*. Ed by: D.K. Maheshwari. Springer.
- Beneduzi, A., Peres, D., Vargas, L. K., Bodanese-Zanettini, M. H., & Passaglia, L. M. P. (2008). Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology*, 39(3), 311–320.
- Beneduzi, A., Moreira, F., Costa, P. B., Vargas, L. K., Lisboa, B. B., Favreto, R., ... Passaglia, L. M. P. (2013). Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*, 63, 94–104.
- Backhouse, D., & Stewart, A. (1989). Short Communication: Interactions between *Bacillus* species and *Sclerotia* of *Sclerotium cepivorum*. *Soil Biology and Biochemistry*. 21(1), 173–176.
- Balaraju, S. L. S. L. K., & Park, J. P. K. (2014). Growth promotion and induced disease suppression of four vegetable crops by a selected plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus subtilis* 21-1 under two different soil conditions, *Acta Physiologiae Plantarum*, 1353–1362.
- Bonnett, G. (2014). Developmental Stages (Phenology). In P. Moore & F. Botha (Eds.), *Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology* (p.48). New Dehli: Wiley.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1327–1350.
- Cassan F, Maiale S, Masciarelli O, Vidal A, Luna V, Ruiz O (2009) Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. *Eur J Soil Biol* 45:12–19
- Chávez-Ambriz, L. A., Hernández-Morales, A., Cabrera-Luna, J. A., Luna-Martínez, L., & Pacheco-Aguilar, J. R. (2016). Aislados de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y la floración en *Mammillaria* spp. (Cactaceae). *Revista Argentina de Microbiología*, 48(4), 333–341.

- Cheavegatti-Gianotto, A., Marília, H., Abreu, C. De, Arruda, P., Ciero, L., Ferro, J. A., ... Romano, E. (2011). Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil, 62–89.
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34(1), 33–41.
- Cheng, Z., Park, E., & Glick, B. R. (2007). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(7), 912–918.
- Chinnadurai C, Balachandar D, Sundaram SP (2009) Characterization of 1-aminocyclopropane- 1-carboxylate deaminase producing methylbacteria from phyllosphere of rice and their role in ethylene regulation. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1403–1411
- Cohan, F. M., Perry, E. B., & Mu, O. F. (2007). A Systematics for Discovering Review the Fundamental Units of Bacterial Diversity, *Current Biology*. 373–386.
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., ... Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42, D633–D642.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barka EA (2005) Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future prospects. *Appl Environ Microbiol* 71:4951–4959
- Connor, N., Sikorski, J., Rooney, A. P., Kopac, S., Koeppel, A. F., Burger, A., ... Cohan, F. M. (2010). Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1349–1358.
- Coorevits, A., Dinsdale, A. E., Heyrman, J., Schumann, P., van Landschoot, A., Logan, N. A., & de Vos, P. (2012). *Lysinibacillus macroides* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(5), 1121–1127.
- Da Costa, P. B., Beneduzi, A., de Souza, R., Schoenfeld, R., Vargas, L. K., & Passaglia, L. M. P. (2013). The effects of different fertilization conditions on bacterial plant growth promoting traits: Guidelines for directed bacterial prospection and testing. *Plant and Soil*, 368(1-2), 267–280.
- Dardanelli MS, Manyani H, Gonzalez–Barroso S, Rodriguez–Carvajal MA, Gil–serrano AM, Espuny MR, López–Baena FJ, Bellogin RA, Megías M, Ollero FJ (2010) Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. *Plant Soil* 328:483–493

- Das, S. N., Dutta, S., Kondreddy, A., Chilukoti, N., Pullabhotla, S. V. S. R. N., Vadlamudi, S., & Podile, A. R. (2010). Plant Growth-Promoting Chitinolytic *Paenibacillus elgii* Responds Positively to Tobacco Root Exudates. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29(4), 409–418.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE) 2017. Particularidades del cultivo de la caña panelera (*Saccharum officinarum* L) en Colombia. Boletín Mensual. Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). 2011. Resultados Encuesta Nacional Agropecuaria. Bogotá. 181 p.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D y Glick, B. (2014). Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 106: 85-125.
