

Tesis de Maestría
PEDECIBA Biología
Área Microbiología

Caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.): bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su aporte a la fijación de nitrógeno

Lic. Bioquímica
Claudia Barlocco

Tutor: Dra Margarita Sicardi
Co-tutor: Dr. Federico Battistoni

Laboratorio de Microbiología del Suelo
Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales (IECA)
Facultad de Ciencias - Universidad de la República
Uruguay, Diciembre 2012

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a Margarita por compartir conmigo durante 6 años todos sus conocimientos de microbiología, agronomía y de la vida. Por la confianza que siempre me tiene, por toda su paciencia y por el apoyo constante.

A Ana, Silvia y Omar por aceptar ser mi tribunal, corregir la tesis rapidamente y por sus aportes valiosos.

A Federico, Cintia, Cecilia y todo el equipo de ALUR, por sus contribuciones y por la ayuda en el proyecto de caña

A mis amigos y compañeros del laboratorio de micro y fisio de Ciencias, por compartir los mates, la cámara, las charlas, las comidas todos los días y por la mano diaria que facilitó mucho mi trabajo. Gracias Dianita por todas las vueltas en estos meses!!!

A mis compañeros del INIA, Mariana, Naty, Naty, Elena, Nora, Fede y Bea que formamos un grupo bárbaro este año!!! Gracias por todo el apoyo y por permitirme disponer el tiempo necesario para poder terminar la tesis.

A mis amigos de la facultad por seguir presentes y continuar con los asaditos anuales!!!

A toda mi familia y mis amigos de la vida y de tantos años, por estar siempre, en los momentos más lindos pero también en los más difíciles. A mi hermana del alma, Marcela, y a mis grandes amigas, Andre, Anita, Dai, Dianita, Pau, Vale y Vero, por el apoyo incondicional de siempre!!!

A mis papás por apoyarme siempre en mis estudios, por darme para adelante y por ser la hija que ellos más quieren (si no contamos a galita), jajaja. Gracias por escucharme la presentación una 10 veces...poniendo caras de interés... A papá por aprender mucho de Enterobacter y Shinella, y a mamá como siempre por las imágenes y la pacieeeeeencia con la impresora!!!

A Denis, mi amor, por toda la paciencia, más en estos últimos meses que sólo existió la tesis y por intentar escuchar la presentación completa varias veces... sin lograrlo, jaja. Por empujarme para adelante, por ser mi apoyo incondicional y mi compañero.

ÍNDICE

<u>Resumen</u>	6
<u>Introducción</u>	8
1. Importancia del nitrógeno.....	8
2. Fijación biológica de nitrógeno.....	9
3. Promoción del crecimiento vegetal en gramíneas.....	13
3.1 Las bacterias rizosféricas y endófitas.....	13
4. Métodos para cuantificar la fijación biológica de nitrógeno.....	16
4.1 Dilución isotópica y abundancia natural de ¹⁵ N.....	17
4.1.1 Dilución isotópica de ¹⁵ N.....	17
4.1.2 Abundancia natural de ¹⁵ N.....	18
5. El cultivo de caña de azúcar.....	19
6. La caña de azúcar en Uruguay: Proyecto Sucro-Alcoholero.....	23
6.1 Sistema de producción.....	24
7. Antecedentes.....	25
<u>Hipótesis de trabajo</u>	26
<u>Objetivo</u>	26
1. Objetivo general.....	26
2. Objetivos específicos.....	26
<u>Capítulo 1</u>	28
1. Metodología	28
1.1 Zona de muestreo de plantas y suelo.....	28
1.2 Técnicas isotópicas con ¹⁵ N.....	31
1.2.1 Abundancia natural de ¹⁵ N.....	31
1.2.2 Dilución isotópica de ¹⁵ N.....	33
2. Resultados	35
2.1 Fijación de nitrógeno en cultivos de caña en campo.....	35
2.2 Dilución isotópica de ¹⁵ N.....	37
3. Discusión	39
<u>Capítulo 2</u>	44

1. Metodología.....	44
1.1 Aislamiento de bacterias endófitas diazótrofes de caña y su clasificación en morfotipos.....	44
1.2 Presencia del gen <i>nifH</i> y formación de una película de crecimiento en medios semisólidos sin nitrógeno.....	45
1.2.1 Lisado celular y amplificación del gen <i>nifH</i> por PCR.....	46
1.2.2 Formación de película y cambio de pH de medios semisólidos.....	46
1.3 Diversidad genética e identificación de los aislamientos bacterianos.....	47
1.3.1 Determinación de la diversidad genética por ERIC-PCR.....	47
1.3.2 Identificación de los aislamientos.....	47
2. Resultados.....	48
2.1 Aislamiento de bacterias endófitas diazótrofes variedades de caña de azúcar.....	48
2.1.1 Diversidad de bacterias endófitas.....	52
2.2 Características diazótrofes en las bacterias endófitas de caña.....	58
2.3 Diversidad genética e identificación de los aislamientos bacterianos.....	60
3. Discusión.....	63

Capítulo 3.....70

1. Metodología.....	70
1.1 Caracterización <i>in vitro</i> de las cepas por fuente de carbono, nitrógeno y resistencia a antibióticos.....	71
1.1.1 Fuentes de carbono y nitrógeno.....	71
1.1.2 Resistencia intrínseca a antibióticos.....	72
1.2 Determinación de características promotoras del crecimiento vegetal.....	73
2.2.1 Producción de sideróforos.....	73
2.2.2 Capacidad antagonista a hongos fitopatógenos.....	73
1.3 Producción de enzimas pectinolíticas y endoglucanasas.....	74
2. Resultados.....	75
2.1 Crecimiento de las cepas en diferentes condiciones de cultivo.....	75
2.1.1 Fuentes de carbono y nitrógeno.....	75
2.1.2 Resistencia intrínseca a antibióticos.....	78
2.2 Determinación de características promotoras del crecimiento vegetal.....	80

2.2.1 Producción de sideróforos.....	80
2.2.2 Antagonismo a hongos fitopatógenos.....	81
2.3 Producción de enzimas pectinolíticas y endoglucanasas.....	82
3. Discusión.....	84
<u>Capítulo 4.....</u>	91
1. Metodología.....	91
1.1 Respuesta de la caña de azúcar a la inoculación bacteriana.....	91
1.1.1 Ensayo en invernáculo.....	91
1.1.2 Ensayo en campo.....	93
2. Resultados.....	96
2.1 Ensayo en invernáculo.....	96
2.2 Ensayo en campo.....	98
3. Discusión.....	100
<u>Conclusiones.....</u>	104
<u>Perspectivas.....</u>	105
<u>Anexo 1.....</u>	106
<u>Anexo 2.....</u>	109
<u>Bibliografía.....</u>	110

RESÚMEN

En Uruguay, la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es un cultivo de gran interés estratégico en el marco de la nueva política energética y de desarrollo socio-productivo que incentiva el gobierno nacional. Se fomenta su siembra en la zona norte del país (Bella Unión, Dep. Artigas) con el Proyecto "Sucro-Alcoholero", cuyo objetivo es, en la actualidad, producir azúcar, energía eléctrica, alimento animal y bioetanol. La producción de caña requiere altas dosis de fertilizante nitrogenado en el suelo (150Kg N/ha) con incidencia en el costo de producción de los agricultores y probablemente en la contaminación de suelos, aguas y atmósfera. Una alternativa relevante a esta problemática y que definió la hipótesis de este trabajo, fue que en el interior de los tejidos de caña se encuentran bacterias con potencial de fijación de N₂ (FBN) y con otras características de promoción del crecimiento vegetal que justifican su estudio y selección.

Un objetivo fue conocer si la FBN contribuye a la nutrición nitrogenada de variedades de caña en cultivos comerciales (Bella Unión, Depto Artigas). Por abundancia natural de ¹⁵N se observó un aporte medio del 33% Nda, destacándose la variedad TUC 77-42 con 70%Nda. Por dilución isotópica de ¹⁵N, 3 variedades (TUC 77-42, LCP 85-384, CP 92-618) presentaron una media del 48% Nda en ensayo en invernáculo.

Otro objetivo del trabajo fue formar una colección de cepas bacterianas endófitas diazótroficas aisladas de tallos de variedades de caña en cultivos comerciales. Se obtuvieron 371 bacterias en total, se seleccionaron 100 y de ellas, un 13% dieron *nifH* positivas. Los aislamientos fueron identificados como pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium* y *Xanthomonas*.

En la siguiente etapa se preseleccionaron 8 cepas promisorias a las cuales se les detectó alta versatilidad en la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno y elevada resistencia intrínseca a antibióticos. Además, presentaron alta variabilidad en las características de PCV: 2 cepas produjeron sideróforos y 4 inhibieron el crecimiento de hongos fitopatógenos en cultivos duales *in vitro*. Se evidenció una actividad pectinolítica y endoglucanasa moderada, que podría contribuir al ingreso de las bacterias a la planta.

Como perspectiva de interés aplicado se evaluó en invernáculo la respuesta en caña a la inoculación con cepas bacterianas. Los resultados mostraron que la respuesta de todas las cepas fue homogénea y se detectaron diferencias significativas con el control negativo en variables de importancia agronómica como peso seco radical, biomasa aérea y altura de plantas. *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 fueron las que mostraron mayores diferencias significativas comparadas con las plantas sin inocular en la mayoría de las variables evaluadas, incluyendo la concentración y acumulación de N en la parte aérea de la planta. Con estas cepas se prepararon inoculantes en turba y se evaluaron en ensayo en campo en Bella Unión. A los 3 meses de instalado el ensayo se observaron diferencias significativas en el número de hojas/planta y acumulación de N/planta para el tratamiento inoculado con *Enterobacter* sp. con respecto a los controles. A los 12 meses (cosecha del ensayo) no se observaron diferencias significativas en las variables de producción y de interés industrial. Esto motivó que, fuera del contexto de este trabajo, se continuara el ensayo en campo con una segunda inoculación y evaluación del cultivo.

En conclusión, los resultados de este trabajo establecieron los primeros antecedentes de aporte de la FBN al cultivo de caña de azúcar en Uruguay y resultados de evaluaciones de cepas en campo con aplicación de inoculantes en turba.

INTRODUCCIÓN

1. Importancia del nitrógeno

El nitrógeno (N) es un elemento fundamental para todos los seres vivos en la formación de biomoléculas como proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos. Particularmente en los vegetales, favorece el crecimiento vegetativo y el contenido de proteínas en los granos (Urzúa, 2000). La mayor parte del N se encuentra en la atmósfera en forma gaseosa (N_2), representando el 79%. Sin embargo no es asimilable por animales y vegetales debido a que la unión entre los átomos de N es un triple enlace muy difícil de romper. En el suelo, el contenido de N está bajo formas inorgánicas (2%) y es removido en cantidades superiores al resto de los nutrientes, por lo que actúa frecuentemente como limitante del crecimiento vegetal (Frioni, 2006). La mayor proporción de N en el suelo es orgánica (98%), el cual debe ser mineralizado antes de su asimilación por las plantas (Frioni, 2006).

Este nutriente es uno de los más requeridos en la producción agropecuaria, por lo que su suministro como fertilizante continúa incrementándose anualmente en el mundo en los diferentes sistemas de cultivo (Jenkinson, 2001).

La producción industrial artificial de fertilizantes químicos nitrogenados se realiza por el método de Haber Bosch (Modak, 2002). Éste requiere el uso de un catalizador de Fe con promotores basados en óxidos de Al, Ca y K. El proceso se realiza a altas temperaturas (alrededor de 500°C) y presiones (100-200 atm), las cuales se logran únicamente con la utilización de combustibles fósiles no renovables. Anualmente se producen más de 100 millones de toneladas de amonio al año por este método (Otero, 2008). Uruguay no produce estos fertilizantes y por lo tanto su uso hace inevitable el gasto de divisas. Existen varios fertilizantes químicos nitrogenados, entre ellos el sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y el nitrato de amonio (NH_4NO_3). El primero tiene 21% de N y 23.7% de S y el segundo tiene 33.5% de N en dos formas: nítrica (16.75%) y amoniacal (16.5%). Dichos fertilizantes son la fuente más rápida de N para los vegetales, pero de fácil lixiviación por la lluvia. Otro fertilizante muy utilizado por los agricultores es la urea

($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) (Halvorson y col., 2002), con un 46% de N aproximadamente. La misma se hidroliza a amonio y luego se transforma a nitrato por las bacterias aeróbicas del suelo (Subiros, 1995). Su uso indiscriminado en cuanto al momento y cantidades aplicadas ha generado problemas económicos y ambientales de mayor o menor importancia según los países. Entre los efectos más significativos se encuentra que menos del 50% de la urea es utilizada por la planta debido a diversos procesos. El proceso de percolación de N, en especial nitratos, desde los suelos a las corrientes de agua, contribuye a los procesos de eutrofización de lagos y ríos, impidiendo la vida de los peces, causando la propagación de malezas acuáticas y dificultando la navegación. Además, los nitratos se transforman en nitritos, que al ser absorbidos por humanos causan efectos negativos en la salud. Por otra parte, la alta incorporación de N a la atmósfera en forma de óxidos por la desnitrificación tiene efectos negativos sobre la capa de ozono y la radiación UV que llega a la tierra. A su vez, la fertilización excesiva puede incrementar la descomposición de la materia orgánica del suelo con la consiguiente emisión de dióxido de carbono (Bifani, 1999).

En resumen, la importancia del N para los seres vivos, el alto costo de los fertilizantes químicos nitrogenados y los problemas colaterales por su aplicación excesiva o en etapas no aprovechables por las plantas, justifican e incentivan cada vez más el interés mundial por obtener beneficios y ventajas de la fijación biológica de nitrógeno (FBN). El desafío es optimizar ese proceso a fin de lograr una sustancial reducción del fertilizante químico nitrogenado en su aplicación en los cultivos (Jeyabal y Kuppuswamy, 2001).

2. Fijación biológica de nitrógeno

En el mundo, el 60% del N total incorporado al suelo anualmente proviene de la FBN, un 30% lo aportan los fertilizantes nitrogenados químicos y un 10% los procesos atmosféricos como las descargas eléctricas (Frioni, 2011). Las cantidades de N que se incorporan a los sistemas productivos vía FBN se estiman entre 139 a 170 millones de toneladas por año, de las cuales un 25 a 30% provienen de asociaciones simbióticas en suelo cultivado, 30% de pastizales permanentes y el resto se explica por otras

asociaciones bacterianas (endófitos y rizosféricos) o por microorganismos fijadores de vida libre (Cervantes, 2001) (figura 1).

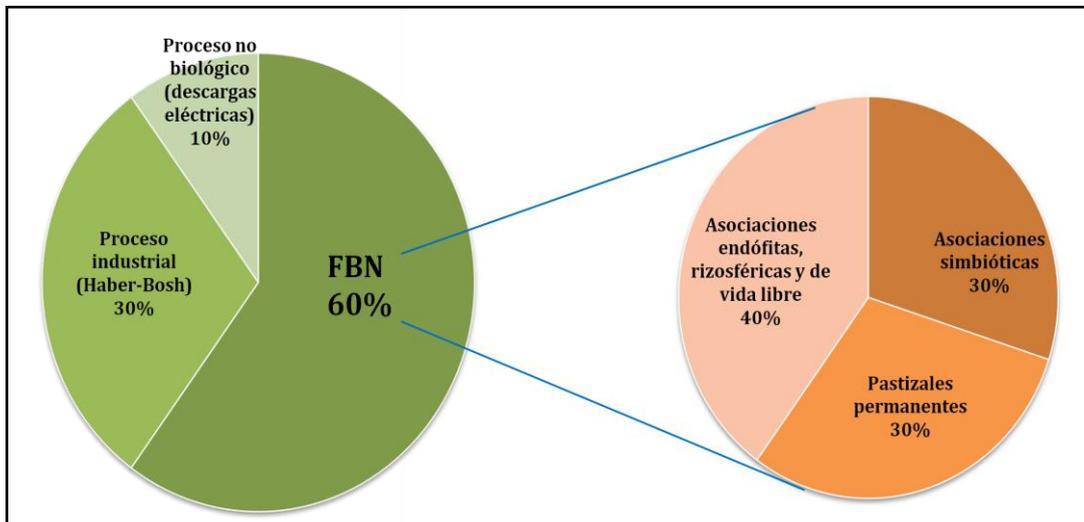


Figura 1.- Formas de incorporación de N por año al sistema productivo.

El reciclaje de N en el sistema suelo-planta-atmósfera depende de numerosas transformaciones entre las formas inorgánicas y orgánicas. La figura 2 muestra las principales transformaciones del N que llevan a ganancias y pérdidas de ese elemento en la agricultura (Kass, 1996).

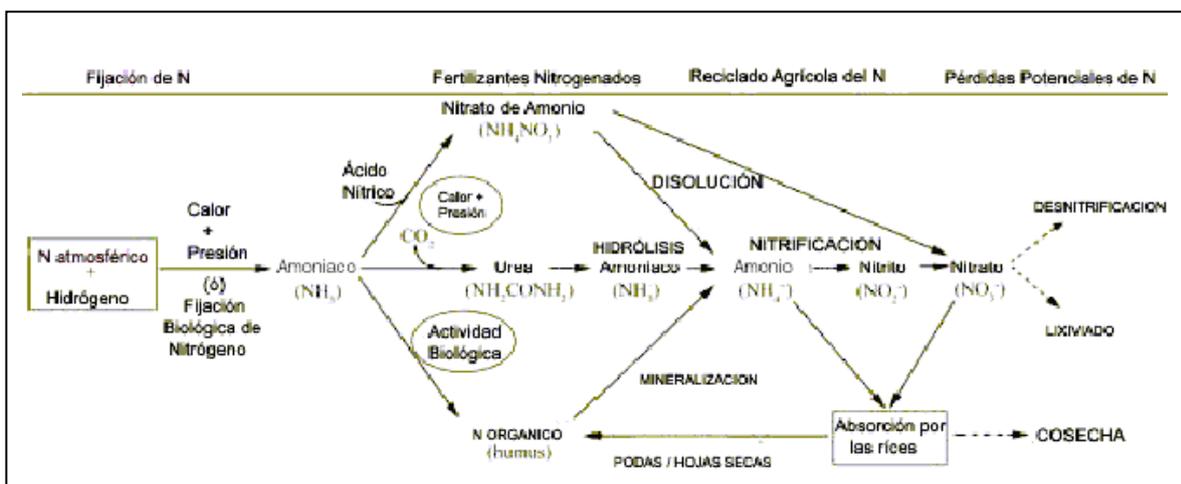


Figura 2.- Transformaciones del N durante los procesos de fijación (biológica o industrial) y su reciclado en la agricultura. (Fuente: Ortega y col., (2010))

La FBN es un proceso catalizado por el complejo enzimático nitrogenasa, en el cual ocurre la conversión de N_2 a NH_3^+ : por la siguiente ecuación (Franche y col., 2009):



Este proceso es llevado a cabo únicamente por organismos procariotas llamados “diazótrofos”, adaptados a ambientes ecológicos muy diversos, de vida simbiótica, libre, rizosféricos o endófitos (Dixon y Kahn, 2004). Según la bibliografía, la estructura y función de la enzima nitrogenasa está altamente conservada entre estos organismos, pero la regulación de la expresión de los genes estructurales que la codifican, es mucho más conocida en las relaciones simbióticas. Dicha relación involucra a bacterias conocidas como “rizobios” y plantas leguminosas de gran importancia en la alimentación humana y animal, siendo el proceso de mayor aplicación, aporte y utilidad en el mundo (Matos y Zúñiga, 2003; Ferrera y Alarcón, 2001).

La nitrogenasa más común, referida como Mo-nitrogenasa o nitrogenasa convencional está formada por dos metaloproteínas: una subunidad grande de 220 KDa (componente I) y otra pequeña de 68 KDa (componente II). El componente II o nitrogenasa-reductasa, es un homodímero ($\alpha:\alpha$) unido por un grupo prostético único de 4Fe-4S codificada por el gen *nifH* (este componente se denomina a veces hierro-proteína). El componente I o nitrogenasa propiamente dicha es un tetrámero ($\alpha:\alpha:\beta:\beta$), codificada por los genes *nifD* y *nifK*, que contiene dos grupos P (P-clusters): a) 8Fe-7S y b) Mo:7Fe-9S:homocitrato. Este constituye el cofactor conocido como FeMoCo (cofactor hierro molibdeno) en donde ocurre la reducción del N_2 . Por ello, a este componente también se le conoce como molibdeno-hierro-proteína (Rubio y Ludden, 2008; Hu y col., 2007; Newton, 2007; Zheng y col., 1998).