- Durán, J. R., Insuasty, O., & Viveros, C. A. (2014). Comportamiento agroindustrial de diez variedades de caña de azúcar para producción de panela en Santander, Colombia. *Corpoica Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 15, 183–195.
- Farizan, N. (2006). Production of Bioactive Compounds by *Bacillus subtilis* against *Sclerotium rolfsii* *Malaysian Journal of Microbiology*, 2(2), 19–23.
- Fedepanela (2009). ABC de la panela. Cartilla divulgativa, Bogotá: Fedepanela. http://www.fedepanela.org.co/publicaciones/cartillas/abc_panela.pdf.
- Fedepanela (2012b). Precios promedios semanales de la panela al productor año 2012. Disponible en: http://www.fedepanela.org.co/index.php?option=com_content&view=section&layout=blog&id=9&Itemid=58.
- Fedepanela (2009). Manejo agronómico de la caña panelera con énfasis en el control biológico. Bogotá. 7p.
- Fedepanela. (2012a). Informe técnico del subsector panelero de Colombia. Anexos 1 y 2. Bogotá, Colombia: Fedepanela.
- Fernandes, G. de C., Trarbach, L. J., De Campos, S. B., Beneduzi, A., & Passaglia, L. M. P. (2014). Alternative nitrogenase and pseudogenes: Unique features of the *Paenibacillus riograndensis* nitrogen fixation system. *Research in Microbiology*, 165(7), 571–580.
- Finagro. (2014). Perspectiva del sector agropecuario Colombiano. Bogotá: Finagro.
- Figueiredo, M., Bonifacio, A., Rodríguez, A & Araujo, F. (2016). Plant Growth-promoting Rhizobacteria: Key mechanisms of Action. In D.K. Choudhary, A. Varma (eds.), *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants*. (pp 23–37). Singapur: Springer.

- Food and Agricultural Organization of the United Nations (2009). FAO. <http://faostat.fao.org/default.aspx>
- Garbeva, P., Van Veen, J. A., & Van Elsas, J. D. (2004). Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiology Ecology*, 47(1), 51–64.
- Gardener BBM (2004) Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. Symposium: the nature and application of biocontrol microbes: *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1252–1258.
- Glick BR, Penrose DM, Li J (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J Theor Biol* 190:63–68
- Glick, B. R., Karaturovic, D. M., & Newell, P. C. (1995). A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting pseudomonas. *Can. J. Microbiol*, 41, 533–536.
- Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A Critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Gontia-Mishra, I., Sapre, S., Kachare, S., & Tiwari, S. (2017). Molecular diversity of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase producing PGPR from wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere. *Plant and Soil*, 414(1-2), 213–227.
- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Bose, P., Kumar, L., Ramadoss, D & Annapurna, K (2011). ACC Deaminase Containing PGPR for Potential Exploitation in Agriculture. In D.K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in Agrobiology: Plant Nutrient Management* Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Govindasamy, V., Senthilkumar, M., Mageshwaran, V., & Annapurna, K. (2009). Detection and Characterization of ACC Deaminase in Plant Growth Promoting Rhizobacteria. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18(1), 71–76.
- Govindasamy, V., Raina, S. K., George, P., Kumar, M., Rane, J., Minhas, P. S., & Vittal, K. P. R. (2017). Functional and phylogenetic diversity of cultivable rhizobacterial endophytes of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(7), 925–943.
- Govindasamy, M. Senthilkumar, V. Mageshwaran, U. Kumar, P. Bose, V. Sharma, & K. Annapurna (2010) *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: Potential PGPR for sustainable Agriculture. In: *Plant Growth and Health Promoting Bacteria* Ed by: D.K. Maheshwari.