La transcripción de los genes estructurales *nifH*, *nifD* y *nifK* que codifican para la nitrogenasa (Peters y col., 1995) está estrictamente regulada, respondiendo a niveles de oxígeno molecular y N fijado, para minimizar el consumo innecesario de energía (Dixon y Kahn, 2004). Evidencias de esto fueron reportadas por Roncato-Maccari y col. (2003), donde observaron que la expresión del promotor *nif* de *Herbaspirillum seropedicae*

ocurre solamente en un número limitado de células bacterianas dentro de raíces y en tejidos aéreos de plantas de maíz, trigo y sorgo. Similares resultados fueron encontrados para la proteína NifH en raíces de plantas de arroz (Gyaneshwar y col., 2002; James y col., 2002).

Se ha establecido que para el completo ensamblaje de la nitrogenasa se requiere de la expresión de otros genes *nif* involucrados en la síntesis y maduración de los componentes (Rubio y Ludden, 2008, 2005; Hu y col. 2007; Zheng y col., 1998).

Por otro lado, *Azotobacter* y muchos de los diazótrofos fotosintéticos (incluyendo algunas cianobacterias) poseen una forma diferente de la nitrogenasa cuyos cofactores contienen vanadio (Vanadio-nitrogenasa) o sólo hierro (Fenitrogenasa) (Newton 2007; Rubio y Ludden 2005).

La nitrogenasa es fácilmente inactivada por el oxígeno por lo que las bacterias fijadoras han desarrollado estrategias especiales para evitar así su inactivación. Estas estrategias van desde la anaerobiosis total, como en *Clostridium*, a la producción de polisacáridos extracelulares que filtran el oxígeno, la exclusión metabólica (*Azotobacter*) y la compartimentación en cianobacterias. En el caso de la simbiosis rizobio-leguminosa, la estructura del nódulo crea el ambiente microaerobio adecuado y la leghemoglobina facilita el transporte de oxígeno al bacteroide para el metabolismo aerobio requerido y así obtener la energía necesaria para la reducción del N₂ (Vessey y col., 2005).

El aporte vital de la FBN por la asociación leguminosa-rizobio condujo a los investigadores en las últimas décadas, a tratar de extender esos conocimientos y tecnología a las gramíneas como el arroz, trigo, maíz y caña de azúcar. Desde el punto de vista económico y agrícola, la importancia de estos cultivos es enorme, ya que constituyen la principal fuente de alimentos de humanos y animales en el mundo.

3. Promoción del crecimiento vegetal en gramíneas

Existen numerosos estudios de bacterias asociadas a cultivos de gramíneas, con capacidad de fijar N atmosférico y de promover el crecimiento vegetal por otros mecanismos. Estas bacterias son denominadas “promotoras del crecimiento vegetal” (PCV) y pueden interactuar entre sí en la rizósfera o en el interior de las plantas, induciendo mecanismos PCV directos, como la producción de fitohormonas (Muthukumarasamy y col., 2000), la producción de sideróforos (Wenbo y col., 2001), la solubilización de fosfatos (Bowen y Rovira, 1999) y la FBN (Verma y col., 2001); e indirectos, como el control biológico de plagas y de enfermedades, inducción de resistencia sistémica de la planta (Hallmann y col., 1997) y producción de antibióticos (Strobel y Daisy, 2003).

Numerosas publicaciones sobre bacterias PCV, en particular diazótrofes, tienen como objetivo el promover su uso como forma de conservar los recursos naturales, incrementar los rendimientos y lograr cultivos más sustentables (Strobel y Daisy, 2003; Wenbo y col., 2001).

Los estudios realizados con bacterias PCV en gramíneas, mostraron que existe una gran diversidad de ellas ocupando nichos distintos y que las más estudiadas han sido las rizosféricas y las endófitas (Alarcón, 2001; Döbereiner, 1992).

3.1 Las bacterias rizosféricas y endófitas

Las bacterias rizosféricas utilizan los exudados radicales estableciendo diferentes interacciones con la planta: positivas (PCV), negativas (patogénicas) y/o neutrales (Whipps, 2001). La composición y cantidad de exudados varía con la planta y las condiciones abióticas, como el agua y la temperatura (Mayz-Figueroa, 2004). Las poblaciones de diazótrofes se encuentran generalmente enriquecidas en la rizósfera en comparación al suelo no rizosférico (Balandreau y Knowles, 1978). Dado que el proceso

de FBN es energéticamente costoso y sensible al O₂, es razonable asumir que en la rizósfera los diazótrofos encuentran ventajas competitivas frente a otros microorganismos del suelo en aporte de materia orgánica y baja tensión de oxígeno (Hurek y Reinhold-Hurek, 2005). En las últimas décadas se ha investigado el papel de las rizobacterias de diversas gramíneas como caña de azúcar (Boddey y col., 1995), maíz (Seldin y col., 1998), trigo, sorgo (Baldani y col., 1986a), cebada y pastos tropicales (Döbereiner y col., 1995), identificando los géneros bacterianos *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*.

Las bacterias endófitas, por otra parte, han sido muy estudiadas desde el punto de vista de PCV en gramíneas en los últimos años. El concepto de “endófito” literalmente significa “dentro de la planta” (*endo*: “dentro”, *phyton*: “planta”) y ha sido definido por varios autores. Según Quispel (1992), las bacterias endófitas viven, sin causar daño aparente, en el interior de las células o tejidos de las plantas durante una parte de su ciclo de vida. Desde el punto de vista metodológico, las bacterias endófitas son reconocidas como las aisladas de tejidos de plantas desinfectadas superficialmente o, de su interior, y que no causan síntomas visibles de enfermedad en la planta (Sakiyama y col., 2001; Hallmann y col., 1997). A su vez, Reinhold-Hurek y Hurek (1998) plantearon el criterio de endófitos “verdaderos” para aquellas bacterias que fueran aisladas de tejidos desinfectados superficialmente y que exista evidencia microscópica de su presencia en los tejidos vegetales.

Estas bacterias son encontradas principalmente en los espacios intercelulares de los tejidos y, con menor frecuencia, intracelularmente y en tejidos vasculares (Bell y col., 1995; Hurek y col., 1994). Numerosos estudios señalan que estas bacterias promueven el crecimiento en las plantas (Tsavkelova y col., 2007), aumentan la resistencia a enfermedades (Chanway, 1998), contribuyen a la FBN (Estrada y col., 2002; Jimenez-Salgado y col. 1997) y brindan protección contra patógenos mediante la producción y síntesis de metabolitos secundarios (Shiomi y col., 2006; Berg y col., 2005) y biorremediación (Newman y Reynolds, 2005).

Algunos grupos de investigadores, han propuesto clasificar a esas bacterias en: facultativas y obligadas. Las primeras son las que sobreviven en el suelo y/o la superficie de la planta y son capaces de colonizar sus tejidos, como por ejemplo *Azospirillum* spp. Las endófitas obligadas sobreviven pobremente en el suelo y aparentemente necesitan vivir dentro de la planta, como por ejemplo *Herbaspirillum* spp., *G. diazotrophicus*, *Burkholderia* spp. y *Azoarcus* spp. (Baldani y col., 1997; Olivares y col., 1996). Debido a su localización en los tejidos internos de las plantas, estas bacterias presentan ventajas en relación con las rizosféricas al estar en contacto con una mayor cantidad de nutrientes necesarios para su crecimiento y el habitar un nicho ecológico más protector de las condiciones adversas (Rózycki y col., 1999; Reinhold-Hurek y Hurek, 1998). Además, ellas brindarían beneficios más directos al hospedero en comparación con las bacterias rizosféricas, por hallarse en contacto íntimo con la planta (Sevilla y Kennedy, 2000)

Las bacterias endófitas se multiplican y diseminan dentro de los tejidos vegetales. Los pasos iniciales de la colonización parecen ser similares a los de las bacterias rizosféricas, involucrando una colonización superficial en el sitio de emergencia de las raíces o la zona de elongación y diferenciación, acompañado de un proceso activo por enzimas hidrolíticas como pectinasas y celulasas para ingresar a la planta (Cocking y col., 1994). Asimismo, también pueden entrar por las partes aéreas, flores, tallo y cotiledones (Zinniel y col., 2002; Kobayashi y Palumbo, 2000) o por heridas provocadas por factores bióticos y abióticos (Quadt-Hallmann y col., 1997).

En las gramíneas se ha descrito una gran diversidad de bacterias endófitas que además son diazótrofes (en adelante BED), como ejemplo *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. y *Azospirillum* spp. (Montañez y col., 2009; Boddey y col., 2003; James, 2000). En variedades de caña de azúcar se aisló bacterias de los géneros *G. diazotrophicus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Pantoea* y *Herbaspirillum seropedicae* (Loiret, 2004; Elbeltagy y col., 2001; Junior y col., 2000; Dong y col., 1994; Cavalcante y Dobereiner, 1988; Baldani y col., 1986). A su vez, además del aislamiento se ha estudiado el efecto de la inoculación de estas bacterias sobre gramíneas. Por ejemplo,

Fallik y col., (1989) evidenciaron un incremento en la cantidad de fitohormonas (AIA) inoculando plantas de maíz con *Azospirillum* sp.; Punschke y Mayans (2011) encontraron que *Herbaspirillum* sp. aumenta significativamente la biomasa aérea de plantas de arroz crecidas en condiciones controladas; y Schultz y col. (2012) demostraron que la inoculación de variedades de caña de azúcar con *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* y *B. tropica* aumentaron la producción de tallos y el contenido de N-total y peso seco de la parte aérea.

4. Métodos para cuantificar la fijación biológica de nitrógeno

Uno de los temas más cruciales en las investigaciones sobre la FBN en gramíneas, lo constituye su cuantificación (Kg N/ha) y no tanto el aislamiento de bacterias y caracterización de ellas. Se ha hecho un gran esfuerzo por perfeccionar las metodologías disponibles para obtener resultados más precisos al respecto. En general, se utilizan los mismos métodos en leguminosas y gramíneas aunque con algunas variantes. Entre los más utilizados se encuentran: la reducción de acetileno (Hardy y col., 1968) y las técnicas isotópicas de ^{15}N (Urquiaga y col., 2011; Valles de la Mora y col., 2003).

La reducción de acetileno se basa en que la enzima nitrogenasa en estado activo puede reducir, además del N_2 , a otras moléculas con triple enlace, como acetileno a etileno (Giller y Wilson, 1991). La técnica es simple, rápida, de bajo costo de equipos y recursos (Turner y Gibson, 1980), pero tiene como limitante que mide la actividad de la enzima nitrogenasa de manera puntual y en un corto período de tiempo (Van Bemmum y Bohlool, 1980). Es muy útil para una estimación inicial o preselección de sistemas con y sin FBN *in vitro*, con baja exactitud por la alta sensibilidad a variaciones ambientales, aspecto que no la hace recomendable para determinaciones en campo.

En las últimas tres décadas se ha incrementado la aplicación de técnicas isotópicas en la estimación de la FBN y se consideran como las únicas que ofrecen cuantificaciones globales de este proceso.

4.1 Dilución isotópica y abundancia natural de ^{15}N

Estas técnicas distinguen la proporción de N en la planta que procede del suelo, del fertilizante químico y de la atmósfera (Danso, 1995; Barea, 1991). Se basan en que los isótopos estables del N (^{14}N y ^{15}N), tienen características químicas idénticas pero diferentes pesos atómicos, siendo el isótopo ^{14}N el más abundante y más liviano, y el ^{15}N el más pesado. La concentración de isótopos estables de un compuesto o material se representa como la relación molecular del isótopo pesado respecto al isótopo liviano ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$). A la concentración de ^{15}N en el aire se le denomina abundancia natural, teniendo un valor estable de $0,3663 \pm 0,0004\%$. Sin embargo, este isótopo presenta un valor igual a 0 cuando se expresa como delta (δ) (Axmann y Zapata, 1990). Dentro de las técnicas que utilizan el isótopo ^{15}N se encuentran “Dilución isotópica de ^{15}N ” (DI) y “Abundancia natural de ^{15}N ” (AN). Ambas han sido y son ampliamente utilizadas en determinar el aporte de N biológico fijado tanto en el sistema rizobio-leguminosa como en asociaciones de bacterias con gramíneas. En las mismas deben utilizarse plantas controles o de referencia, con características fisiológicas bien definidas (Barea, 1991), tales como: 1) absorber el N del suelo en una zona similar al cultivo fijador, 2) presentar etapas de desarrollo fisiológico similares a la planta fijadora, y 3) tolerar factores ambientales similares al cultivo fijador. Ambas técnicas miden la cantidad de N fijado hasta el momento de extracción de la muestra, requieren equipos relativamente costosos (espectrómetro de emisión o de masa) y personal entrenado para la realización del análisis, aspectos compensados con su exactitud.

4.1.1 Dilución isotópica de ^{15}N

Es una de las técnicas más usada para determinar la fijación de N_2 en invernáculo y campo. El método requiere la aplicación al suelo (o sustrato) de una pequeña dosis de fertilizante enriquecido con ^{15}N previo a la siembra, tratando de lograr siempre una distribución homogénea de la relación isotópica en el sustrato tanto en profundidad como en el tiempo (James, 2000). Cuando existe aporte de la FBN a la planta, ésta

incorpora N atmosférico el cual tiene una relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ menor a la del sustrato fertilizado con ^{15}N , “diluyendo” la relación isotópica en la planta. Es posible medir la FBN conociendo la relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ y teniendo como referencia una planta control “no fijadora” (Fried y Middelboe, 1977).

La técnica de DI se ha empleado en cultivos de gramíneas para determinar la FBN. Por ejemplo, Montañez y col. (2009) en un ensayo en invernáculo obtuvieron valores de %Nda (% de N derivado de la atmósfera) entre 12.3%- 33.1% en variedades comerciales de maíz en suelo sin inocular. Asimismo, el grupo de Oliveira y col. (2002) determinó en caña de azúcar micropropagada un 30% Nda cuando fueron inoculadas con una mezcla de *G. diazotrophicus*, *A. amazonense*, *Burkholderia* sp. y dos cepas de *H. rubrisubalbicans*. Más aún, estudios de Urquiaga y col. (1992) evidenciaron que más del 60% del N acumulado en algunas variedades de caña en Brasil fue por la FBN.

4.1.2 Abundancia natural de ^{15}N

Este método es una variación al de DI y se basa en que existen pequeñas diferencias en la AN entre el N_2 atmosférico y el N del suelo. Estas diferencias se expresan como delta (δ) ^{15}N o partes por mil ($^0/_{00}$) relativo a la composición de ^{15}N en el N_2 atmosférico (Shearer y Kohl, 1986). Las plantas que crecen fijando N_2 presentan un valor de $\delta^{15}\text{N}$ negativo o cercano a cero, mientras que aquellas que obtienen el N del suelo presentan valores positivos de $\delta^{15}\text{N}$ (Boddey y col., 2001).

Dicha técnica ha sido empleada en numerosos estudios con gramíneas con resultados muy variables. En Filipinas, se demostró que la contribución de la FBN en caña de azúcar fue en promedio 61%, mientras que en Japón, todos los valores de ^{15}N de caña de azúcar fueron más bajos que los valores de ^{15}N de plantas tomadas como referencia (Yoneyama y col., 1997). Por otra parte, estudios realizados en Brasil demostraron que el %Nda en la localidad de Três Pontas fue de 30%. Sin embargo, los análisis en Cerquilha, Novo Horizonte, Igarapava, Itápolis y Assis en el Estado de San Pablo,

mostraron en algunos casos valores de ^{15}N en caña más bajos que las plantas de referencia, siendo el %Nda estimado en un rango desde 0% a 72% (Yoneyama y col., 1997). Por otro lado, es importante destacar que estudios realizados en Brasil por Boddey y col. (2001) evidenciaron que algunas variedades de caña de azúcar obtienen hasta el 60% de sus necesidades de N por la FBN.

El empleo del isotopo estable ^{15}N tiene una amplia aplicación en la comprensión de los procesos químicos y biológicos que se dan en el ciclo del N y en el movimiento de compuestos nitrogenados en el sistema suelo/planta. La bibliografía indica que ambas técnicas isotópicas constituyen una herramienta muy valiosa para determinar la FBN en gramíneas y de hecho son las más utilizadas en campo por su exactitud y facilidad de muestreo.

5. El cultivo de caña de azúcar

El cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) ocupa un área de algo más de 20 millones de hectáreas en el mundo, con una productividad promedio de 65.2 ton/ha (FAO, 2003). El área cultivada y su productividad difieren considerablemente de un país a otro. En el año 2003, Brasil tenía la mayor área (5.343 millones de ha), mientras que Australia tenía la mayor productividad promedio (85.1 ton/ha) (FAO, 2003). Un cultivo eficiente alcanza 100-150 toneladas de caña por hectárea por año. De los 121 países productores de caña, 15 de ellos (Brasil, India, China, Tailandia, Pakistán, México, Colombia, Australia, Estados Unidos, Filipinas, Indonesia, Cuba, Sudáfrica, Argentina, Bangladesh) concentran el 86% del área y el 87% de la producción mundial (cuadro 1). Del total de producción de azúcar blanca cristalizada, aproximadamente el 70% proviene de la caña de azúcar (1333 millones de ton métricas de azúcar) y un 30% se obtiene de la remolacha azucarera.

Actualmente, el principal productor mundial de caña de azúcar continúa siendo Brasil con 9 millones de ha plantadas y un rendimiento promedio de 80,5 t/ha (IBGE-SIDRA, 2009). Cerca del 60% de la producción es dedicada a la elaboración de alcohol y el 40%

restante a la producción de azúcar. Hoy día, Brasil produce cerca de 26 mil millones de litros de etanol para su uso como combustible vehicular. El liderazgo de Brasil en el mercado mundial se basa en el impulso, a mediados de los años 70, del mayor programa bioenergético del mundo: el Proalcool. Con este programa, Brasil disminuyó significativamente la importación de petróleo y promovió al sector socio-productivo (Urquiaga y col, 2010).

Cuadro 1.- La Caña de Azúcar en el Mundo: Área cultivada, Producción y Productividad. (Fuente: <http://www.sugarcane crops.com>).

País	Área (millones ha)	Producción (millones ton)	Productividad (ton/ha)
Brasil	5.343	386.2	72.3
India	4.608	289.6	62.8
China	1.328	92.3	65.5
Tailandia	0.970	64.4	66.4
Pakistán	1.086	52.0	47.9
México	0.639	45.1	70.6
Colombia	0.435	36.6	84.1
Australia	0.423	36.0	85.1
Estados Unidos	0.404	31.3	77.5
Filipinas	0.385	25.8	67.1
Indonesia	0.350	25.6	73.1
Cuba	0.654	22.9	35.0
Sudáfrica	0.325	20.6	63.4
Argentina	0.295	19.2	65.2
Bangladesh	0.166	6.8	41.2
Mundial	20.42	1333.2	65.2

La caña pertenece a la familia de las *Graminae* o *Poaceae* (Moore y Maretzki, 1996). En la actualidad, las variedades cultivadas son híbridos provenientes en su mayoría de cruzamientos entre varias especies del género *Saccharum*, principalmente con *S. spontaneum*, variedad que presenta alta resistencia a enfermedades (Fogliatta, 1995). Tiene un metabolismo C4 y es de origen tropical (Humbert, 1974), aunque también

existen variedades adaptadas a climas subtropicales y templados. Su periodo de crecimiento varía entre 11 y 17 meses, dependiendo de la variedad de caña, de la zona climática y del manejo del cultivo. Es un monocultivo, con altos requerimientos nutricionales y con una alta producción de materia verde. Por lo tanto el manejo nutricional, en especial el suministro de N y agua, son aspectos críticos para una alta productividad (Subirós, 1995). Cuando el cultivo de caña tiene las cantidades adecuadas de N mejora el macollamiento, altura, grosor y peso de los tallos. Por el contrario, su insuficiencia provoca un desplazamiento de este elemento móvil desde las hojas más viejas hacia los tejidos nuevos. También causa una mala brotación de los esquejes durante la siembra y una reducción en la cantidad de brotes. Esto hace que los tallos se tornen delgados y maduren prematuramente, lo que provoca una disminución del crecimiento de la planta (Subirós, 1998, 1995). Sin embargo, un exceso de N también provoca efectos adversos en el desarrollo del cultivo, ocasionando un incremento en la relación parte aérea/raíz, así como un aumento en la susceptibilidad de la planta a enfermedades. Adicionalmente, aplicaciones excesivas tardías afectan la calidad del jugo porque reduce su pureza al aumentar los azúcares reductores (Subirós, 1998, 1995).

El tallo es el órgano de la caña que tiene mayor importancia económica ya que en él se almacenan los carbohidratos producto de la fotosíntesis, en especial la sacarosa. Estos se van acumulando en los entrenudos inferiores disminuyendo su concentración a medida que se asciende (Moore y Maretzki, 1996; Subiros, 1995). A partir del tallo se obtiene la sacarosa y otros derivados como melaza, bagazo y cachaza (<http://www.sugarcane crops.com>).

Dentro de los factores ambientales que afectan el óptimo crecimiento de la caña, los que más influyen en su desarrollo son la temperatura, el viento, la humedad y la luminosidad (Acuña, 2004; Chaves, 1999). Asimismo, dicho cultivo posee un ciclo de

desarrollo vegetativo variable cuya duración depende de las características del material genético y de la influencia del clima.

Este cultivo es semi-perenne, a la primera siembra se le denomina planta madre y a los rebrotes siguientes luego de realizada la cosecha de la plantación, caña soca.

La forma de propagación de la caña es asexual a partir de esquejes que son secciones frescas de tallo con 2 y 3 yemas laterales y libres de plagas y enfermedades. Siempre se eligen las yemas de mayor vigor germinativo, ubicadas en la parte superior del tallo donde hay más azúcares reductores, glucosa y fructosa, necesarios para un adecuado desarrollo. De cada yema del esqueje (tallo primario) se generan los tallos secundarios y el sistema radical, dando lugar a una planta nueva e idéntica a la original. Antes del periodo de floración, momento en el cual disminuye el contenido de azúcar del tallo, la planta es cosechada. Los tallos se cortan a nivel del suelo, quedando por debajo de la superficie el tallo primario de donde se va a generar una nueva brotación de las yemas (soca 1). Los cultivos de caña soca se cosechan a intervalos anuales principalmente en las estaciones secas. En los sucesivos rebrotes (soca 2, soca 3, etc.), el rendimiento del cultivo va disminuyendo con respecto a la cosecha anterior debido a daños provocados por la maquinaria empleada, las prácticas de manejo del cultivo, así como el ataque de patógenos. Es por esto que la caña se debe replantar cada 5 a 15 años, aunque existen cañaverales de 25 o más años de edad (<http://www.sugarcane.crops.com>).

Las hojas de la caña nacen en los entrenudos del tallo. A medida que crece la caña, las hojas más bajas se secan, caen y son reemplazadas por las que aparecen en los entrenudos superiores. También nacen en los entrenudos las yemas que bajo ciertas condiciones pueden llegar a dar lugar al nacimiento de otra planta (esqueje). Las hojas de la caña son enumeradas según el sistema de Kuijper, definido por Casagrande (1991). La primera hoja desde el ápice que tiene ócreas visibles se designa como +1. Hacia abajo las hojas reciben sucesivamente los números +2, +3, etc. Para realizar el diagnóstico foliar se puede utilizar la hoja +1, conocida también como TVD (Top Visible Dewlap) ó la

hoja +3, particularmente utilizada en Brasil con bastante amplitud y aparente éxito (Chaves, 1999).

6. La caña de azúcar en Uruguay: Proyecto Sucro-Alcoholero

En Uruguay la caña de azúcar es considerada un cultivo multipropósito, siendo de gran interés estratégico en el marco de una nueva política energética y de desarrollo socio-productivo. Desde el año 2006, su promoción se lleva a cabo en el norte del país (Bella Unión, Departamento de Artigas) mediante el Proyecto "Sucro-Alcoholero" ejecutado por la empresa Alcoholes del Uruguay (ALUR S.A). ALUR pertenece en un 90% al Grupo ANCAP, mientras que el 10% restante responde a Petróleos de Venezuela (PDVSA). Tiene como objetivo producir, a partir de materias primas nacionales, azúcar, energía eléctrica, alimento animal y bioetanol. Este último se produce a los efectos de sustituir un porcentaje de los combustibles fósiles por biocombustibles, disminuyendo los gastos inherentes a las importaciones de petróleo (Ley N° 18.195) (www.alur.com.uy/home.html).

El Proyecto Sucro-Alcoholero es socio-productivo, teniendo en cuenta que se han generado 1500 puestos de trabajo en el sector agrícola, 600 en la industria, 150 en el sector transporte y brinda asesoramiento técnico directo a casi 400 productores rurales.

Con respecto a los productos de la caña, ALUR se orienta a producir próximamente, 18 mil m³ de etanol, 47 mil toneladas de azúcar y 6 Mwh de energía eléctrica por quema de bagazo de caña, de los cuales 2 Mwh se utilizarán para autoabastecer al ingenio y el excedente será vendido a UTE para incorporarlo a la red. Otros de los subproductos obtenidos actualmente es el alimento para ganado de carne y leche, en forma de bloques proteicos y concentrados; la vinaza, utilizada como fertilizante líquido para la caña por ser rica en potasio; y la cachaza, utilizado como fertilizante sólido para la caña por tener altos valores en materia orgánica (figura 3) (ALUR S.A., 2010). Es importante

destacar que ALUR S.A. prevé llegar a las 10 mil ha plantadas de caña en la zafra 2012 (Ing. Agr. F. Hackembruch, comunicación personal).

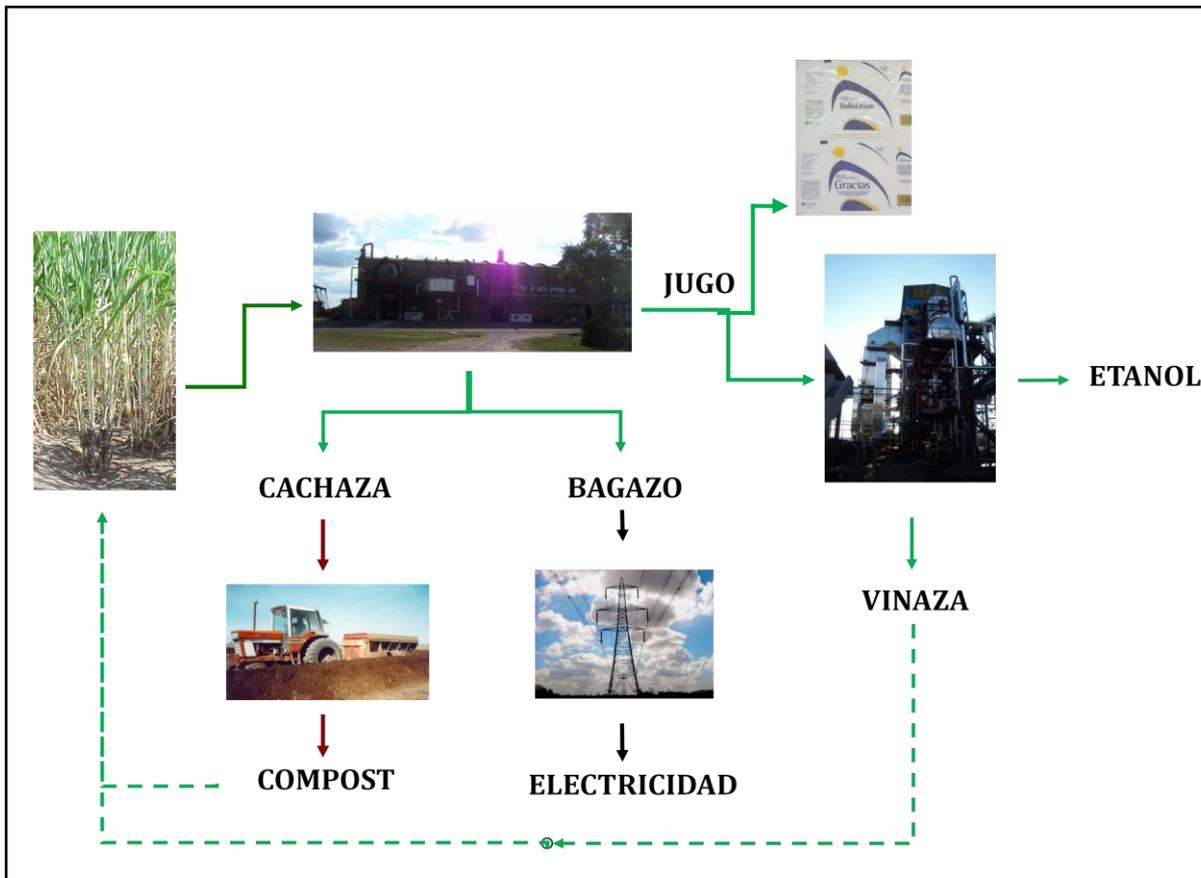


Figura 3.- Esquema tecnológico para el aprovechamiento de la caña de azúcar utilizado en ALUR S.A.

6.1 Sistema de producción

Desde el punto de vista económico y social, el cultivo de caña de azúcar tiene gran importancia nacional y por lo tanto cuenta con el aval y estímulo gubernamental para el incremento del área de siembra e industrialización. Es así que los técnicos de ALUR están interesados en evaluar nuevas opciones de manejo del cultivo para mejorar su productividad. Es un monocultivo cuyo sistema de producción genera problemas físicos, químicos y biológicos en los suelos, intensificando su uso y sin un descanso o rotación con algún otro cultivo. Esto en gran parte se debe a que el 60-65% de los productores de

caña tienen predios de 20 ha en promedio en un radio no mayor a 30 Km del ingenio. Como resultado de este sistema de producción hay una disminución de la productividad de la caña, que puede llegar en suelos con severas restricciones, hasta un 50% de su potencial en la etapa final del ciclo del cultivo (F. Hakenbruch, comunicación personal). Varias son las causas de esta realidad, el aumento de enfermedades, incremento de malezas-perennes de difícil control, la pérdida de las propiedades físicas del suelo y la disminución de su fertilidad. Una de las posibles soluciones a estos problemas es incrementar las cantidades de fertilizante nitrogenado en los cultivos. Sin embargo, esto traería problemas ambientales y económicos, principalmente a los pequeños productores, ya que el costo de producción sería de 215 dólares/ha (Ing. Agr. F. Hackembruch, comunicación personal).

7. Antecedentes

Actualmente, los técnicos de ALUR y los productores de caña de la zona de Bella Unión ven con interés el que se trate de resolver los problemas de baja productividad del cultivo para lo cual apuestan a la necesidad de evaluar nuevas tecnologías. Por ejemplo, conocer si bacterias aisladas de plantas de caña en los cultivos tienen características PCV tal como se encuentra en la bibliografía para caña y otras gramíneas (Montañez y col., 2009; Baldani y col., 2000). Esta inquietud originó que en el 2009 se comenzara a trabajar en el proyecto titulado “Producción sustentable en caña de azúcar: bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su aplicación agronómica en cultivos comerciales”, financiado por el INIA (FPTA-275), y ejecutado por los laboratorios de Bioquímica y Genómica Microbiana (BIOGEM) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y el de Microbiología del Suelo de la Facultad de Ciencias, ambos vinculados estratégicamente con ALUR. En el marco de ese Proyecto y teniendo en cuenta la falta de información sobre el papel que cumplen las bacterias PCV asociadas a caña y sobre el potencial de FBN en el cultivo en nuestro país, se planteó este trabajo de tesis.

HIPOTESIS DE TRABAJO

La hipótesis del este trabajo es que bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a caña de azúcar, tienen un efecto de incremento significativo en el rendimiento de este cultivo en nuestro país.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

El objetivo general del trabajo es aislar, caracterizar y evaluar bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a variedades de caña de azúcar comerciales, a fin de aumentar el rendimiento del cultivo en forma sustentable.

2. Objetivos específicos

La tesis se organizó en 4 capítulos cuyos objetivos específicos se mencionan a continuación.

Capítulo 1: Aporte de la fijación biológica de nitrógeno a cultivos comerciales de caña de azúcar.

1. Determinar el aporte de la fijación biológica de nitrógeno por el método de abundancia natural de ^{15}N en cultivos comerciales de caña localizados en el Noroeste de Uruguay (Bella Unión, Depto. Artigas)
2. Determinar la fijación biológica de nitrógeno en variedades comerciales de caña por la técnica de dilución isotópica de ^{15}N en un ensayo de invernáculo.

Capítulo 2: Caracterización de bacterias endófitas diazótrofes asociadas a variedades comerciales de caña de azúcar.

1. Aislar y caracterizar genéticamente bacterias endófitas diazótrofes asociadas a variedades de caña cultivadas en Bella Unión, Uruguay.

Capítulo 3: Caracterización bioquímica y de promoción del crecimiento vegetal de bacterias endófitas diazótrof asociadas a caña de azúcar.

1. Determinar en las bacterias endófitas diazótrof sus características bioquímicas y de promoción del crecimiento vegetal, así como la capacidad de producir enzimas pectinolíticas y endoglucanasas *in vitro*.

Capítulo 4: Respuesta de las plantas de caña de azúcar a la inoculación con bacterias endófitas diazótrof.

1. Evaluar en invernáculo y campo la respuesta de las plantas de caña de azúcar a la inoculación con bacterias seleccionadas.

CAPÍTULO 1

Aporte de la fijación biológica de nitrógeno a cultivos comerciales de caña de azúcar.

1. METODOLOGÍA

1.1. Zona de muestreo de plantas y suelo

La zona de muestreo está ubicada en el departamento de Artigas, Bella Unión y comprende a productores de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) cuyos predios se encuentran alrededor del ingenio ALUR. Este último está ubicado entre el Río Uruguay y la Ruta 3, 10km antes de llegar a la ciudad de Bella Unión (figura 1). La mayoría de esos productores tienen predios pequeños (20 ha) y reciben asesoramiento técnico de ALUR en el manejo de sus cultivos. El cultivo de caña se realiza en tablones que tienen una superficie de 1 ha, con la finalidad de facilitar su manejo, riego, control de plagas, así como la cosecha anual.

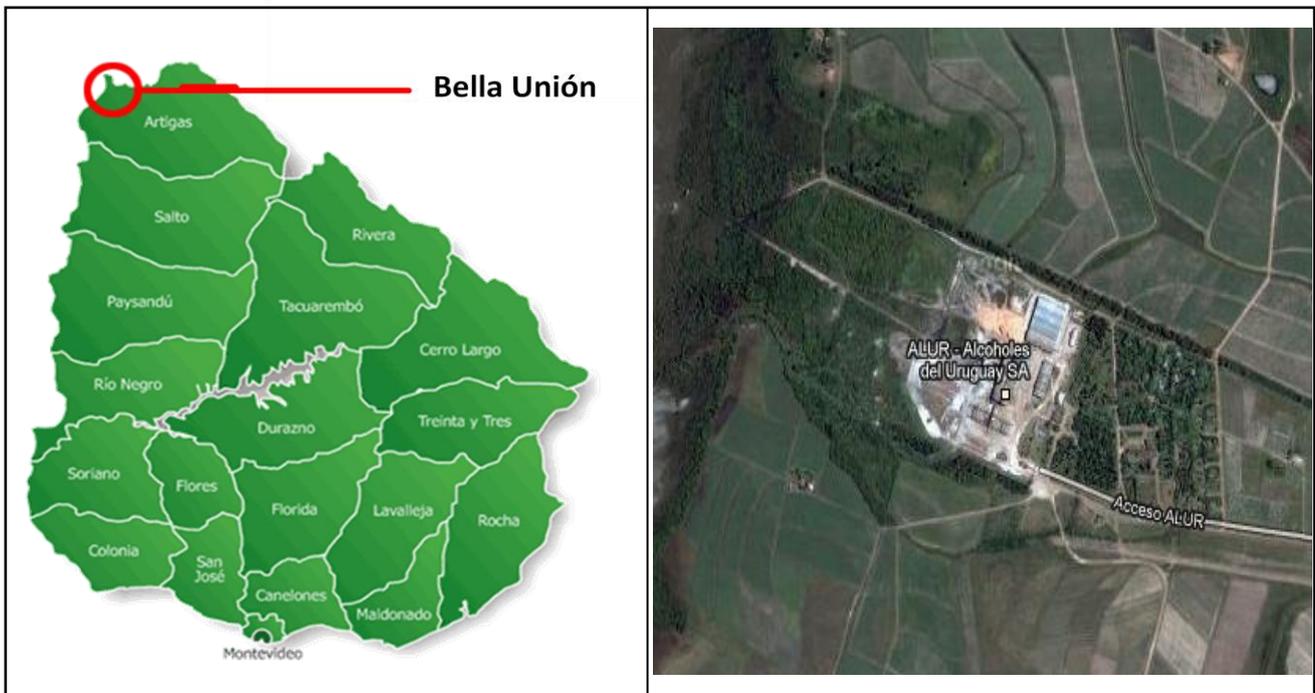


Figura 1.- Ubicación de la Ciudad de Bella Unión en el Departamento de Artigas, Uruguay (Izquierda). Mapa satelital del Ingenio ALUR S.A. (derecha).

El clima de esa zona norte del país es templado con una temperatura media anual de 19,5°C. La precipitación media anual es de 1400mm (ALUR S.A., 2010; <http://www.meteorologia.gub.uy>). Los suelos son de fertilidad media a alta, corresponden al Orden II (Suelos Melánicos), específicamente al Gran grupo 2.1 (Brunosoles). Los Brunosoles son suelos de color oscuro, con alto contenido de materia orgánica y alta saturación de bases. Tienen una textura media a pesada (franco, franco limoso, franco arcilloso limoso) y un drenaje moderado a bueno (<http://edafologia.fcien.edu.uy>).

En abril del 2009 se realizó una gira a la zona de muestreo para elegir 10 sitios (tablones) según indicaciones del Ing. Agr. F. Hackembruch (ALUR S.A.). Los tablones fueron seleccionados dentro de los establecimientos de productores particulares y en el campo experimental de ALUR. En la selección se tuvo en cuenta: variedad de caña, duración de los cultivos (soca) y fertilización nitrogenada (alta: 150 kgN/ha; baja: 50 kgN/ha, y sin fertilización por 4-5 años) (cuadro 1).

Cuadro 1.- Sitios de muestreo de plantas de caña según variedad, fertilización nitrogenada, duración del cultivo (soca) y coordenadas geográficas (GPS), ALUR, Bella Unión, Depto. Artigas, 2009.

Tablón	Variedad de caña	Fertilización nitrogenada *	Sitio de muestreo (coordenadas GPS) Soca**
1	TUC 77-42	alta	Colonia España Burgardt Hnos. (S 30°20'56,5"; W 57°37'19,1") Soca 4
2	TUC 77-42	alta	Colonia España Burgardt Hnos. (S 30°20'57,7"; W 57°37'15,6") Soca 4
3	LCP 85-384	alta	Colonia España Burgardt Hnos. (S 30°21'3.5"; W 57°37'11.2")
4	CP 92-618	baja	Campo experimental ALUR (S 30°20'3.7"; W 57°37'3.6") Soca 2
5	TUC 77-42	sin fertilizar	(S 30°20'0.1"; W 57°37'8.9")
6	TUC 77-42	baja	Campo experimental ALUR (S 30°19'56"; W 57°36'53.3") Soca 1
7	LCP 85-384	baja	Campo experimental ALUR (S 30°19'51.7"; W 57°36'55.2") Soca 3
8	FAM 81-77	baja	Soca 1 (S 30°19'13.4"; W 57°34'45.7")
9	TUC 95-24	baja	Campo experimental ALUR (ND) Soca 3
10	TUC 78-14	baja	Campo experimental ALUR (S 30°19'57.4"; W 57°36'53.2") Soca 1

*Alta: 150kg N/ha; baja: 50Kg N/ha; sin fertilizar: sin fertilización por 4-5 años. **Número de rebrotes de la caña luego de realizada la primera cosecha. ND: no determinado. Plantas de caña de los tablones 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 utilizadas para el ensayo de abundancia natural de ¹⁵N (Capítulo 1). Plantas de caña de los tablones 1, 3, 6, 7 y 10 utilizadas para el aislamiento de bacterias endófitas diazótrofes (Capítulo 2).