- Guisande et al. (2014). RWizard Software. <http://www.ipez.es/RWizard>. University of Vigo. Spain ideam 2010

- Habib, S. H., Kausar, H., & Saud, H. M. (2016). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Salinity Stress Tolerance in Okra through ROS-Scavenging Enzymes. *BioMed Research International*.
- Haque, M. A., Yun, H. D., & Cho, K. M. (2016). Diversity of indigenous endophytic bacteria associated with the roots of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.) cultivars and their antagonism towards pathogens. *Journal of Microbiology*, *54*(5), 353–363.
- Halsall, D. M., & Gibson, A. H. (1989). Nitrogenase activity of a range of diazotrophic bacteria on straw, straw breakdown products and related compounds. *Soil Biology and Biochemistry*, *21*(2), 291–298.
- Hameeda, B, Rupela, OP & Reddy, G. (2006) Antagonistic activity of bacteria inhabiting composts against soil-borne plant pathogenic fungi. *Indian Journal of microbiology*, *46* (4), 389-396.
- Harapiak JT, Malhi SS, Gill KS, Flore N (2004) Macronutrients in soil and bromegrass after long-term N fertilization. *J Range Manage* *57*:219–225
- Hassan MN, Afghan S, Hafeez FY (2010) Suppression of red rot caused by *Colletotrichum falcatum* on sugarcane plants using plant growth- promoting rhizobacteria. *BioControl* *55*:531–542.
- Hayes JE, Simpson RJ, Richardson AE (2000) The growth and phosphorus utilisation of plants in sterile media when supplied with inositol hexaphosphate, glucose 1-phosphate or inorganic phosphate. *Plant Soil* *220*:165–174
- Honma M, Shimomura T (1978) Metabolism of 1-aminocyclopropane- 1-carboxylic acid. *Agric Biol Chem* *42*: 1825–1831
- Hu J, Lin X, Wang J, Chu H, Yin R, Zhang J (2009) Population size and specific potential of P-mineralizing and solubilizing bacteria under long-term P-deficiency fertilization in a sandy loam soil. *Pedobiologia* *53*(1):49–58.
- Idriss, E. E., Makarewicz, O., Farouk, A., Rosner, K., Greiner, R., Bochow, H., ... Borriss, R. (2002). Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*, *148*(7), 2097–2109.
- Insuasty OI, Manrique R, Palacios O. (2003). Catálogo de variedades de caña para la producción de panela en la hoya del río Suárez. Barbosa: Corpoica.
- Jacobson, J. J. Pasternak, and B. R. Glick, (1994). "Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1- carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2," *Canadian Journal of Microbiology*, *40*(12) pp. 1019–1025.

- Jordán, M. y Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. *Fisiología Vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile 15: 1 – 28.
- Jorquera, M. A., Hernández, M. T., Rengel, Z., Marschner, P., & De La Luz Mora, M. (2008). Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of Soils*, 44(8), 1025–1034.
- Kadyan, S., Panghal, M., Kumar, S., Singh, K., & Yadav, J. P. (2013). Assessment of functional and genetic diversity of aerobic endospore forming Bacilli from rhizospheric soil of *Phyllanthus amarus* L. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(9), 1597–1610.
- Kandil, M. M. (2017). Isolation and Characterization of Highly Effective Phytate-Mineralizing *Klebsiella pneumonia* Strain MK1C Adapted to Arid and Semiarid Conditions from Calcareous Soil PySI = HalZ d / Cln d.
- Kamilova, F., Kravchenko, L. V., Shaposhnikov, A. I., Azarova, T., Makarova, N., and Lugtenberg, B. (2006). Organic acids, sugars and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9, 250–256.
- Kefi, A., Ben, I., Ines, S., & Christophe, K. (2015). Characterization of endophytic *Bacillus* strains from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) displaying antifungal activity against *Botrytis cinerea* Pers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 1967–1976.
- Khan, M., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M. y Wani, P. (2010). Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science* 56 (1): 73 – 98.