El muestreo en los tablones se realizó de manera de utilizar las plantas extraídas para los experimentos con ¹⁵N y para el aislamiento de bacterias endófitas diazótrofes (BED) asociadas. En cada tablón se eligieron 8 plantas al azar de 2 filas centrales de caña, evitando así el efecto borde. Las plantas se cortaron con machete a 10cm del suelo y se dividieron en submuestras (ver más adelante) según los experimentos programados. Contiguo a las plantas de caña se extrajeron muestras de los suelos (0-20cm de profundidad) para el análisis químico (Laboratorio de Suelos, IECA-UNCIEP, Facultad de Ciencias). En el cuadro 2 se presentan el análisis de suelos extraídos de los tablones muestreados (cuadro 1).

Cuadro 2.- Análisis químico de los suelos en los tablones en donde se colectaron las plantas de caña.

Tablón	pH (H ₂ O)	pH (KCl)	C. org (%)	N (%)	N-NO ₃ (µg N/g)	N-NH ₄ (µg N/g)	% Sat. Bases
1 y 2	6,0	5,2	1,7	0,2	35,8	63,7	80,8
3	5,7	4,9	1,1	0,1	16,1	8,6	83,8
4	6,1	4,8	0,7	0,1	2,1	2,3	79,4
6, 7 y 10	8,3	7,0	0,9	0,1	2,7	3,6	94,8
8	6,5	5,2	1,4	0,1	3,4	6,6	88,8
Tablón	Bray I (µg P/g)	Ca (meq/100g)	Mg (meq/100g)	K (meq/100g)	Na (meq/100g)	Fe (meq/100g)	S-SO ₄ (µg S/g)
1 y 2	8,0	12,6	3,0	0,3	0,3	105,2	3,9
3	5,1	12,3	3,2	0,2	0,4	68,3	0,7
4	5,5	6,9	1,2	0,1	0,2	103,7	1,2
6, 7 y 10	5,3	9,8	2,5	0,1	0,4	13,1	0,7
8	1,0	13,9	4,5	0,2	0,4	129,0	2,2

Los suelos presentan pH entre 5,7 y 6,5 excepto en los de los tablones 6, 7 y 10 cuyo pH 8.3 es alcalino. Los suelos son de media fertilidad con % C orgánico entre 0.7% y 1.7%, mientras que el 1 y 2 tienen de media a alta fertilidad, con valores altos de N-NO₃ y N-NH₄ y de % de saturación de bases, indicadores de fertilización.

1.2. Técnicas isotópicas con ¹⁵N

Se realizaron 2 evaluaciones para determinar si la fijación biológica de nitrógeno (FBN) contribuye a la nutrición nitrogenada de caña. Una evaluación se realizó directamente en condiciones naturales de cultivos con la técnica de abundancia natural de ¹⁵N. La otra evaluación se realizó en un ensayo en macetas con suelo en invernáculo aplicando la técnica de dilución isotópica de ¹⁵N.

1.2.1 Abundancia natural de ¹⁵N

Para la aplicación de la técnica de abundancia natural ¹⁵N (AN) en campo se siguió los lineamientos de Uncovich y col. (2008). Se extrajeron 8 plantas al azar de caña de cada tablón, desde el 2 al 9, para la determinación de AN (cuadro 1) y de cada planta se

extrajeron 5 hojas de la parte superior. El muestreo de cañas se realizó antes de la cosecha del cultivo. En paralelo, se extrajeron de cada tablón o de lugares cercanos, plantas para utilizarlas como “controles” en la metodología de AN. Para esto, se eligieron plantas con porte y ciclo similar al de la caña, a las cuales se les extrajo una muestra de 10 hojas de cada una. Las muestras de caña y de las especies control se acondicionaron y transportaron al laboratorio para su análisis. Algunas de las plantas controles fueron identificadas por el departamento de Botánica, Facultad de Agronomía, UDELAR. En el tablón 3 la planta control no fue identificada pero no era maleza, mientras que en el tablón 2 y 4 eran malezas y no fueron identificadas. En el tablón 8 se obtuvieron plantas de sorgo y en un campo próximo al tablón 2, se obtuvieron tres ejemplares de *Ciperaceae*. Del tablón 7 también se extrajo una planta leguminosa, identificada como *Crotalaria*, nodulada y utilizada como planta control fijadora de N₂.

Las muestras se secaron a 65° C hasta peso constante, se molieron (Molino Foss Cyclotec 1093) finamente (2mm) y una submuestra (0,5g) de cada una se colocó en tubos Eppendorf para determinación de $\delta^{15}\text{N}$, Laboratorio CATNAS de la Facultad de Agronomía, Udelar. No se realizaron repeticiones debido al costo de cada análisis. Se calculó el %Nda (porcentaje de N derivado de la atmósfera) para las muestras de caña por la fórmula (Bergersen y Turner, 1983):

$$\%Nda = \frac{\delta^{15}\text{N control} - \delta^{15}\text{N caña}}{\delta^{15}\text{N control} - B} \times 100$$

donde, $\delta^{15}\text{N control}$ y $\delta^{15}\text{N caña}$ corresponden a los valores de $\delta^{15}\text{N}$ (%) para las plantas control y las plantas de caña respectivamente. El valor B es el $\delta^{15}\text{N}$ de la planta de caña que crece con N₂ atmosférico como única fuente de N y por lo tanto se asume un valor de 0.0 $\delta^{15}\text{N}$ (Uncovich y col., 2008)

1.2.2 Dilución isotópica de ^{15}N

En un ensayo complementario al anterior se utilizó la técnica de dilución isotópica de ^{15}N (DI) (Uncovich y col., 2008) para determinar y corroborar en invernáculo, el aporte de la FBN a la nutrición nitrogenada de 3 variedades comerciales de caña, TUC 77-42, CP 92-618 y LCP 85-384 y con 2 dosis de fertilizante nitrogenado, 10Kg N/ha y 50Kg N/ha.

Para esto, se utilizaron macetas de plástico con 7kg de arena:suelo (mezcla 1:1). El suelo (0-40 cm profundidad) fue extraído de la zona experimental de ALUR, (S30°23'01,3''; W57°38'31.2''), sitio sin cultivo de caña por 4 años. El suelo fue secado, molido y tamizado antes de utilizarlo, enviándose una muestra de 500g para el análisis fisicoquímico (Laboratorio de Suelos, IECA-UNCIEP, Facultad de Ciencias). La arena de río fue lavada con agua corriente y esterilizada en autoclave 2 veces por 30' a 120°C. Luego se mezcló con el suelo y se llenaron las macetas por peso. Siguiendo las recomendaciones de la bibliografía (Dr. G. Hardanson, Agencia Internacional de Energía Atómica, IAEA en inglés; James, 2000), la incorporación de las 2 dosis de fertilizante nitrogenado marcado se realizó dos meses antes de la siembra de manera de asegurar una distribución homogénea del ^{15}N en el soporte. Las macetas fueron regadas con soluciones preparadas de $^{15}\text{NH}_4\text{SO}_4$ marcado con 10% átomos en exceso de ^{15}N (% a.e. ^{15}N); equivalente a 10kg de N/ha y a 50Kg de N/ha. Los esquejes, obtenidos de ALUR, fueron lavados con agua corriente y desinfectados superficialmente con EtOH 70%. En cada maceta se colocaron dos esquejes de caña de 5cm de longitud con una yema cada uno. Como plantas controles se utilizaron variedades comerciales de sorgo (*Sorghum officinalis* L. DK-71-T) y maíz (*Zea mays* L. NK940). Se eligieron estas especies debido a que producen un volumen similar de raíces en macetas y tienen características fisiológicas semejantes a la caña de azúcar. Se sembraron en el momento de la siembra de los esquejes y previamente sus semillas se lavaron cuidadosamente y se trataron superficialmente con hipoclorito 5% por 5', seguido de 6 lavados con agua destilada estéril en condiciones de asepsia.

En este experimento se evaluaron 10 tratamientos: las tres variedades comerciales de caña en dos niveles de fertilización nitrogenada y dos plantas control en los dos niveles de fertilización nitrogenada.

El diseño fue de bloques completos al azar, con 5 repeticiones por tratamiento y una planta por maceta. Las macetas se colocaron en el cuarto de plantas del IIBCE en condiciones de luz y temperatura controladas (fotoperíodo de 12h, 30°C y entre 5750-6700 luxes), transfiriéndolas al invernáculo cuando las plántulas tenían 30cm de altura aproximadamente. El riego se realizó siempre en el plato inferior de las macetas, con agua corriente según necesidades de las plantas y una vez por semana con medio Fahraeus (Fahraeus, 1957). La cosecha de las plantas se realizó 4 meses después de la siembra, separándose la raíz, la parte aérea (tallo + hojas) y la hoja +3 de cada planta. Cada fracción se colocó en bolsas de papel para su secado en horno a 65°C hasta peso constante. Posteriormente, se determinó el peso seco de la parte aérea y de la raíz por separado. Por último, la hoja +3 y la parte aérea de las plantas se molieron, como se describió anteriormente, para determinar el N-total (%) y el % a.e. ^{15}N por espectrometría de masa (VG Prism Series II; Universidad Autónoma de Madrid).

Se calculó la concentración de N en las plantas (mg N/g peso seco), la acumulación de N (mg N/ planta) y el %Nda (porcentaje de N derivado de la atmósfera) para la caña por medio de la fórmula (McAuliffe y col., 1958):

$$\%Nda = 1 - (\% \text{ a.e. } ^{15}\text{N caña} / \% \text{ a.e. } ^{15}\text{N control}) \times 100$$

donde, % a.e. $^{15}\text{N control}$ y % a.e. $^{15}\text{N caña}$ son las unidades de % a.e. ^{15}N para las plantas controles y las de caña respectivamente.

Con los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias empleando el test de LSD-Fisher ($\alpha \leq 0.05$) (Infostat, 2008).

2. RESULTADOS

2.1 Fijación de nitrógeno en cultivos de caña en campo

El primer objetivo de este trabajo fue conocer si existe un aporte de N atmosférico a la caña de azúcar en condiciones de campo. La evaluación se realizó por el método de abundancia natural ^{15}N (AN), utilizando especies control elegidas dentro de los cultivos de caña estudiados. En el cuadro 3 se muestran los valores de %Nda obtenidos en las variedades de caña.

Cuadro 3.- Capacidad de fijar nitrógeno en ensayo en campo con variedades de caña de azúcar comerciales y niveles de fertilización nitrogenada, método de abundancia natural de ^{15}N (Artigas, Bella Unión).

Variedad de caña	FN	$\delta^{15}\text{N}$ caña	Planta control	$\delta^{15}\text{N}$ control	%Nda caña (1)	%Nda caña (2)
TUC 77-42	AF	5,72	No maleza	5,7	26,77	41,66
LCP 85-384	AF	7,84	No maleza	7,3	-----	20,03
CP 92-618	n.d.	6,07	No maleza	5,97	22,31	38,11
TUC 77-42	SF	2,99	Maleza	4,5	61,74	69,52
TUC 77-42	BF	6,57	Maleza	14,7	15,86	32,97
LCP 85-384	BF	6,02	<i>Cyperaceae</i>	5,8	22,88	38,56
FAM 81-77	n.d.	7,83	<i>Cyperaceae</i>	10,7	-----	20,15
TUC 95-24	n.d.	8,46	<i>Cyperaceae</i>	1,9*	-----	13,67
			Sorgo	9,8		
			<i>Crotalaria</i>	0,2*		

n=1 FN: Fertilización nitrogenada: 150Kg N/ha (AF), 50Kg N/ha (BF), sin fertilizar (SF). n.i.: no identificado. $\delta^{15}\text{N}$: relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ en biomasa aérea. %Nda: porcentaje de N derivado de la atmósfera. (1) calculado con el promedio de $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas control (excepto sorgo y plantas marcadas con asterisco). (2) calculado con el valor de $\delta^{15}\text{N}$ del sorgo como planta control.

En el cuadro 3, se observa que los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en la biomasa aérea de las 4 variedades de caña fue homogéneo, entre 5,72 y 8,46, excepto para el cultivo TUC 77-42 (SF) que fue de 2,99. Por el contrario, la biomasa aérea de las plantas control, malezas, no malezas y ejemplares de *Cyperaceae*, mostraron alta variabilidad entre 4,5 y 14,7 de

$\delta^{15}\text{N}$ (cuadro 3). Es de destacar el $\delta^{15}\text{N}$ igual a 0,2 de *Crotalaria*, leguminosa nodulada con el más bajo valor de $\delta^{15}\text{N}$ comparado con las otras plantas control (cuadro 3). El género *Crotalaria* está presente en forma espontánea en la zona de caña de ALUR, nodulado por poblaciones de rizobios nativos en los suelos. En este trabajo se la eligió como control positivo y aparentemente es una buena fijadora de N_2 si se tiene en cuenta el bajo valor de $\delta^{15}\text{N}$ (cuadro3). De esta manera se verificó la utilidad de la técnica aplicada en condiciones no controladas.

El %Nda en caña fue calculado con los valores promedio de la mayoría de las plantas control, obteniendo que en promedio los cultivos en campo reciben un 22% del N de la fijación biológica (no incluido el valor de TUC 77-42- SF). El suelo y/o la fertilización nitrogenada aportarían la otra fracción de N para el cultivo.

El %Nda de caña también se calculó con el valor de $\delta^{15}\text{N}$ de la biomasa aérea del sorgo, cultivo situado en frente al de caña (distancia menor a 30m). El sorgo es un cultivo control útil, es una gramínea con similares características radicales y de porte aéreo y de ciclo vegetativo similar.

Al utilizar al sorgo como planta control, los valores de %Nda oscilaron entre 13% y 41% (no se incluye el valor de TUC 77-42 (SF)) demostrando nuevamente que en condiciones de campo las plantas de caña reciben una parte de su N de la FBN. La variedad TUC 77-42 (SF) dio un valor alto de %Nda con ambos tipos de plantas control, lo cual indicaría que esa variedad sin fertilización nitrogenada, toma gran parte de su N de la atmósfera. Sin embargo, en las plantas de caña con una fertilización nitrogenada equivalente a 50 y 150 Kg N/ha, no se encontró una relación con el valor de %Nda de las muestras (cuadro 3).

Por otra parte, los resultados son estimativos ya que el número de muestras de $\delta^{15}\text{N}$ no fueron suficientes para el análisis estadístico de los datos del cuadro 3. Sin embargo, los

datos son de interés si se tiene en cuenta que es la primera vez que en el país se demuestra FBN en cultivos de caña.

2.2. Dilución isotópica de ^{15}N .

Los resultados de AN en campo condujeron a corroborar en un ensayo en invernáculo con suelo (no estéril) la FBN en tres variedades de caña, TUC 77-42, CP 92-618 y LCP 85-384 y dos niveles de fertilización nitrogenada, 10Kg N/ha y 50Kg N/ha (F10 y F50) respectivamente. Teniendo en cuenta los datos obtenidos en el ensayo de AN y la bibliografía, se eligió como plantas control maíz y sorgo para el método de dilución isotópica de ^{15}N (DI).

Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 4. Los valores del % a.e. ^{15}N de la parte aérea para F10, fueron similares en las tres variedades de caña pero significativamente inferiores a los valores de % a.e. ^{15}N de maíz y sorgo. Con respecto a F50, se observaron diferencias significativas entre las variedades TUC 77-42 y LCP 85-384, pero ambos valores fueron significativamente más bajos que los de las plantas control. Los valores registrados de % a.e. ^{15}N de la hoja +3 no mostraron diferencias significativas entre las variedades de caña para ambos niveles de fertilización y fueron similares a los obtenidos de la parte aérea de las plantas (cuadro 4).

Al calcular el %Nda de la parte aérea de las cañas para F10 y F50 utilizando al maíz y sorgo como plantas control por separado, no se encontraron, en ambos casos, diferencias significativas entre los valores. Los valores obtenidos sugieren que las 3 variedades de caña de azúcar estudiadas adquieren entre el 41-59% y 35-50% del N a través de la FBN para F10 y F50 respectivamente. Estos resultados indican que las 3 variedades de caña de azúcar estudiadas obtienen un porcentaje del N a través de la FBN tal como se demostró por AN en el cuadro 3.

Al comparar el peso seco de la parte aérea para F10 y F50, se puede observar que no hubo diferencias significativas entre las variedades de caña exceptuando la CP 92-618 que tuvo un valor inferior (cuadro 4).

Por otro lado, en la concentración de N de la parte aérea para F10, la variedad CP 92-618 fue significativamente mayor al maíz y sorgo, mientras que para F50 las variedades TUC 77-42 y LCP 85-384 tuvieron valores similares a los controles.

También se evidenció para F10, que entre las tres variedades de caña acumularon casi el triple de N (563,7mgN/planta) que lo acumulado entre las dos plantas control (198,5mg N/planta). Mientras que para F50, la acumulación de N entre las dos variedades de caña fue una vez y media superior (393mg N/planta) que lo acumulado entre el maíz y sorgo juntos (248,2mg N/planta).

Cuadro 4.- Evaluación de la capacidad de fijar nitrógeno de tres variedades de caña utilizadas comercialmente en Uruguay, bajo dos niveles de fertilización nitrogenada, utilizando dilución isotópica de ^{15}N en condiciones semicontroladas (invernáculo).

Cultivo	% a.e. ^{15}N		%Nda (M) ^a parte aérea	%Nda (S) ^b parte aérea	Peso seco parte aérea (g/planta)	Concentración de N parte aérea (mg N/g peso seco)	Acumulación de N parte aérea (mg N/planta)
	Parte aérea	Hoja +3					
F10							
CP 92-618	0,17 c	0,17 a	50,3 a	58,8 a	19,39 b	10,4 a	201,6 a
TUC 77-42	0,23 c	0,20 a	41,3 a	51,4 a	25,36 a	7,8 b	197,8 a
LCP 85-384	0,19 c	0,20 a	51,6 a	51,6 a	25,68 a	6,4 bc	164,3 b
Maíz	0,39 b	-	-	-	20,56	3,9 c	80,2 b
Sorgo	0,47 a	-	-	-	27,52	4,3 c	118,3 b
F50							
CP 92-618	-	-	-	-	-	-	-
TUC 77-42	1,33 b	1,11 a	34,8 a	44,3 a	26,86 a	7,5 a	201,4 a
LCP 85-384	0,99 c	1,06 a	41,2 a	49,7 a	24,88 a	7,7 a	191,6 a
Maíz	1,69 a	-	-	-	18,52	5,0 b	92,6 b
Sorgo	1,97 a	-	-	-	23,25	6,7 ab	155,8 a

F10: eq. a 10Kg N/ha; F50: eq. a 50 Kg N/ha. a: % de N derivado de la atmósfera calculado con maíz (M) como planta control; b: calculado con sorgo (S) como planta control. n=3. Medidas dentro de cada columna que tienen la misma letra no son significativamente diferentes (LSD-Fisher ($\alpha \leq 0,05$)).

3. DISCUSIÓN

En las últimas décadas se demostró que la FBN se lleva a cabo en gramíneas (Boddey y col., 2000) incluyendo la caña de azúcar (Yoneyama y col., 1997; Urquiaga y col., 1992; Lima y col., 1987). Particularmente en Brasil, la caña fertilizada con bajas cantidades de N ha logrado rendimientos similares a los obtenidos en cultivos fertilizados con altas dosis de N (Boddey y col., 1995), sin detectarse una disminución de este elemento en los suelos. De esa observación práctica surgió, desde el punto de vista microbiológico, la suposición de que en la caña de azúcar cultivada en Brasil ocurriría un aporte de N por la FBN (Baldani y col., 2002, 1997; Boddey y col., 1995), dando origen a todas las investigaciones en microorganismos diazótrofos de la rizósfera y endófitos que han sucedido en el mundo.

En el inicio de esta tesis, se tuvo en cuenta la trascendencia económica y ecológica que tendría para el cultivo de caña el desarrollo de una tecnología que redujera el N químico que anualmente se añade para mantener e incrementar su productividad. Para ello, una de las formas accesibles y documentadas en la bibliografía, es estudiar las bacterias endófitas diazótroficas (BED) que viven en asociación con la planta, tratando de detectar y seleccionar aquellas con mayor capacidad de promoción de crecimiento vegetal (PCV). Un primer avance en la tesis fue la comprobación, por abundancia natural de ^{15}N (AN), de que en los cultivos comerciales la caña recibe un aporte de la FBN, aptitud no evaluada hasta ese momento en nuestro país. La comprobación se obtuvo cuando se consiguieron valores promedio de 33% de FBN para las variedades evaluadas (no incluido el valor de TUC 77-42 (SF)) y de hasta un 70% para la variedad TUC 77-42 (SF). Estos resultados demuestran que las plantas de caña con o sin fertilizante nitrogenado obtienen de la atmósfera gran parte del N que necesitan. En las variedades de caña, no se obtuvo una relación entre %Nda en la parte aérea y los niveles de N previamente aplicados al suelo (50 y 150 Kg N/ha). Sin embargo, en la bibliografía existen numerosos antecedentes sobre la influencia negativa de la fertilización nitrogenada y la capacidad de fijar N_2 por el cultivo (Sevilla y Kennedy, 1999; Sevilla y col., 1998).

Es importante destacar que nuestros resultados se ajustan a los obtenidos por Boddey y col. (2001), quienes en 11 plantaciones de caña de cuatro Estados de Brasil, encontraron valores de %Nda entre 0 y 70% por AN, demostrando el aporte significativo de la FBN. Posteriormente, un estudio a largo plazo (16 años) realizado en la variedad de caña CB 45-3 en una plantación en el Estado de Pernambuco, nordeste de Brasil, también demostró un balance positivo de N en los tratamientos que no recibieron fertilizante nitrogenado, confirmando la contribución significativa de la BNF al cultivo de caña (Resende y col., 2006). Sin embargo, llama la atención que en Australia (Biggs y col., 2002) y Sudáfrica (Hoefsloot y col., 2005), los datos de AN en plantas de referencia (no fijadoras de N₂) fueron en algunos casos mayor a los de caña de azúcar y por lo tanto los autores concluyeron que los aportes de la FBN al cultivo fueron insignificantes.

Se ha sugerido que las bacterias endófitas de la caña de azúcar contribuyen de manera más significativa que las rizosféricas en el proceso de FBN (Döbereiner, 1992), ya que este tipo de bacterias podrían escapar a los efectos adversos del suelo, así como a la competencia con otros microorganismos y podrían recibir de una forma más directa los nutrientes necesarios para su multiplicación y para la expresión de la FBN. Se han aislado de la caña muchas bacterias de la rizósfera y endófitas, pero no está bien definido cuál de ellas contribuiría con la mayor tasa de FBN (Asis y col., 2000; Olivares y col., 1996; Cavalcante y Döbereiner, 1988; Ruschel, 1981). En los primeros estudios realizados en Brasil en bacterias fijadoras de N₂, el género *Beijerinckia* se destacó por su presencia en suelos de caña (Döbereiner, 1961). Un alto número de *G. diazotrophicus* (Reis y col., 2000a, 1994; Li y Macrae, 1992) y otros diazótrofos de los géneros *Herbaspirillum* y *Burkholderia* se detectaron en el interior de las raíces de caña, tallos e incluso hojas (Castro-González y col., 2011; Perin y col., 2006; Boddey y col., 2003; James 2000). En Brasil, durante mucho tiempo se pensó que la bacteria *G. diazotrophicus* podría ser una de las especies que más contribuye con la tasa de FBN observada en caña (James, 2000; Sevilla y Kennedy, 2000; Boddey y col., 1995; Cavalcante y Döbereiner, 1988). Esto se asocia a que en experimentos *in vitro*, la bacteria crece y fija N₂ óptimamente en condiciones de acidez y concentraciones de sacarosa similares a las encontradas en el interior de los fluidos de caña. Se sugirió

también que *G. diazotrophicus* podría promover y aumentar el crecimiento de la caña de azúcar a través de efectos hormonales (Fuentes-Ramírez y col., 1993) debido a su capacidad de producir ácido indol acético (IAA) y giberelinas (Bastian y col., 1998; Fuentes-Ramírez y col., 1993). Usando plantas de caña de azúcar micropropagadas (libres de bacterias) mediante técnicas de cultivo de tejidos, ha sido posible comprobar que *G. diazotrophicus* es capaz de colonizar distintos tejidos de las plantas y estimular su crecimiento (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003; Sevilla y col., 2001), predominantemente por mecanismos de tipo hormonal (Sevilla y col., 2001). También influye el genotipo bacteriano y la variedad de caña de azúcar (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado, 2003).

La técnica de AN también ha sido utilizada para estimar la FBN en otras gramíneas, como el arroz (Muñiz y col., 2010) y algunas leguminosas como *Trifolium subterraneum*, *Ornithopus compressus*, *T. vesiculosum* y *T. incarnatum* (Espinoza y col., 2011). En este trabajo, la metodología fue útil para poder tener una primera aproximación del aporte de N mediante la FBN que tienen diferentes variedades de caña cultivadas en condiciones ambientales del norte de nuestro país.

Una vez determinado el aporte de la FBN por AN, el siguiente paso fue utilizar la técnica de dilución isotópica de ^{15}N (DI) en tres variedades de caña para corroborar su FBN en suelo de Bella Unión en invernáculo. Como tratamientos adicionales se usaron dosis de fertilizante nitrogenado (F10 y F50, equivalente a 10 y 50 kg N/ha respectivamente) y como controles maíz y sorgo. Estos últimos presentan características similares a la caña en absorción de N del suelo, etapas de desarrollo fisiológico y tolerancia a factores ambientales (Uncovich y col. 2008; Biggs y col. 2002; Urquiaga y col. 1992). Al igual que en campo, los resultados evidenciaron un aporte significativo de la FBN a las variedades de caña, independientemente de que la planta control fuera sorgo o maíz. Hubo también fijación de N_2 con baja y mediana fertilización nitrogenada. Es importante destacar que los resultados del aporte de la FBN obtenidos por la técnica DI son

contundentes, si tomamos en cuenta que en el ensayo se utilizó suelo y esquejes de variedades de cañas plantadas en campos de Bella Unión.

Los resultados concuerdan con la bibliografía en cuanto a que la técnica de DI es útil en evaluar la contribución de la fijación de N_2 en los cultivos de gramíneas, incluyendo la caña de azúcar en ensayos en campo y en invernáculo (Thaweenut y col., 2011; Montañez y col., 2009; Urquiaga y col., 1992).

Un estudio realizado en EMBRAPA-Agrobiología (Brasil) para cuantificar la FBN en variedades de caña brasileras, utilizó esa técnica en grandes macetas con suelo marcado con ^{15}N (Urquiaga y col., 1992; Lima y col. 1987). Los resultados mostraron que las variedades de caña tenían más bajo enriquecimiento de ^{15}N , alta acumulación de N y alto balance de N en el sistema suelo/planta que la planta control, generando una poderosa evidencia de la contribución de la FBN a esas variedades de caña.

Si bien la técnica de DI resulta útil en este tipo de ensayos, cabe señalar que es necesario tomar precauciones antes y durante el ensayo para evitar obtener valores de % a.e ^{15}N erróneos. Existen varios factores que pueden afectar la exactitud de los resultados. Uno de ellos es tratar de que la relación $^{15}N/^{14}N$, una vez aplicado el fertilizante enriquecido en ^{15}N en las macetas, se mantenga homogénea en profundidad del suelo y en el tiempo. En el ensayo realizado se esperaron 2 meses antes de la siembra y se revolvió el suelo, lo cual permite asumir homogeneidad de la relación isotópica en el suelo. Sin embargo autores como Urquiaga y col. (1992) y Boddey y Victoria (1986) opinan que se debería esperar 6 meses para lograr estabilizar las condiciones del suelo ($^{15}N/^{14}N$). Nuestra propia experiencia da origen a otro factor que debe ser considerado como es la diferencia de tiempo entre la germinación de los esquejes de caña y las semillas de sorgo y maíz. La consiguiente absorción retardada del fertilizante enriquecido por parte de las cañas podría inducir a pensar que sería responsable del enriquecimiento inferior de ^{15}N en comparación a los cultivos control. Sin embargo, todo indica que ese factor no tuvo efecto en el ensayo realizado, si se tiene en cuenta la evidencia con respecto a la acumulación de N en la parte aérea de las plantas de caña comparado con la de maíz y sorgo. Se confirma la hipótesis de que gran parte del N acumulado por las variedades de caña deriva de la FBN.

Cabe destacar además que las variedades de caña plantadas en Uruguay demostraron una tendencia hacia una mayor contribución de la FBN en el nivel más bajo de fertilización nitrogenada, con una media de 51% y 42% Nda en F10 y F50, respectivamente. Estos resultados podrían explicarse en parte por un efecto negativo del fertilizante nitrogenado en la FBN aún cuando una dosis de 50kg de N/ha no es alta para la caña.

Por otra parte, se ha demostrado en variedades de caña de azúcar brasilera que las aplicaciones de elevados niveles de fertilizante nitrogenado, reduce significativamente la población de bacterias diazótrofes cultivables (Reis-Junior y col., 2000). Nuestros resultados evidencian que independientemente del nivel de fertilizante, las tres variedades de caña presentan un valor medio de 48% Nda (rango de 34,8 a 58,8% Nda). Estas estimaciones de BNF son consistentes con los datos reportados en la literatura, en particular de Brasil (Urquiaga y col., 2011, 1992; Boddey y col., 2001.).

En este capítulo, los resultados mostraron que la variedad TUC 77-42 fue la que presentó mayor valor de Nda (70%) por AN, mientras que por DI las variedades CP 92-618 y LCP 85-384 mostraron el valor mas alto en F10 (60%Nda) y F50 (50%Nda) respectivamente. El hecho que las variedades no hayan evidenciado la misma respuesta en ambos ensayos podría ser adjudicado a dos factores: las diferentes condiciones ambientales que afectan en campo e invernáculo (semi-controladas) y el desarrollo radical de la planta, donde en campo puede explorar horizontes libremente, mientras que en invernáculo está limitado al tamaño de la maceta. Para corregir estos factores podría emplearse la técnica de DI en un ensayo en campo, aplicando en el suelo el fertilizante nitrogenado marcado con ¹⁵N. Sin embargo, la realización de un ensayo de estas características implicaría un elevado costo.

En resumen, los resultados de este capítulo sientan un importante precedente en el cultivo de caña en Uruguay: ocurre un significativo aporte de la FBN a las variedades de caña de azúcar comerciales en campo y en invernáculo.

CAPITULO 2

Caracterización de bacterias endófitas diazótrofes asociadas a variedades comerciales de caña de azúcar.

1. METODOLOGÍA

1.1 Aislamiento de bacterias endófitas diazótrofes de caña y su clasificación en morfotipos

El objetivo fue aislar bacterias endófitas diazótrofes (BED) de los tejidos internos de tallos de cañas en variedades comerciales cultivadas en Bella Unión y formar una colección de trabajo para su caracterización. Cabe destacar, que aunque en esta tesis las bacterias aisladas se nombrarán como endófitas, en realidad son “probables” endófitas, porque no se corroboró microscópicamente su presencia en los tejidos vegetales (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998).

Para el aislamiento se utilizaron plantas de 3 variedades de caña, TUC 77-42 y LCP 85-384, elegidas por su mayor área de siembra (80% en el caso de TUC 77-42) y Tuc 78-14 por estar en proceso de evaluación en el campo experimental de ALUR. Las mismas fueron colectadas de los cultivos en los tablonos 1, 3, 6, 7 y 10, con alta 150Kg N/ha (AF) y baja 50Kg N/ha (BF) fertilización nitrogenada (descritos en el Capítulo 1, cuadro 1).

Los tallos se lavaron con agua corriente y se cortaron cuidadosamente con bisturí en trozos de 5cm de largo, se desinfectaron superficialmente con EtOH 70% y con hipoclorito 4% durante 3', enjuagándose 5 veces con agua destilada estéril en condiciones asépticas (Hallmann y col., 2006). Como control de la eficacia del proceso de esterilización superficial se deslizaron trozos de tallos procesados sobre la superficie de medio rico TY (Beringer, 1974) (anexo 1) contenido en placas y se incubaron a 30°C por 48h.

En adelante, los medios de cultivo y las soluciones utilizadas se esterilizaron siempre en autoclave por 20' a 120°C.

El aislamiento de bacterias se realizó a partir del fluido apoplástico de tallos de caña. Para esto, se cortaron y desecharon los extremos de cada trozo de tallo y este se colocó en tubo de ensayo estéril con un tip de 1ml para facilitar la extracción de la muestra (Dong y col., 1994; Palus y col., 1996). El sistema material se centrifugó a 1500 rpm por 20' y con el fluido obtenido se prepararon diluciones seriadas (10^{-2} a 10^{-7}) en solución salina estéril, sembrándose 500µl de cada dilución (por duplicado) por inclusión en placas conteniendo medios semisólidos selectivos sin-N (JNFb y LGI) (Cavalcante y Dobereiner, 1988; Baldani y col., 1992) (anexo 1) y en medio rico TY. Las placas se incubaron a 30°C y se registraron las unidades formadoras de colonias (ufc) por mililitro de apoplasto. Con palillos estériles se realizaron 3 repiques sucesivos de las colonias incluidas en el agar a placas conteniendo los medios semisólidos sin-N ensayados originales. Este procedimiento se realizó para verificar el carácter diazótrofo de las bacterias. Las bacterias se sembraron en medio TY sólido para obtener colonias aisladas y corroborar su pureza. Cada aislamiento puro se guardó por triplicado con glicerol estéril (50% v/v) a -20 y -80°C.

La colección formada se clasificó de acuerdo a los morfotipos de sus colonias en medio sólido TY: color, forma (circular ó irregular), elevación (plana ó convexa), margen (entero, ondulado ó ondulado con halo) y textura (seca ó gomosa) (Holt y col., 1994).

1.2 Presencia del gen *nifH* y formación de una película de crecimiento en medios semisólidos sin nitrógeno

La presencia del gen *nifH* (gen estructural de la nitrogenasa) se determinó en 100 BED elegidas de acuerdo a su clasificación en diferentes morfotipos. El potencial diazótrofo se validó por formación de un halo de crecimiento en viales conteniendo medios semisólidos sin-N.

1.2.1 Lisado celular y amplificación del gen *nifH* por PCR

Una colonia de cada una de las bacterias seleccionadas crecidas en medio TY se resuspendió en 100µl de agua destilada estéril y se centrifugó a 13000 rpm por 2'. El pellet obtenido se resuspendió en 100µl de NaOH 0.05M, se calentó a 100°C por 4' y se colocó en hielo por 2'. Posteriormente, se agregó 900µl de agua destilada estéril y se centrifugó a 13000 rpm por 2'. Como solución de trabajo, se guardaron 700µl del sobrenadante a -20°C (Rivas y col., 2001).

Para la amplificación del gen *nifH* se usaron los cebadores *nifHFwd* (5'-ATYGTCCGGYTGAYCCSAARGC-3') y *nifHRev* (5'-ATGGTGTGGCGGCRTAVAKSGCC-3') descritos por Olson y col. (1998) que amplifican una región del gen *nifH* de 327pb de diazotrofos aerófilos y microaerófilos. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 10µl con 1,0µl de buffer 10X de PCR, 1,0µl de MgCl₂ 25mM, 0,2µl de una mezcla de deoxi-nucleótido trifosfatos (dNTPs) 10mM, 1,6µl de cada cebador 10µM, 1µl de BSA 0,1%, 0,08µl de Taq polimerasa (Fermentas) 5U/µl y 1,0µl del lisado celular. El programa utilizado para la reacción de amplificación fue: desnaturalización inicial por 5' a 94°C, seguido de 5 ciclos de 30'' a 94°C, 30'' a 50°C y 30'' a 72°C, una segunda etapa de 30 ciclos de 30'' a 94°C, 30'' a 49°C y 30'' a 72°C y un ciclo de extensión final de 10' a 72°C.

El producto de cada amplificación se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 2% (p/v) en buffer TBE 0,5% (Tris-Ácido bórico-EDTA) (anexo 1) sometido a 110V. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y expuestos a la luz UV para su visualización.

1.2.2 Formación de película y cambio de pH de medios semisólidos

Como complemento de la información sobre el potencial diazotrófico de los aislamientos *nifH* positivos, se evaluó la formación de una película de crecimiento en viales conteniendo medio semisólido (Videira y col., 2007). Las bacterias provenientes de placas con medio TY sólido, se sembraron en tubos con 5ml de TY líquido en agitación. Una alícuota de 200µl se utilizó para inocular los viales por triplicado

conteniendo el medio semisólido sin-N del cual se aisló la bacteria (JNFb y LGI). Se registró la formación de la película de crecimiento, así como el cambio de pH mediante un indicador en el medio.

1.3 Diversidad genética e identificación de los aislamientos bacterianos

1.3.1 Determinación de la diversidad genética por ERIC-PCR

La diversidad genética de las bacterias *nifH* positivas se estudió mediante la amplificación de regiones consensuales repetitivas extragénicas de ADN por la técnica *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*, denominada ERIC-PCR. Los cebadores utilizados fueron *ERIC1R* (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y *ERIC2* (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (Hulton y col., 1991). Las reacciones se realizaron por duplicado utilizando como moldes los lisados celulares guardados a -20°C (ver 1.2.1). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25µl conteniendo 2,5µl de buffer 10X de PCR, 2,0µl de MgCl₂ 25mM, 2,5µl de una mezcla de deoxi-nucleótido trifosfatos (dNTPs) 2mM, 2,5µl de cada cebador 25µM, 1µl de BSA 0,1%, 0,3µl de Taq polimerasa (Fermentas) 5U/µl y 2,0µl del lisado celular. El programa utilizado para la reacción de amplificación fue: desnaturalización inicial por 5' a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1' a 94°C, 1' a 52°C y 6' a 65°C, por último se realizó un ciclo de extensión final de 10' a 72°C.

Los productos de amplificación obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2% (p/v) en buffer TBE 0,5% (Tris-Ácido bórico-EDTA) sometido a 110V. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y expuestos a la luz UV para su visualización.

1.3.2 Identificación de los aislamientos

Las bacterias *nifH* positivas fueron identificadas mediante el análisis de secuencia del gen *16S ARNr* por PCR. Para la amplificación del gen se usaron los cebadores universales *Eub27f* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y *Eub1525r* (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-

3') (Lane, 1991). Las reacciones de PCR se realizaron utilizando como moldes los lisados celulares guardados a -20°C (ver 1.2.1). La misma se llevó a cabo en un volumen total de 50µl conteniendo 5µl de buffer 10X de PCR, 3µl de MgCl₂ 20mM, 5µl de una mezcla de deoxi-nucleótido trifosfatos (dNTPs) 2mM, 2µl de cada cebador 25µM, 2µl de BSA 0,1%, 0,4µl de Taq polimerasa (Fermentas) 5U/µl y 4,0µl del lisado celular. El programa utilizado para la reacción de amplificación fue: desnaturalización inicial por 2' a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1' a 94°C, 1' a 55°C y 1' a 72°C, por último se realizó un ciclo de extensión final de 15' a 72°C.

Los productos de amplificación se visualizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa 2% (p/v) en buffer TBE 0,5% (Tris-Ácido bórico-EDTA) sometido a 110V. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y expuestos a la luz UV para su visualización.

Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados en MACROGEN Inc. (Corea) a partir de ambos extremos. Las secuencias obtenidas fueron purificadas y empalmadas mediante el programa DNA *Baser Sequence Assembler* v3.x (2010) (www.dnabaser.com). Para obtener el género de las bacterias, las secuencias resultantes se compararon con las disponibles en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando el algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn).

2. RESULTADOS

2.1 Aislamiento de bacterias endófitas diazótrofes de variedades de caña de azúcar

El aislamiento de las bacterias endófitas diazótrofes (BED) se realizó a partir del apoplasto del entrenudo de tallos de caña de azúcar colectados en cultivos de la zona de muestreo (Bella Unión) bajo diferentes niveles de fertilización nitrogenada.

Los resultados del cuadro 1 muestran que todas las variedades contienen en condiciones naturales BED y en altas concentraciones/ml de apoplasto. Cuando no se incluye la fertilización, no hay una diferencia marcada entre las variedades, sin embargo, LCP 85-384 (AF) y TUC 77-42 (BF) tuvieron mayor número de bacterias en el apoplasto. No se observó marcadas diferencias de la población bacteriana entre los medios empleados, JNFb y LGI.

En todos los casos, la población de bacterias en medio TY fue mayor como se esperaba por no ser un medio selectivo. Con respecto a los niveles de fertilización, se observó que para la variedad LCP 85-384 el número de bacterias fue mayor para el nivel más alto de fertilización (AF), mientras que en el caso de la variedad TUC 77-42 el resultado fue inverso, mostrando que las plantas cultivadas en el nivel más bajo de fertilización (BF) tuvieron un número mayor de bacterias en su apoplasto.

Cuadro 1.- Recuento de bacterias endófitas diazótroficas obtenidas de apoplasto de tallo (UFC/ml) de variedades comerciales de caña de azúcar (Bella Unión, Artigas).