- Kim, Y. H., Kim, I. S., Moon, E. Y., Park, J. S., Kim, S. J., Lim, J. H., ... Lee, E. J. (2011). High Abundance and Role of Antifungal Bacteria in Compost-Treated Soils in a Wildfire Area. *Microbial Ecology*, 62(3), 725–737.
- Kloepper JW, Schroth MN (1978) Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: *Proceedings of th 4th international conference on plant pathogenic bacteria*. Angers, pp 879–882
- Koepfel, A., Perry, E. B., Sikorski, J., Krizanc, D., Warner, A., Ward, D. M., ... Cohan, F. M. (2008). Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2504–9.

- Kravchenko, L. V., Azarova, T. S., Leonova-Erko, E. I., Shaposhnikov, A. I., Makarova, N. M., & Tikhonovich, I. A. (2003). Root exudates of tomato plants and their effect on the growth and antifungal activity of *Pseudomonas* strains. *Microbiology*, *72*(1), 37–41.
- Kruasuwan, W., & Thamchaipenet, A. (2016). Diversity of Culturable Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes Associated with Sugarcane Roots and Their Effect of Growth by Co-Inoculation of Diazotrophs and Actinomycetes. *Journal of Plant Growth Regulation*.
- Kumar, A., Prakash, A & Johri, B.N (2011) *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In D.K. Maheshwari (ed.). *Bacteria in agrobiology: Crop Ecosystems*, ed: Springer p.p 37
- Kumar, V., Singh, P., Jorquera, M. A., Sangwan, P., Kumar, P., Verma, A. K., & Agrawal, S. (2013). Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *29*(8), 1361–1369.
- Kumar, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, *167*(8), 493–499.
- Labuschagne, N., Pretorius, T & Idris, A.H (2010). Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biocontrol Agents Against Soil-Borne Plant Diseases. In D.K. Maheshwari (ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterialsystematic*. Wiley, Chichester, pp 115–175
- LIN, D.I.; FAN, X.H.; FENG, H.; ZHAO, H.T.; LUO J., F. Ammonia volatilization and nitrogen utilization efficiency in response to urea application in rice fields of the Taihu lake region, China. *Pedosphere* *17*(5):639–645. 2007.
- Lin, W., Wu, L., Lin, S., Zhang, A., Zhou, M., Lin, R., ... Lin, R. (2013). Metaproteomic analysis of ratoon sugarcane rhizospheric soil. *BMC Microbiology*, *13*(1), 135.
- Logan, N & Halket, G. (2011). Developments in the Taxonomy of Aerobic Endospore-forming Bacteria. In. N.A. Logan and P. De Vos (eds.), *Endospore-forming Soil Bacteria*, Soil Biology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, J-S., Lee, K-C & Hari, K (2011). *Bacillus rhizospaerae* sp. nov., an novel diazotropic bacterium isolated from sugarcane rhizosphere soil. *Antonie Van Leeuwenhoek* *100*: 437- 444.
- Martinez-Viveros O, Jorquera MA, Crowley DE, Gajardo G, Mora ML (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J Soil Sci Plant Nutr* *10*:293–319

- Martínez, O. A., Jorquera, M. A., Crowley, D. E., & de la Mora, M. L. (2011). Influence of nitrogen fertilization on pasture culturable rhizobacteria occurrence and the role of environmental factors on their potential PGPR activities. *Biology and Fertility of Soils*, 47(8), 875–885.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. MADR (2017). Anuario estadístico del sector agropecuario: Resultados Evaluaciones Agropecuarias Municipales. Bogotá, D.C-Colombia.
- MADR (2016a) Evaluaciones agropecuarias nacionales-EVA-Oficina de planeación y prospectiva. Disponible en: <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas>.
- MADR (2016b) Exportaciones del sector agropecuario. Valor y volumen, por producto, por cadena, por partida y país de destino. Disponible en: <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas>
- Ma, Z., Bielenberg, D. G., Brown, K. M., & Lynch, J. P. (2001). Regulation of root hair density by phosphorous availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell, and Environment*, 24., 459–467.