Variedad de caña	Nivel de fertilización nitrogenada	Medio de cultivo	UFC/ml de apoplasto
LCP 85-384	AF	TY	$1,9 \times 10^9$
		JNFb	$7,3 \times 10^7$
		LGI	$1,5 \times 10^8$
LCP 85-384	BF	TY	$2,4 \times 10^6$
		JNFb	$2,3 \times 10^5$
		LGI	$3,0 \times 10^5$
TUC 77-42	AF	TY	$1,5 \times 10^8$
		JNFb	$1,6 \times 10^7$
		LGI	$1,2 \times 10^7$
TUC 77-42	BF	TY	$1,0 \times 10^9$
		JNFb	$8,4 \times 10^8$
		LGI	$7,8 \times 10^8$
TUC 78-14	BF	TY	$2,0 \times 10^7$
		JNFb	$1,6 \times 10^6$
		LGI	$4,5 \times 10^6$

AF: alta fertilización nitrogenada, 150Kg N/ha; BF: baja fertilización nitrogenada, 50Kg N/ha. UFC/ml: unidades formadoras de colonia por mililitro de apoplasto

A partir de las bacterias cultivables obtenidas en los dos medios sin-N utilizados, se generó una colección de 371 aislamientos que fueron guardados en forma de suspensión con glicerol 50% a -20 y -80°C por triplicado.

El número de aislamientos obtenidos a partir de cada variedad de caña y en cada uno de los medios de cultivo utilizados, se muestran en el cuadro 2. Aunque no hubo diferencias importantes en el número total, en el medio JNFb con ácido málico, se obtuvo mayor número comparado con el LGI que contiene sacarosa (191 y 180 aislamientos, respectivamente). En la variedad TUC 78-14 fue donde se obtuvo mayor número de aislamientos, seguido por la variedad TUC 77-42 y por último la LCP 85-384. Los aislamientos obtenidos fueron levemente más altos en las plantas con un nivel de fertilización nitrogenada baja.

Cuadro 2.- Número de los aislamientos endófitos diazótrofes totales obtenidos por variedad de caña, nivel de fertilización nitrogenada y medio de cultivo.

Variedad de caña	Nivel de fertilización nitrogenada	Medios de cultivo		Sub-total
		LGI	JNFb	
TUC 78-14	BF	37	50	87
TUC 77-42	BF	41	40	81
LCP 85-384	BF	37	40	77
TUC 77-42	AF	43	32	75
LCP 85-384	AF	22	29	51
Sub-total		180	191	371

AF: alta fertilización nitrogenada, 150Kg N/ha; BF: baja fertilización nitrogenada, 50Kg N/ha.

En el gráfico 1 se muestra el número de aislamientos bacterianos por variedad de caña obtenidos en los dos medios de cultivo. Se puede observar que para la variedad TUC 78-14 (BF) y LCP 85-384 (BF y AF), la mayoría de los aislamientos fueron obtenidos en el medio JNFb, mientras que para la variedad TUC 77-42 (BF y AF), la mayoría de los aislamientos se obtuvieron en medio LGI. Esto podría indicar que las bacterias endófitas

de la variedad TUC 77-42 utilizarían preferentemente sacarosa como fuente de carbono, mientras que las bacterias endófitas de las variedades LCP 85-384 y TUC 78-14, crecen mejor en ácido málico.

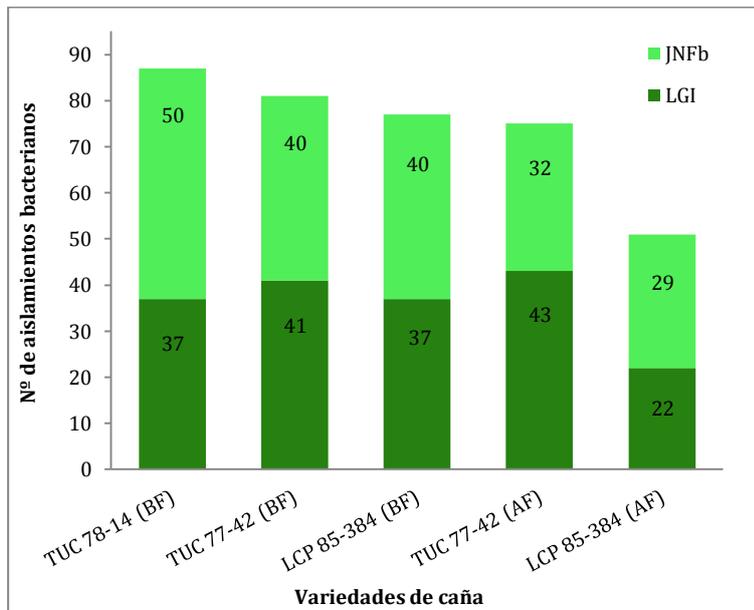


Gráfico 1.- Número de aislamientos bacterianos por variedad de caña obtenidos en los dos medios de cultivos (JNFb y LGI). AF: alta fertilización nitrogenada, 150Kg N/ha; BF: baja fertilización nitrogenada, 50Kg

A su vez, en el gráfico 2 se puede observar que los aislamientos bacterianos obtenidos en el medio JNFb corresponden en su mayoría a la variedad TUC 78-14 (BF) (50), mientras que en LGI corresponden a la variedad TUC 77-42 (AF) (43). El menor número de aislamientos obtenidos en los dos medios correspondió a la variedad LCP 85-384 (AF), quien fue justamente la variedad de donde se aisló el número más bajo de bacterias.

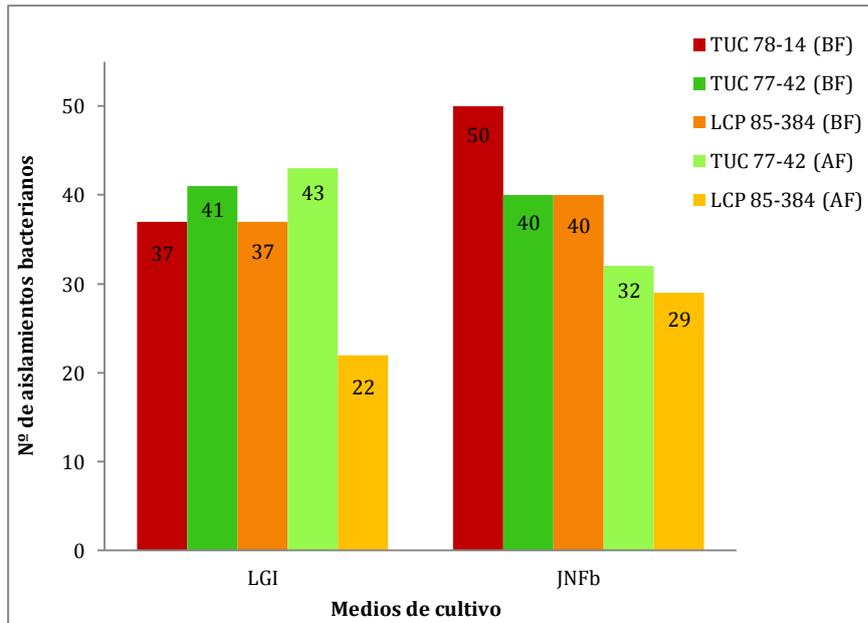


Gráfico 2.- Número de aislamientos bacterianos según medios de cultivo aislados (JNFb y LGI) de las variedades de caña. AF: alta fertilización nitrogenada, 150Kg N/ha; BF: baja fertilización nitrogenada, 50Kg

2.1.1 Diversidad de bacterias endófitas

En este trabajo, la morfología de las colonias fue considerada como una característica fenotípica que ayuda a obtener información preliminar sobre si se está en presencia de alta, media o baja diversidad morfológica de bacterias.

Una vez registrada la morfología de las colonias, se las clasificó de acuerdo a sus morfotipos. En la figura 1 se observan diferentes morfologías de colonias bacterianas en medio TY. En el cuadro 3 se presentan los 43 grupos obtenidos y el total de cepas en cada uno de ellos. El alto número de morfotipos indicaría que las variedades de caña estudiadas presentan gran diversidad morfológica de BED.

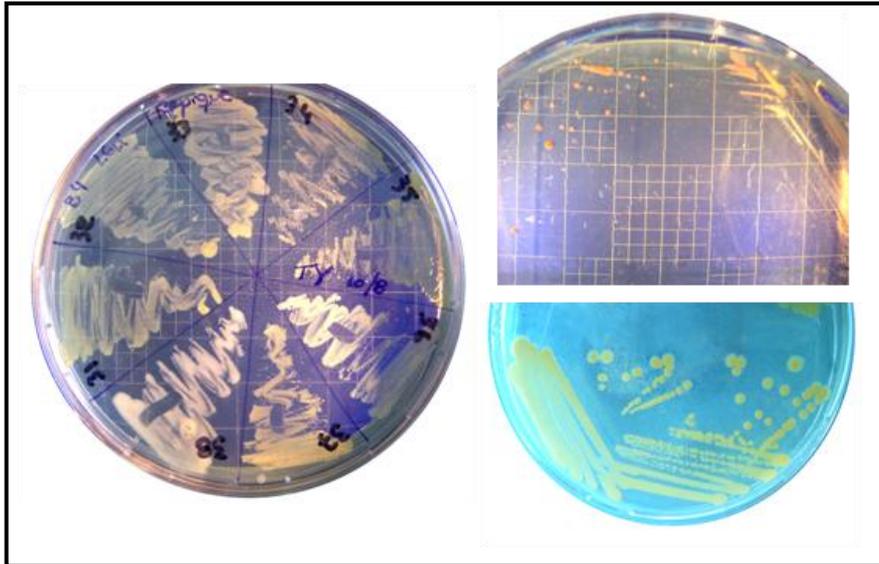


Figura 1.- Placas conteniendo medio TY mostrando diferentes morfotipos de colonias de las bacterias endófitas diazótrofes aisladas de caña de azúcar.

Sin tener en cuenta la variedad de la caña, la mayoría de los aislamientos (106) formaron colonias de color crema amarilla, convexas, de borde entero y gomosas brillosas (morfotipo 1) (cuadro 3). Por el contrario, los morfotipos 7, 9, 20, 23, 28, 31, 32, 37, 39 y 40 (cuadro 3) fueron representados por sólo 1 aislamiento en cada uno de ellos. Estos resultados indicarían que existe diversidad morfológica de endófitos diazótrofes en caña, factor importante al momento de decidir nuevos estudios.

Cuadro 3.- Clasificación de las colonias bacterianas endófitas diazótrofes aisladas de variedades de caña de azúcar según el morfotipo de sus colonias en medio de cultivo TY.

Morfotipo de colonia	Características de las colonias bacterianas: color, elevación, margen y textura	Números de aislamientos bacterianos
1	Crema amarilla, convexa, entero, gomosa brillante	106
2	Crema amarilla, convexa, entero con halo, gomosa brillante	18
3	Crema amarilla, convexa, ondulado, gomosa brillante	2
4	Crema amarilla, plana, ondulado con halo, gomosa brillante	2
5	Crema amarilla, convexa, entero, gomosa opaca	4
6	Crema amarilla, plana, entero con halo, gomosa brillante	14
7	Crema amarilla, convexa, entero, seca opaca	1
8	Crema amarilla, convexa, entero con halo, gomosa brillante	2
9	Crema amarilla, convexa, ondulado con halo, gomosa	1
10	Crema marrón, plana, entero, gomosa brillante	14
11	Crema marrón, convexa, entero, gomosa brillante	45
12	Crema marrón, convexa, entero, gomosa opaca	8
13	Crema marrón, convexa, entero con halo, gomosa opaca	2
14	Crema marrón, plana, ondulado con halo, gomosa brillante	41
15	Crema marrón, plana, entero con halo, gomosa brillante	4
16	Crema marrón, plana, ondulado, gomosa brillante	8
17	Crema marrón, convexa, ondulado, gomosa brillante	2
18	Crema marrón, plana, entero, seca brillante	2
19	Crema marrón, plana, entero, seca brillante	4
20	Crema marrón, plana, ondulado, gomosa opaca	1
21	Crema marrón, plana, entero, gomosa opaca	4
22	Crema marrón, convexa, ondulado con halo, gomosa brillante	2
23	Crema marrón, convexa, entero con halo, gomosa brillante	1
24	Crema blanca, convexa, entero, gomosa brillante	9
25	Crema blanca, plana, ondulado, gomosa brillante	2
26	Crema blanca, plana, entero, gomosa brillante	2
27	Crema blanca, convexa, entero, gomosa opaca	6
28	Crema blanca, convexa, entero con halo, gomosa brillante	1
29	Crema blanca, convexa, ondulado con halo, gomosa opaca	6
30	Crema blanca, convexa, ondulado, gomosa opaca	2
31	Crema blanca, convexa, entero con halo, gomosa opaca	1
32	Naranja, convexa, entero con halo, gomosa brillante	1
33	Naranja, convexa, entero, gomosa brillante	4
34	Naranja, plana, ondulado, seca brillante	4
35	Naranja, plana, entero, gomosa brillante	6
36	Naranja, convexa, entero, gomosa opaca	5
37	Naranja, convexa, entero, seca brillante	1
38	Naranja, plana, ondulado, gomosa opaca	2
39	Naranja, plana, ondulado, seca opaca	1
40	Crema naranja, convexa, entero, gomosa opaca	1
41	Amarilla, convexa, entero, gomosa brillante	25
42	Amarilla, convexa, entero, gomosa opaca	2
43	Amarilla, plana, ondulado, gomosa opaca	2

Al graficar los datos del cuadro 3 (número de aislamientos vs morfotipos), se observó una alta diversidad morfológica de colonias (gráfico 3). En el mismo se observan 5 grupos según el número de aislamientos: el A es el más representativo dentro de la comunidad bacteriana y está integrado por el morfotipo 1 con el mayor número de aislamientos (106); B (morfotipos 11 y 14) con 86 aislamientos; D (morfotipos 24, 16, 12, 35, 29, 27, 36, 34, 33, 21, 19, 15 y 5) que contiene 72 aislamientos; C (morfotipos 41, 2, 10 y 6) con 71 aislamientos y; E que es el más numeroso (morfotipos 43, 42, 38, 30, 26, 25, 22, 18, 17, 13, 8, 4, 3, 40, 39, 37, 32, 31, 28, 23, 20, 9 y 7) y está integrado por 36 aislamientos bacterianos.

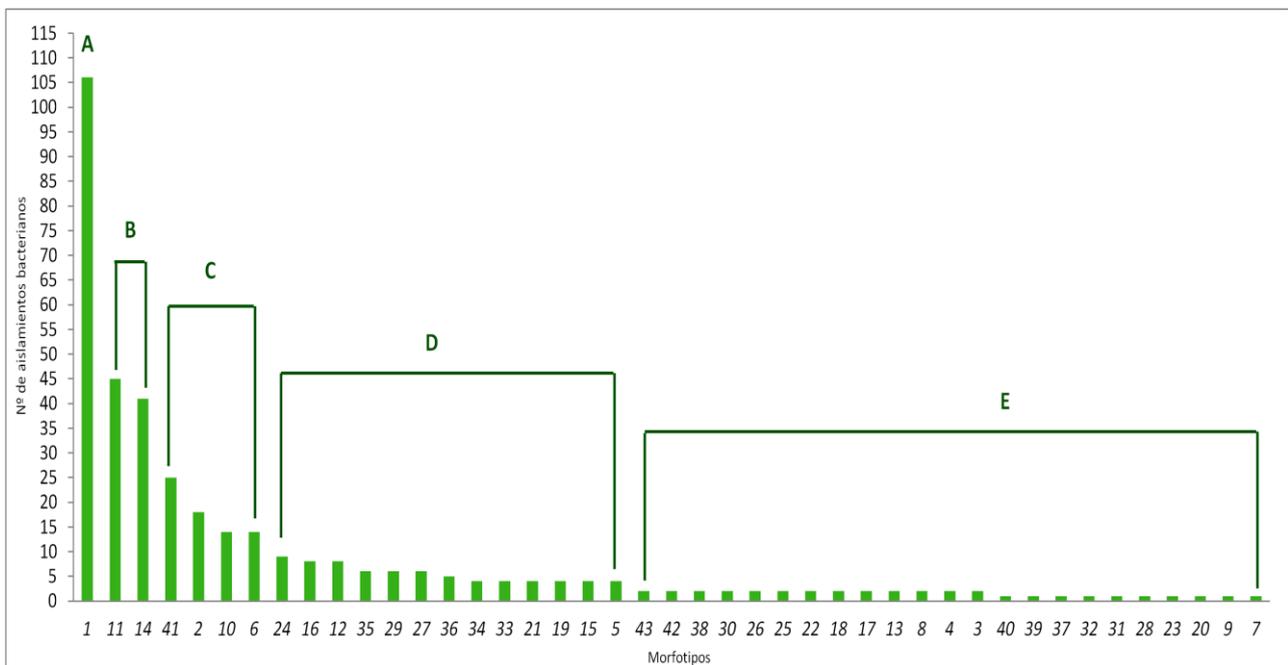


Gráfico 3.- Número de aislamientos dentro de cada morfotipo, obtenidos de variedades de caña.

En el gráfico 4 se presenta el número de aislamientos bacterianos que integran cada morfotipo para cada variedad de caña de azúcar y nivel de fertilización nitrogenada. Todas las variedades de caña presentaron BED asignadas a más de un morfotipo. Es así que en la variedad TUC 77-42 (BF) se observó la mayor diversidad en morfología de las colonias, aislándose bacterias pertenecientes a 19 morfotipos (4, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 27, 29, 30, 31 y 38) (gráfico 4A), y que en la variedad TUC 78-14 (BF) de la cual se aislaron mayor número de aislamientos (87) (cuadro 2), se observó

menor diversidad morfológica de colonias, aislándose bacterias pertenecientes a 12 morfotipos (gráfico 4E).

A su vez, en el gráfico 4 se puede observar que cada variedad de caña, en los diferentes niveles de fertilización nitrogenada, presentó un morfotipo dominante. En el caso de TUC 77-42 (AF) (gráfico 4B), LCP 85-384 (BF) (gráfico 4D) y TUC 78-14 (BF) (gráfico 4E), coincide con el morfotipo más numeroso (1); y en el caso de LCP 85-384 (AF) fue el morfotipo 11 (gráfico 4C), lo cual es importante destacar, que las BED pertenecientes a este morfotipo fueron las únicas aisladas de todas las variedades de caña estudiadas.