- Medina, O., Milko, J., David, C., María, L. M. (2011) Influence of nitrogen fertilization on pasture culturable rhizobacteria occurrence and the role of environmental factors on their potential PGPR activities. *Biol Fert Soils* 47:875–885
- Merck. (2016). Spectroquant Phosphate Test. Retrieved from https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Test-Fosfatos,MDA_CHEM-114848?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.co%2F#documentation
- Melo, J., Carolino, M., Carvalho, L., Correia, P., Tenreiro, R., Chaves, S., ... Ramos, A. C. (2016). Crop management as a driving force of plant growth promoting rhizobacteria physiology. *Springer Plus*, 5(1), 1574.
- Meng, Q., Jiang, H., & Hao, J. J. (2016). Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. *Biological Control*, 98, 18–26.
- Minh, H & Ngoc, C. (2012). Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria Isolated From the sugarcane cultivated on acrisols of Tay Ninh, province Vietnam (2017). *International Journal of Innovations in Engineering and Technology*, 3, 1562–1575.
- Miller HJ, Henken G, Van Veen JA (1989) Variation and composition of bacterial population in the rhizosphere of maize, wheat and grass cultivars. *Can J Microbiol* 35:656–660
- Mollica, ML, Van Elsas, JD & Penido, GC. (1985) An improved method to detect acetylene-reducing activity in *Bacillus* strains. *Journal of microbiological methods* 3:147-157

- Moore, P., Paterson, A & Tew, T. (2014). Sugarcane: The crop, the plant, and domestication. In Moore, P and Botha, F (Eds). *Sugarcane: Physiology, Biochemistry & functional biology* (pp. 2-3). New Dehli:Wiley.
- Mondal, K & Verma, J (2002). Biological control of cotton diseases. In Gnanamanickam (Ed), *Biological control of crop diseases*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Muangthong, A., Youpensuk, S., & Rerkasem, B. (2015). Isolation and Characterisation of Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria in Sugarcane. *Tropical Life Sciences Research*, 26(1), 41–51.
- Murcia, L., & Ramírez, J. (2015). Producción y manejo de semilla de caña panelera. CORPOICA. Bogotá
- Musarrat, J & Khan, Md (2014). Factors affecting Phosphate-solubilizing activity of microbes: Current status. In M.S. Khan et al. (eds.), *Phosphate Solubilizing Microorganisms*. Springer International Publishing Switzerland.
- Nadeem, S., Ahmad, M., Zahir, A & Ashraf, M (2012). Microbial ACC-Deaminase Biotechnology: Perspectives and Applications in Stress Agriculture. In D.K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management* Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Nadeem, SJ; Naveed, M; Ahmad M y Ahmad Z (2015) Rhizosphere bacteria for crop production and improvement of stress tolerance: Mechanisms of action, applications and future prospects. In: *Plant microbes symbiosis: Applied facets*. Ed by. Arora, N. K. p.2 Springer India.
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening of phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 170:265–270
- Navarro-Noya, Y. E., Hernández-Mendoza, E., Morales-Jiménez, J., Jan-Roblero, J., Martínez-Romero, E., & Hernández-Rodríguez, C. (2012). Isolation and characterization of nitrogen fixing heterotrophic bacteria from the rhizosphere of pioneer plants growing on mine tailings. *Applied Soil Ecology*, 62, 52–60.
- Newton, W. (2007). Physiology, biochemistry and molecular biology of nitrogen fixation. In H. Bothe, S. Ferguson, & W. Newton (Eds.), *Biology of Nitrogen Cycle* (pp. 109–129). Elsevier B.V.
- Oliveira, C. A., Alves, V. M. C., Marriel, I. E., Gomes, E. A., Scotti, M. R., Carneiro, N. P., ... Sá, N. M. H. (2009). Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(9), 1782–1787.
- Orberá- Ratón, T. M., Yano, R., Gámez, O. R., Floh, E. I. S., de Díaz, M. J. S., & Barbosa, H. R. (2012). Isolation and characterisation of aerobic endospore forming Bacilli from

- sugarcane rhizosphere for the selection of strains with agriculture potentialities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1593–1603.