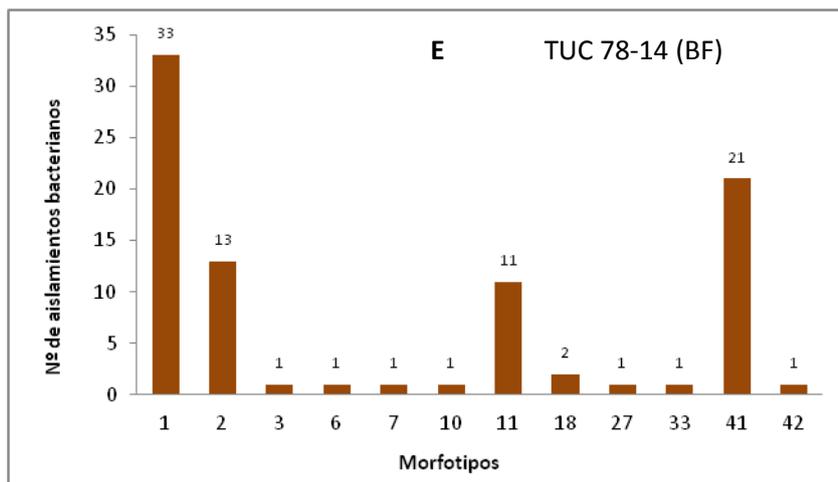
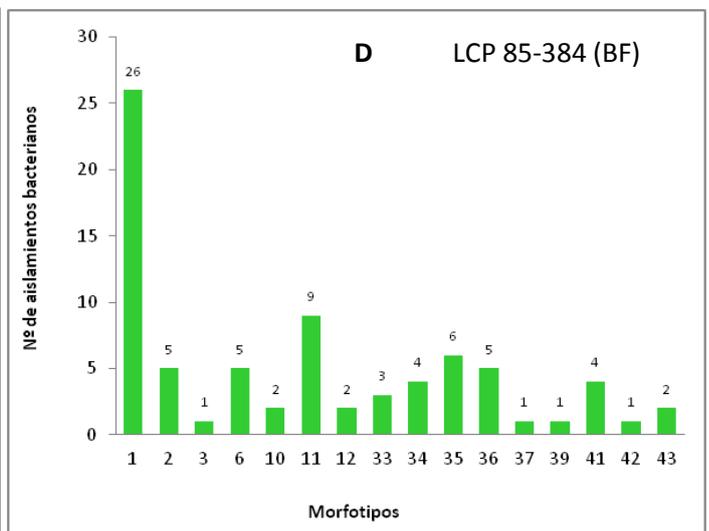
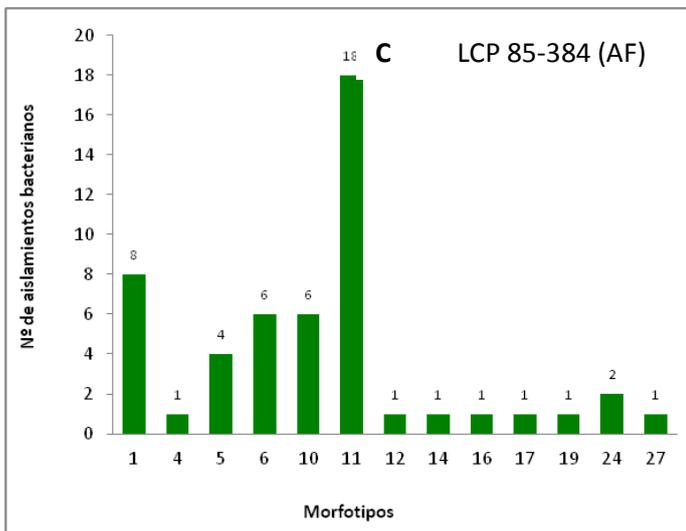
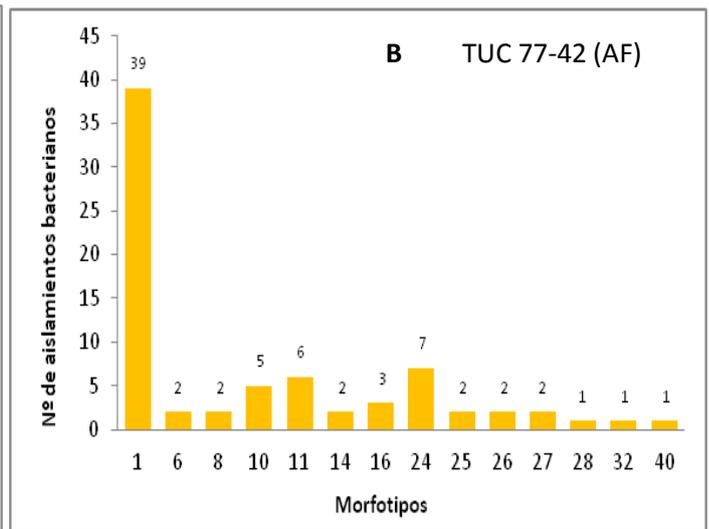
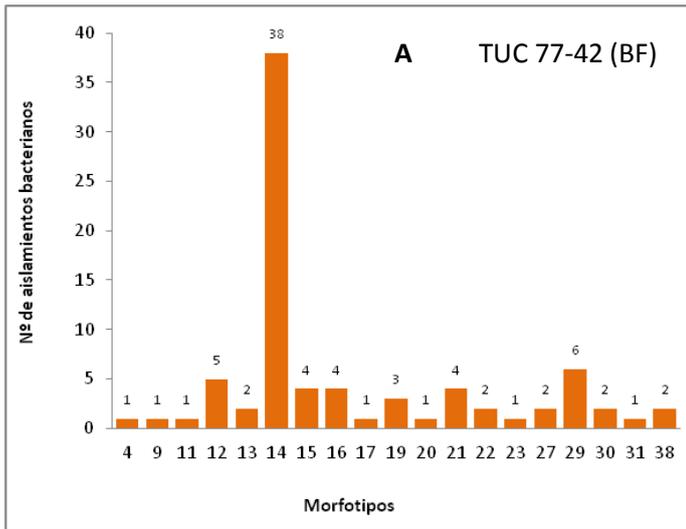


Gráfico 4.- Número de aislamientos bacterianos pertenecientes a los diferentes morfotipos obtenidos de cada variedad de caña. AF: alta fertilización nitrogenada, 150Kg N/ha; BF: baja fertilización nitrogenada, 50Kg N/ha.

El análisis de los morfotipos de las colonias indicaría que un gran número de bacterias diazótroficas viven en las variedades de caña estudiadas, sin que sean consideradas diferentes entre sí, aspecto que debe ser corroborado por técnicas de biología molecular.

2.2 Características diazotróficas en las bacterias endófitas de caña

La caracterización de las BED se continuó con la amplificación por PCR de un segmento del gen *nifH* en 100 bacterias seleccionadas (27% del total de bacterias estudiadas). Para la selección de los aislamientos se utilizó el siguiente criterio: que estuvieran representados todos los morfotipos, las tres variedades de caña, los dos niveles de fertilización nitrogenada y los dos medios de cultivo. En el anexo 2 se muestran los aislamientos seleccionados.

En el cuadro 4 se presentan los 13 aislamientos *nifH* positivos, detallando los morfotipos a los cuales pertenecen, la variedad de caña y el medio de cultivo del cual se aislaron. En la figura 2 se muestra el gel con las bandas en 300pb aprox. que corresponden al gen *nifH*.

Posteriormente, a aquellas bacterias *nifH* positivas, se les evaluó la formación de una película de crecimiento en medios semisólidos sin-N (medios de aislamiento) como característica complementaria de organismos diazótroficos.

Como se puede observar, todos los aislamientos *nifH* positivos pertenecieron a morfotipos distintos. Se obtuvieron aislamientos *nifH* positivos de las variedades TUC 77-42 y LCP 85-384 y de los dos medios de cultivos (cuadro 4).

Por otro lado, 3 aislamientos formaron una película de crecimiento debajo de la superficie y el resto en la superficie, demostrando que ciertos aislamientos tienen un metabolismo más aerobio, en relación a los microaerofílicos. Si bien, se registraron 6 aislamientos que cambiaron el pH del medio de cultivo de neutro a ácido, los restantes no modificaron el pH del medio. Ningún aislamiento modificó el pH a valores básicos y

no se encontró una correlación directa entre el cambio de pH y el medio de cultivo del aislamiento (cuadro 4).

Cuadro 4.- Aislamientos endófitos de caña *nifH* positivos según morfotipo al cual pertenecen, variedad de caña y medio de cultivo del cual se aislaron, clasificados según la formación de una película de crecimiento y el cambio de pH del medio.

Variedad de caña	Medio de cultivo	Morfotipo	Formación de película	Cambio de pH
TUC 77-42	LGI	1	debajo de la superficie	no
LCP 85-384	JNFb	6	debajo de la superficie	no
LCP 85-384	LGI	11	supeficial	ácido
LCP 85-384	LGI	14	supeficial	ácido
TUC 77-42	JNFb	15	supeficial	no
TUC 77-42	LGI	16	supeficial	no
TUC 77-42	LGI	19	supeficial	ácido
TUC 77-42	LGI	25	supeficial	ácido
TUC 77-42	JNFb	28	debajo de la superficie	ácido
TUC 77-42	LGI	29	supeficial	no
TUC 77-42	LGI	31	supeficial	no
LCP 85-384	JNFb	34	supeficial	ácido
LCP 85-384	JNFb	36	supeficial	no

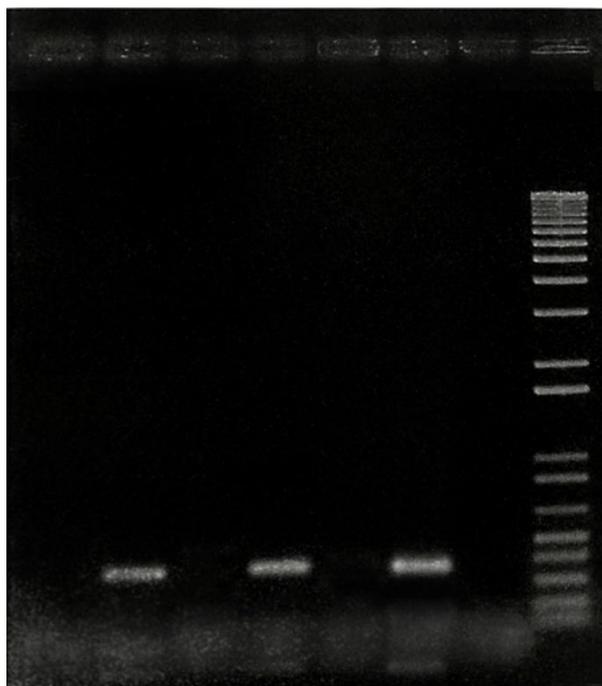


Figura 2.- Gel de agarosa 2% con la banda correspondiente al gen *nifH* (marcado con flecha a los 300pb aprox). Carriles: 2, 4 y 6 cepas *nifH* positivas; 1 cepa *nifH* negativa; 7 blanco; 8 marcador de peso molecular (Generuler 100pb Fermentas).

En la figura 3A se muestran aislamientos bacterianos *nifH* positivos formando una película de crecimiento superficial y por debajo de la superficie, mientras que en la figura 3B se observan viales conteniendo el medio de cultivo LGI con y sin cambio de pH.

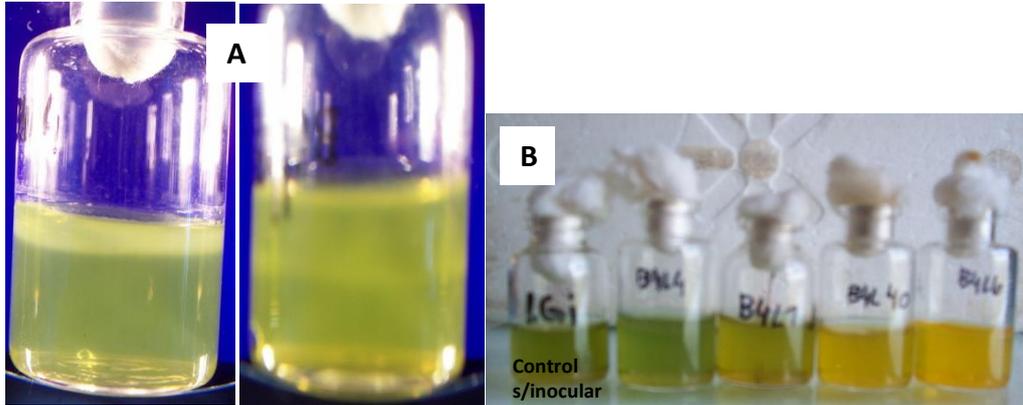


Figura 3.- Viales con medio LGI inoculados con bacterias endófitas diazótrofas aisladas de caña de azúcar. **A-** Película de crecimiento formada en la superficie y por debajo de la superficie. **B-** Cambio de pH del medio LGI

2.3 Diversidad genética e identificación de los aislamientos bacterianos

Para continuar con la caracterización genética, se aplicó la técnica de tipificación ERIC-PCR. Se obtuvieron 8 grupos ERIC a partir de los 13 aislamientos *nifH* positivos que se muestran en el cuadro 5. Como se puede observar, el grupo ERIC 1 se formó con 2 aislamientos obtenidos de la misma variedad (TUC 77-42) y aislados en el mismo medio (LGI); el ERIC 2 se formó por 2 aislamientos de la variedad LCP 85-384, aislados en medio LGI (morfortipos 11 y 14) y 2 de la variedad TUC 77-42, 1 aislado en medio LGI (morfortipo 25) y otro en medio JNFb (morfortipo 28); el ERIC 3 se formó por 2 aislamientos obtenidos de la variedad LCP 85-384, ambos aislados en medio JNFb y los restantes grupos ERIC se formaron únicamente por un aislamiento bacteriano (cuadro 5).

Cuadro 5.- Grupos ERIC obtenidos por ERIC-PCR aplicada a los aislamientos bacterianos endófitos de caña. Se presenta el morfotipo, la variedad de caña y el medio de cultivo sin-N de donde fueron obtenidos los aislamientos.

Aislamientos bacterianos			
Variedad de caña	Medio de cultivo	Morfotipo	Grupo ERIC
TUC 77-42	LGI	29	1
TUC 77-42	LGI	31	1
LCP 85-384	LGI	11	2
TUC 77-42	JNFb	28	2
LCP 85-384	LGI	14	2
TUC 77-42	LGI	25	2
LCP 85-384	JNFb	36	3
LCP 85-384	JNFb	34	3
TUC 77-42	JNFb	15	4
LCP 85-384	JNFb	6	5
TUC 77-42	LGI	19	6
TUC 77-42	LGI	16	7
TUC 77-42	LGI	1	8

Para la identificación de los 13 aislamientos *nifH* positivos se utilizó la secuenciación parcial del gen *16S rDNA*. A partir de la misma se identificaron 5 géneros: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium* y *Xanthomonas* que se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6.- Similitud de la secuencia nucleotídica del gen *16S ARNr* de aislamientos endófitos diazotrofos asociados a caña de azúcar cultivadas en Uruguay.

Morfotipo	Género/especie relacionada (n° de acceso en Genbank)	% similitud	Nº de acceso en la base NCBI	Grupo ERIC
29	<i>Pseudomonas</i> sp. KW20 (HQ231956)	99	JF262572	1
31	<i>Pseudomonas</i> sp. KW20 (HQ231956)	99	JF262571	1
11	<i>Enterobacter</i> sp. CY2W15 (HQ231936)	99	JF262587	2
28	<i>Enterobacter</i> sp. CY2W15 (HQ231936)	99	JF262586	2
14	<i>Enterobacter</i> sp. CY2W15 (HQ231936)	99	JF262585	2
25	<i>Enterobacter</i> sp. CY2W15 (HQ231936)	99	JF262584	2
36	<i>Pseudomonas</i> sp. GXSCRI B5 (DQ666336)	100	JF262569	3
34	<i>Pseudomonas</i> sp. GXSCRI B5 (DQ666336)	100	JF262568	3
15	<i>Stenotrophomonas chelatiphaga</i> strain G-7 (FJ493060)	100	JF262580	4
6	<i>Stenotrophomonas</i> sp. DNPA8 (FJ404810)	100	JF262573	5
19	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain K9 (EF175735)	99	JF262588	6
16	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain 30D (GQ337862)	99	JF262579	7
1	<i>Xanthomonas</i> sp. Aed03 (EU740995)	100	JF262581	8

Como se puede apreciar, todos los aislamientos pertenecieron al *phylum* Proteobacteria con representantes de los subgrupos α y γ . El subgrupo γ -proteobacteria fue el más abundante, comprendiendo organismos de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas* y *Xanthomonas* (cuadro 6). Las secuencias de los aislamientos ERIC 1 presentaron 99% de homología con las de *Pseudomonas* sp. KW20 (HQ231956), mientras que los aislamientos ERIC 3 un 100% de homología con *Pseudomonas* sp. GXSCRI B5 (DQ666336). Dentro del género *Enterobacter*, el aislamiento ERIC 6 tuvo un 99% de similitud con la especie *E. ludwigii* strain K9 (EF175735) y los aislamientos ERIC 2 presentaron 99% de similitud con *Enterobacter* sp. CY2W15 (HQ231936). Dentro del género *Stenotrophomonas*, el aislamiento ERIC 4 y ERIC 5 se relacionaron en un 100% con la cepa G-7 de *S. chelatiphaga* (FJ493060) y *Stenotrophomonas* sp. DNPA8 (FJ404810) respectivamente. Por último, el aislamiento ERIC 8 fue el único que presentó 100% de homología con el género *Xanthomonas* sp. Aed03 (EU740995). El subgrupo α

solo comprendió al aislamiento ERIC 7 que tuvo un 99% de similitud con la secuencia correspondiente a la cepa 30D de la especie *Agrobacterium tumefaciens* (GQ337862).

Cabe destacar, que los resultados obtenidos muestran que aquellos aislamientos a los cuales se los clasificó en el mismo grupo ERIC, fueron identificados dentro del mismo género bacteriano con igual porcentaje de similitud (cuadro 6). Por otro lado, los aislamientos bacterianos pertenecientes a distintos grupos ERIC, fueron identificados con diferentes géneros. Estos resultados indican, que la aplicación en este trabajo de la técnica de ERIC-PCR, permitió caracterizar genéticamente a los aislamientos, resultados que fueron corroborados posteriormente por la secuenciación del gen *16S ARNr*.

Los resultados de este trabajo evidencian que la variedad TUC 78-14 presenta el mayor número de aislamientos bacterianos y que la variedad TUC 77-42 presenta mayor diversidad morfológica. A su vez, se identificaron 5 géneros aislados de caña: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Agrobacterium* y *Xanthomonas*. En este capítulo se determinó que existe una alta diversidad morfológica y genética entre las BED aisladas de apoplasto de variedades de caña sembradas en diferentes niveles de fertilización nitrogenada.

3. DISCUSIÓN

En una primera etapa se formó una colección de 371 bacterias diazótrofes posiblemente endófitas aisladas de tallos de las variedades TUC 77-42, LCP 85-384 y TUC 78-14 en cultivos comerciales con alta y baja fertilización nitrogenada.

En las tres variedades de caña se encontraron altos números de UFC por ml de apoplasto (10^5 - 10^8), lo que indicaría que dichas bacterias pueden cumplir un rol en el interior de los tejidos de la caña.

La mayoría de los aislamientos se obtuvieron de la variedad TUC 78-14, lo que indicaría algún factor de selección de bacterias que colonizan a las diferentes variedades de caña. En esta selección estarían involucrados el genotipo bacteriano así como el genotipo, edad y estado fisiológico de la planta (Muñoz Rojas y Caballero Mellado, 2003 y Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). Nuestros resultados concuerdan con Perin y col. (2004) quienes encontraron que los aislamientos de diazótrofos están relacionados con la variedad de caña de azúcar, el órgano de la planta y las condiciones ambientales del área de estudio. El nivel de fertilización nitrogenada también influyó en el número de bacterias endófitas diazótroficas (BED) encontradas en caña. Todas las variedades evaluadas en este trabajo mostraron mayor número de bacterias aisladas en el nivel más bajo de fertilización. Existen diferentes evidencias de que el número y diversidad de bacterias rizosféricas y endófitas se relacionan con el aporte de N químico al suelo. Fuentes Ramirez y col. (1999) determinaron que la población de *G. diazotrophicus* disminuye o desaparece cuando las plantas de caña de azúcar crecen con alto aporte de N. Sin embargo la población de *G. diazotrophicus* y *Herbaspirillum* spp. en caña de azúcar no se ven afectadas de la misma forma por el fertilizante nitrogenado. Esto plantea la posibilidad de que los cambios fisiológicos que el fertilizante produce en la planta podrían afectar directamente la colonización de las bacterias, según Muthukumarasamy y col. (1999a).

En este trabajo, la utilización de diferentes medios de cultivo selectivos sin-N permitió obtener aislamientos de endófitos probablemente diazótrofos, capaces de utilizar el N₂ atmosférico mediante la enzima nitrogenasa, responsable del proceso de FBN. El medio donde crecieron más aislamientos fue en el JNFb, sugiriendo que el ácido málico es la fuente de C preferencial utilizada por la mayoría de las cepas bacterianas obtenidas. Estos resultados concuerdan con lo informado por Cavalcante y Döbereiner (1988) quienes establecen que *Azospirillum* spp. crece bien en medio semisólido con ácido málico como fuente de carbono. Varios trabajos mencionan la necesidad de adicionar pequeñas cantidades de extracto de levadura para proporcionar factores de crecimiento a especies bacterianas exigentes (Burris, 1994; Watanabe y Barraquio, 1979). En algunos

casos, conociendo los requerimientos de carbono de alguna bacteria en particular, se recomienda suplementar el medio con la fuente de carbono y así aislar la bacteria específica. Por ejemplo, *Azospirillum* spp. crece bien en presencia de ácidos orgánicos como málico y succínico y *G. diazotrophicus* crece preferentemente en altas concentraciones de sacarosa (Cavalcante y Döbereiner, 1988). Además, en condiciones de fijación de N₂, los medios semisólidos proporcionan un gradiente de oxígeno que permite el crecimiento de bacterias fijadoras según sus necesidades en la respiración.

En este trabajo la utilización de placas de Petri en sustitución de los viales clásicos aportó ventajas. Las bacterias disponen de más área para desarrollarse, minimizando la competencia entre ellas por espacio y nutrientes. Además, si se hacen diluciones del inóculo bacteriano, como se empleó en este trabajo, permite obtener el número de UFC por gramo de planta o ml de apoplasto.