- Osorio, G. (2007). Buenas prácticas agrícolas -BPA- y buenas prácticas de manufactura -BPM- en la producción de caña y panela. Medellín: FAO.
- Ouyang, L., Pei, H., & Xu, Z. (2017). Low nitrogen stress stimulating the indole-3-acetic acid biosynthesis of *Serratia* sp. ZM is vital for the survival of the bacterium and its plant growth-promoting characteristic. *Archives of Microbiology*, 199(3), 425–432.
- Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., & Sa, T. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research*, 160, 127–133.
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3795–801.
- Penrose, D. M., & Glick, B. R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118(1), 10–15.
- Pérez E, Sulbarán M, Ball MM, Yarzabal LA (2007) Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. *Soil Biol Biochem* 39:2905–2914.
- Perez-García et al (2011). Biological control of Phytopathogenic fungi by Aerobic Endospore-Formers. In Logan & Vos (Eds), *Endospore-forming Soil bacteria*. Springer. New York.
- Pikovskaya RI (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology* 17:362–370
- R Core Team. (2012). R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <http://www.R-project.org/>.
- Rae, A., Martinelli, A., & Dornelas, M. (2014). Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology. In P. Moore & F. Botha (Eds.), *Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology* (p.30). New Dehli: Wiley.
- Reddy, P. P. (2014). *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Horticultural Crop Protection*. (p. 20) Springer:India
- Reddy, P. (2013). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR). In *Recent Advances in crop protection* (p132). Bangalore, Karnataka, India.

- Reis, V. M., Divan, V. L., Baldani, D., & Baldani, J. I. (2015). Isolation, Identification and Biochemical Characterization of Azospirillum spp. and Other Nitrogen-Fixing Bacteria. In F. Cassan, Y. Okon, & C. Creus (Eds.), *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols* (pp. 3–26). New York: Springer International Publishing.
- Rodríguez G. (2014). La agroindustria panelera en cifras. Ficha Técnica. Bogotá: Corpoica.
- Rodríguez G, García H, Roa Z & Santacoloma P. (2004). Producción de panela como estrategia de diversificación en la generación de ingresos en áreas rurales de América Latina. Servicio de Gestión, Comercialización y Finanzas Agrícolas (AGSF) FAO. Roma.
- 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
- Richardson, A. E., Simpson, R., & George, T. S. (2009). Plant mechanisms to optimise access to soil phosphorus. *Crop & Pasture science*. 60, 124-143.
- Ryu CM, Hu CH, Locy RD, Kloepper JW (2005) Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in Arabidopsis thaliana. *Plant Soil* 268:285–292
- Sahoo, R. K., Ansari, M. W., Pradhan, M., Dangar, T. K., Mohanty, S., & Tuteja, N. (2014). Phenotypic and molecular characterization of native Azospirillum strains from rice fields to improve crop productivity. *Protoplasma*, 251(4), 943–953.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.
- Santos, F & Diola, V. (2015). Chapter 2: Physiology. In: Santos.,A. Borem & C.Caldas (Eds), *Sugarcane: agricultural production, bioenergy and ethanol*. (pp.27-29).USA: Elsevier.
- Santos, P. C. D. O. S., Igarashi, R. Y., Lee, H., Hoffman, B. M., Seefeldt, L. C., & Dean, D. R. (2005). Substrate Interactions with the Nitrogenase Active Site. *Accounts of Chemical Research*, 38(3), 208–214.
- Seldin, L., Van Elsas, J. D., & Penido, E. G. C. (1983). Bacillus nitrogen fixers from Brazilian soils. *Plant and Soil*, 70(2), 243–255.
- Sella, S. R. B. R., Vandenberghe, L. P. S., & Soccol, C. R. (2015). *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications – a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), 533–545.
- Shahid, M., Hameed, S., Imran, A., Ali, S. y van, J. (2012). Root colonization and growth promotion of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by phosphate solubilizing Enterobacter sp. Fs-11. *World J Microbiol Biotechnol* 28:2749–2758.

- Shankaraiah, C., Hunsigi, G., & Nagaraju, M. S. (2000). Effect of levels and sources of phosphorus and phosphate solubilizing microorganisms on growth, yield and quality of sugarcane. *Sugar Tech*, 2(1-2), 23–28.
- Sharma, I. P., Chandra, S., & Kumar, N. (2017). PGPR: Heart of Soil and Their Role in Soil Fertility In Meena, S, Mishra, P. Bisht, J & Pattanayak, A (Eds). Agriculturally Important microbes for sustainable Agriculture. 51–67.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587.
- Shokri D, Emtiazi G (2010) Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by Taguchi design. *Current Microbiology* 61:217–225
- Singh, B., & Satyanarayana, T. (2011). Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(2), 93–103.
- Singh B, Satyanarayana T (2010) Plant growth promotion by an extracellular HAP-phytase of a thermophilic mold *Sporotrichum thermophile*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160(5):1267–1276
- Solanki, M. K., Wang, Z., Wang, F. Y., Li, C. N., Lan, T. J., Singh, R. K., ... Li, Y. R. (2017). Intercropping in Sugarcane Cultivation Influenced the Soil Properties and Enhanced the Diversity of Vital Diazotrophic Bacteria. *Sugar Tech*, 19(2), 136–147.
- Somers E, Vanderleijden J, Srinivasan M (2004) Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit Rev Microbiol* 30:205–240
- Suman, A., Shrivastava, A. K., Gaur, A., Singh, P., Singh, J., & Yadav, R. L. (2008). Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. *Plant Growth Regulation*, 54(1), 1–11.
- Spaepen, S., & Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), 1–13.
- Stanier, R.Y, Ingraham , J.Wheelis, M & Painter, P. (1992) Eubacterias gram positivas: formadores unicelulares de endosporas. En: *Microbiología ed.reverté*. p.p 509
- Sundara, B., Natarajan, V., & Hari, K. (2002). Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research*, 77(1), 43–49.
- Tam, H. M., & Diep, C. N. (2015). Isolation and Identification of Rhizospheric Bacteria in Sugarcane (*Saccharum* spp. L.) Cultivated on Acrisols and Ferrasols of Dong Nai

- Province, the Southeast of Vietnam. *American Journal of Life Sciences*, 3(2), 109–118.
- Tarafdar JC, Gharu A (2006) Mobilization of organic and poorly soluble phosphates by *Chaetomium globosum*. *Applied Soil Ecology* 32 (3):273–283.
- Tarazona, G. (2011). Manejo fitosanitario del cultivo de la caña panelera. Instituto Colombiano Agropecuario. Boletín técnico. p 7. Bogotá
- Todorova, S., & Kozhuharova, L. (2010). Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1207–1216.
- Uribe, D. y Melgarejo, L. (2011). Ecología de microorganismos rizosféricos asociados a cultivos de arroz de Tolima y Meta. (p. 13). Bogotá, D.C: Universidad Nacional de Colombia.
- USDA. (2016). Gain Report: Colombia, Sugar Annual 2016.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.-L., Touraine, B., Moëgne-Loccoz, Y., Muller, D., ... Prigent-Combaret, C. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1–19.
- Velázquez E, Rojas M, Lorite MJ, Rivas R, Zurdo-Piñeiro JL, Heydrich M, Bedmar EJ (2008) Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchyma of the stem of healthy sugarcane plants. *J Basic Microbiol* 48:118–124.
- Vos P, Garrity G, Jones D, et al. (2009). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3: The Firmicutes. New York: Springer.
- Yuan, C. L., Mou, C. X., Wu, W. L., & Guo, Y. Bin. (2011). Effect of different fertilization treatments on indole-3-acetic acid producing bacteria in soil. *Journal of Soils and Sediments*, 11(2), 322–329.
- Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., et al. (2014). Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiology*. 169, 76–82.