Una vez obtenidos los aislamientos, se estudió la morfología de sus colonias, identificándose 43 morfotipos. Se destaca que el grupo más representativo (morfotipo 1) incluyó 106 aislamientos, con colonias de color crema amarilla, convexas, de borde entero y gomosas brillosas. Estos resultados indicarían que existe diversidad morfológica de endófitos diazótrofos en caña, factor importante al momento de fundamentar y decidir nuevos estudios.

La diversidad de bacterias endófitas de caña encontrada puede ser consecuencia indirecta de factores que influyen de manera significativa en la distribución de las comunidades microbianas del suelo y la rizósfera, como la morfología de la raíz, estado de crecimiento de la planta, exudados radicales y propiedades físicas y químicas del suelo (Vessey, 2003).

La determinación de la morfología de las colonias, si bien es un análisis que insume tiempo y trabajo, facilita y ayuda a analizar grandes números de cepas y permite realizar una clasificación y selección preliminar de las bacterias más representativas para siguientes estudios. La caracterización macroscópica de las colonias de

microorganismos, como bacterias y hongos, ha sido utilizada como herramienta de clasificación en varias áreas de la Microbiología. Por ejemplo, Bracho y col. (2004) clasificaron mediante este método una colección de bacterias degradadoras de hidrocarburos aromáticos. Cariello y col. (2007) registraron el aspecto y coloración de las colonias de hongos para seleccionarlas de pilas de compostaje. Esta metodología ya ha sido utilizada con endófitos diazótrofos de maíz (Barlocco, 2008) aportando información útil, por lo que fue de interés aplicarla en este trabajo en caña de azúcar.

En una segunda etapa se confirmó el carácter diazótrofo de los aislamientos, mediante la amplificación del gen *nifH* conjuntamente con la formación de una película de crecimiento en medios semisólidos sin-N. Como se mencionó anteriormente, el gen *nifH* es uno de los genes que codifican para la enzima nitrogenasa involucrada en el proceso de FBN. Esta enzima se encuentra conservada evolutivamente, sin embargo su secuencia nucleotídica ha divergido entre las bacterias diazótroficas (Hurek y Reinhold-Hurek, 2005). La presencia del gen *nifH* se ha utilizado para detectar potenciales bacterias diazótroficas empleando cebadores de secuencias degeneradas para intentar abarcar la mayor diversidad de secuencias posibles. En este estudio, los cebadores utilizados fueron específicos para diazótrofos aerobios y microaerobios (Olson y col., 1998). Se logró amplificar el gen *nifH* en el 13% de los 100 aislamientos analizados y la formación de una película de crecimiento en viales, corroborando el carácter diazótrofo. Cabe destacar que sería interesante aplicar la técnica de reducción de acetileno (ARA) para confirmar la activación de la nitrogenasa en estos aislamientos.

Teniendo en cuenta los sucesivos repiques realizados en los medios selectivos previos al aislamiento final de la bacteria, se esperaría un mayor porcentaje de aislamientos *nifH* positivos. El bajo porcentaje de detección ya ha sido reportado por otros autores (Doty y col., 2009) y puede ser explicado por: la variabilidad existente en este gen (Zehr y col., 2003) y la presencia de bacterias no diazótroficas que lograron crecer en medios sin-N porque pueden utilizar trazas de N provenientes de reactivos, del agua destilada y de componentes celulares de bacterias muertas (Hill y Postgate, 1969).

Otra forma de detectar bacterias diazótrofes sería intentando amplificar otros genes de la nitrogenasa, como el *nifA* (Katupitiya y col., 1995; Arsene y col., 1994) y el gen *nifD* (Potrich y col., 2001).

Finalmente, la diversidad de la comunidad de diazótrofos cultivables fue evaluada mediante la técnica de ERIC-PCR demostrando que las 13 BED *nifH* positivas aisladas poseen alta diversidad genética, formando 8 grupos ERIC. La aplicación en este trabajo de ERIC-PCR, permitió caracterizar genéticamente a los aislamientos, resultados que fueron corroborados posteriormente por la secuenciación del gen *16S ARNr*. Sería interesante aplicar en el futuro otra técnica, como por ejemplo BOX-PCR ó RAPD, para poder tipificar a nivel de cepas.

El gen *16S ARNr* es ampliamente utilizado en estudios de filogenia y taxonomía, ya que posee las siguientes características (Woese, 1987): 1- está presente en todas las bacterias, 2- su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo prolongado, 3- los cambios ocurren de manera suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariotas, pero presenta suficiente variabilidad para diferenciar no sólo organismos taxonómicamente alejados, sino también los más próximos, 4- resulta relativamente fácil de secuenciar y existen bases de datos amplias y, 5- no puede ser transmitido por transferencia horizontal.

Los diazótrofos aislados e identificados en este capítulo pertenecen a las subdivisiones α y γ -proteobacteria, con dominancia de las γ -proteobacteria ya que la mayoría de los aislamientos fueron identificados dentro de los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Xanthomonas*. El grupo de las α -proteobacterias estuvo representado únicamente por el género *Agrobacterium*.

De acuerdo al análisis de secuencia del gen *16S ARNr*, los aislamientos identificados pertenecen a géneros que contienen, entre otros, organismos endófitos promotores crecimiento vegetal (PCV) al asociarse a otros cultivos (Ryan y col., 2008; Rosenblueth y Martínez-Romero 2006). Algunas especies del género *Enterobacter* han sido señaladas como microorganismos comúnmente encontrados en la rizósfera (Chelsius y Triplett, 2000) y en el interior de gramíneas (Tan y col., 2009). En un trabajo de Orozco-Jaramillo

y Martínez-Nieto (2009) se aisló una bacteria de la especie de *E. agglomerans* de la rizósfera de *Pinus patula* y se demostró su capacidad de fijar N atmosférico por la técnica de reducción de acetileno. *E. radicincitans* corresponde a una bacteria PCV aislada del rizoplano de trigo de invierno, capaz de fijar N₂ y producir fitohormonas, tales como auxinas y citoquininas. Esta, es capaz de aumentar el desarrollo de las raíces y el rendimiento de diferentes especies vegetales (Kämpfer y col., 2005). Shoebitz y col. (2008) aislaron y caracterizaron una cepa diazótropa de *E. ludwigii* capaz de producir AIA, solubilizar fosfato tricálcico, inhibir al hongo *Fusarium solani* y promover el desarrollo radical de plantas de *Lolium perenne*. Esta bacteria con características de PCV promovió el crecimiento de plantas de sorgo (Gopalakrishnan y col., 2010).

Pseudomonas fluorescens y *P. putida*, juegan un rol importante de PCV en los ecosistemas agrícolas (Rovera y col., 2008; Sharma y col., 2003; Hall y col., 1996), en particular como fijadoras de N₂ (Jha y Kumar, 2009; Montañez y col., 2009; Prakamhang y col., 2009; Yim y col., 2009; Park y col., 2005; Nguyen y col., 2003) y en la supresión de enfermedades en diversos cultivos (Quagliotto y col., 2009; Weller y col., 2002; Rosas y col., 2001; Lemanceau y Alabouvette, 1991). A su vez, dentro de los efectos positivos que ejercen estas bacterias en las plantas también se encuentran la producción y secreción de sideróforos y reguladores del crecimiento como auxinas, giberelinas y citoquininas, mejorando procesos como germinación de semillas, nutrición mineral, desarrollo de raíces y empleo del agua (Pan y col., 1999). Por otro lado, Wolf y col. (2002) han reportado la incidencia de *Stenotrophomonas rhizophila* como una rizobacteria promotora del crecimiento, ya que además de reducir las concentraciones de compuestos xenobióticos en suelos contaminados (Binks y col., 1995), ha sido reportada como biocontroladora de agentes fúngicos en los suelos.

Por otro lado, algunos de los géneros de los endófitos identificados han sido reportados como fitopatógenos, por ejemplo *Xanthomonas* y *Agrobacterium tumefaciens*. La escaldadura foliar, es causada por *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson, la cual constituye una de las enfermedades de mayor importancia en el cultivo de caña, por sus efectos sobre los rendimientos agrícolas, la calidad de los jugos y las elevadas pérdidas

que provoca en su fase aguda, las que se estiman entre 90-100% (China y col., 2000; Ricaud y Ryan, 1989). *Agrobacterium tumefaciens* produce una enfermedad llamada "corona de agallas" que forma tumores, principalmente en la base de los tallos a nivel de la superficie del suelo en plantas herbáceas y forestales (Arguedas, 2009).

Es importante mencionar que en este trabajo no se obtuvieron aislamientos de los géneros *Herbaspirillum*, *Gluconoacetobacter*, *Azospirillum* o *Burkholderia*, los cuales se asocian comúnmente a caña de azúcar (Baldani y Baldani, 2005). Una explicación posible a este hecho puede deberse a que la composición de la comunidad de endófitos depende de la especificidad entre el genotipo bacteriano y el genotipo de la planta, el clima, el tipo de riego así como los niveles de fertilización utilizados. Recientemente investigadores de Brasil (Reis y col., 2000) aislaron bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* y *Herbaspirillum* en cuatro genotipos de caña de azúcar, encontrando variaciones en las poblaciones de estos microorganismos de acuerdo al genotipo en estudio. Esto permite señalar que tanto la especie de planta analizada como las variedades, influyen directamente sobre las poblaciones de microorganismos diazotróficos, facilitando el crecimiento de diferentes géneros. La influencia de factores ambientales, principalmente el estrés hídrico sobre las poblaciones de microorganismos diazotróficos y sobre el proceso de fijación de N_2 , fue demostrado en diversos estudios (Costa y Ruschel, 1981; Bellone y col., 1996; Reis y col., 2000)

Este capítulo del trabajo se comprueba la presencia de alto número de bacterias con diversidad morfológica y genética en todas las variedades de caña estudiadas. Se detectaron organismos de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Stenotrophomonas*, los cuales han sido mencionados como PCV en otras especies de gramíneas.

CAPÍTULO 3

Caracterización bioquímica y de promoción del crecimiento vegetal de bacterias endófitas diazótrofes asociadas a caña de azúcar.

1. METODOLOGÍA

Esta tesis está enmarcada en el proyecto “Producción sustentable en caña de azúcar: bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su aplicación agronómica en cultivos comerciales” (Proyecto INIA FPTA-275). En este proyecto se obtuvo una amplia colección de 598 probables bacterias endófitas diazótrofes (BED), siendo 99 positivas para la amplificación del fragmento del gen *nifH*. De estos 598 aislamientos, esta tesis aportó 371 por el estudio realizado en el capítulo 2.

De esta amplia colección y específicamente a las 99 BED *nifH* positivas se les determinó la producción de ácido indol acético, la capacidad de solubilizar fosfato *in vitro* y la capacidad de reducir acetileno a etileno (ensayo ARA) (Taulé, 2011). Se tuvieron en cuenta los resultados de estos estudios para elegir 8 cepas promisorias en PCV y continuar con los estudios en este capítulo (cuadro 1).

Cuadro 1.- Cepas diazótrofes endófitas de caña utilizadas en los estudios. Se detallan los géneros bacterianos, los medios de cultivo en las cuales fueron aislados y las características promotoras del crecimiento vegetal.

Identificación de la cepa	Género bacteriano	Variedad	Medio de aislamiento	Reducción de acetileno	Producción de AIA*	Solubilización de fosfatos
UYSO02	<i>Achromobacter</i>	CP 92-618	JNFb	-	+	+
UYSO03	<i>Acinetobacter</i>	TUC 77-42	JNFb	+	+	+
UYSO10	<i>Enterobacter</i>	FAM 81-77	LGI-P	+	+	-
UYSO13	<i>Pantoea</i>	CP 92-618	LGI-P	-	+	+
UYSO21	<i>Pseudomonas</i>	FAM 81-77	JNFb	+	+	-
UYSO22	<i>Rhanella</i>	TUC 77-42	LGI	+	+	+
UYSO24	<i>Shinella</i>	TUC 77-42	LGI-P	+	+	-
UYSO27	<i>Stenotrophomonas</i>	TUC 78-14	JNFb	+	+	-

*AIA: ácido indol acético. Fuente: Proyecto INIA FPTA-275

A su vez, en los siguientes ensayos se utilizó como referencia la cepa *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI-5, aislada de raíces de caña de azúcar en el medio LGI-P (Cavalcante y Döbereiner, 1988).

1.1 Caracterización *in vitro* de las cepas por fuente de carbono, nitrógeno y resistencia a antibióticos

Con la finalidad de caracterizar más en profundidad a las cepas seleccionadas, se evaluó el efecto que tienen diferentes condiciones de cultivo sobre el crecimiento bacteriano: distintas fuentes y concentraciones de carbono, fuentes de N y de antibióticos. Esta evaluación podría aportar conocimientos para el desarrollo en un futuro de un medio de cultivo económico para el crecimiento óptimo de cada bacteria el cual pueda ser utilizado a nivel industrial con el objetivo de generar un inoculante.

Las bacterias seleccionadas se sembraron en placas con medio DYG's (Weber y col., 1999) (anexo 1) y se repicaron a 5ml del mismo medio líquido. El cultivo fue lavado por centrifugación a 3500 rpm durante 10', descartándose el sobrenadante y resuspendiéndose el pellet en 1ml de NaCl 0.85% estéril. Este procedimiento se repitió 4 veces, obteniéndose para cada bacteria, una suspensión celular a la cual se le igualó la densidad óptica (D.O.) en espectrofotómetro entre 0,6-0,8 a 560nm para estandarizar las subsiguientes pruebas.

1.1.1 Fuentes de carbono y nitrógeno

Una suspensión de cada cepa se sembró por triplicado con ansa descartable por agotamiento en placas conteniendo los medios sólido JNFb, LGI o LGI-P (anexo 1) (según su medio de aislamiento original) sustituyéndose en cada caso, la fuente de C por 5g/l de sacarosa, ácido málico, glucosa, glicerol, manitol y azúcar de caña no refinada (acnr, obtenida de ALUR). En el caso del N, se utilizó sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nitrato de potasio (KNO_3) , cloruro de amonio (NH_4Cl) , L-tirosina (L-Tyr), L-asparagina (L-Asn) y L-ácido glutámico (L-Glu) a una concentración 5mM. Las soluciones de aminoácidos

fueron esterilizadas por filtración utilizando una membrana con un diámetro de poro de 0,2µm agregándose asépticamente al medio de cultivo termostatzado. Como control positivo se utilizaron los medios originales inoculados con las mismas cepas y como control negativo los medios sin fuente de C y N (según el caso), inoculados con las cepas en estudio. En un experimento complementario se evaluó el efecto del agregado de 100g/l y 200g/l de sacarosa así como de acnr en los medios de cultivos. Luego de 10 días de haber sido inoculados los medios, se realizó la evaluación visual del crecimiento en las placas y según un índice de crecimiento bacteriano (ICB) se las clasificó cualitativamente en: sin crecimiento (0); colonias aisladas en la estría (1); crecimiento continuo sin colonias aisladas en la estría (2).

Posteriormente, con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos por la evaluación visual, se realizó un ensayo de recuento en placa. Para esto, se utilizaron 5 cepas que mostraron diferentes resultados en el ensayo anterior: *Enterobacter* sp. UYSO10, *Rhanella* sp. UYSO22, *Shinella* sp. UYSO24, *Stenotrophomonas* sp. UYSO27 y *G. diazotrophicus* PAI-5. De la suspensión de células de cada cepa (D.O. 0,6-0,8 a 560nm) se prepararon diluciones seriadas, 10^{-1} - 10^{-10} , en NaCl 0.85% estéril y se realizó el recuento de bacterias viables en placa con sacarosa y ácido málico (5g/l); sacarosa y acnr (100g/l y 200g/l); nitrato de potasio y cloruro de amonio (5mM). Los resultados se expresaron en ufc/ml.

1.1.2 Resistencia intrínseca a antibióticos

La capacidad de las bacterias de crecer en presencia de antibióticos, le confiere a las cepas ventajas competitivas con respecto a otras que no tengan resistencia a dicho antibiótico.

Para determinar esta resistencia, se sembró 5µl de una suspensión celular de cada cepa en placas conteniendo medio rico DYG`s con diferentes concentraciones de antibióticos. Los antibióticos y sus máximas concentraciones fueron: ampicilina 1000mg/l;

Kanamicina 650mg/l; Streptomina 450mg/l y Spectinomicina 800mg/l. Las soluciones de antibióticos, esterilizadas por filtración (0,2µm), se agregaron al medio de cultivo estéril y termostático. Las placas se incubaron a 30°C registrándose la presencia o ausencia de crecimiento a las 48h. El ensayo se realizó por triplicado para cada tratamiento. Como control positivo se inocularon las mismas cepas en medio DYG`sin el agregado de antibióticos.

1.2 Determinación de características promotoras del crecimiento vegetal

1.2.1 Producción de sideróforos

Se sembró 10µl de una suspensión celular de cada cepa (D.O. 0,6-0,8 a 560nm) en placas con medio CAS (Schwyn y Neilands, 1987). Como control positivo se utilizaron las cepas *Sinorhizobium meliloti* 1021 y *Pseudomonas fluorescens* CFBP 2392 (Gamalero y col., 2002; Lynch y col., 2001) cedidas por el laboratorio de BIOGEM del IIBCE. Luego de su incubación (5 días) se evaluó la presencia o ausencia de un halo de color naranja alrededor de cada inóculo. En las que produjeron halo, se determinó la relación diámetro del halo sobre diámetro del inóculo.

1.2.2 Capacidad antagónica a hongos fitopatógenos

Para determinar la capacidad de las cepas en controlar o inhibir el crecimiento de hongos patógenos de plantas se utilizó la técnica de cultivos duales. Los hongos evaluados fueron: *Fusarium oxysporum* f.sp. *cepae*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae*, *Fusarium graminearum* 02026 y *Fusarium graminearum* 06005 (cuadro 2) (cedidos por Paula Conde, INIA Las Brujas).

Cuadro 2.- Hongos fitopatógenos utilizados para determinar la capacidad de control biológico de las cepas bacterianas endófitas diazótrofes de caña. (Colección de INIA Las Brujas-La Estanzuela, Sección Protección Vegetal).

Fitopatógeno	Origen
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cepae</i> 17.8	Cebolla
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>fragariae</i>	Frutilla
<i>Fusarium graminearum</i> 02026	Grano de trigo
<i>Fusarium graminearum</i> 06005	Grano de trigo

El ensayo consistió en crecer las 9 cepas en estudio contrapuestas a los 4 patógenos. Para esto, en el centro de cada placa con PDA (potato dextrosa agar) se colocó un disco de agar con micelio del hongo y se incubaron a 25°C por 48 horas. Posteriormente, se realizó una estría de cada cepa a 1cm de distancia del micelio y se incubaron a 27°C, realizándose una primera evaluación visual a las 24h y otra a los 6 días. Con las cepas bacterianas que inhibieron a los patógenos se realizaron cultivos duales ubicándose la estría bacteriana a 2cm de cada lado del disco. Se realizaron 3 repeticiones por cepa y como control se utilizaron placas de PDA inoculadas con el patógeno pero sin inocular con las bacterias. Después de incubar las placas a 25°C durante 10 días, se midió el diámetro de las colonias fúngicas desarrolladas en los controles y en las placas con cultivos duales. Se calculó el porcentaje de inhibición: $(R-r)/R \times 100$, donde R es el diámetro de la colonia fúngica en el control y r es el diámetro de la colonia fúngica en presencia de la bacteria (Idris y col., 2007).

1.3 Producción de enzimas pectinolíticas y endoglucanasas

La capacidad de hidrolizar polímeros que componen las paredes celulares vegetales puede estar relacionada con la capacidad infectiva y la colonización de los tejidos por parte de las bacterias. Para conocer si las cepas en estudio presentaban dicha estrategia, se les determinó su capacidad de hidrolizar carboximetil-celulosa y pectina en medio de cultivo sólido, lo que indicaría actividad pectinolítica y endoglucanasa, respectivamente.

Se utilizaron placas conteniendo los medios sólidos sin-N (JNFb, LGI y LGI-P según el medio donde se aislaron originalmente las cepas), suplementados con 0.5% triptona y 1% de carboximetil celulosa (CMC) para la actividad endoglucanasa ó 0.5% triptona y 1% de pectina cítrica para la actividad pectinolítica (Pariona-Llanos y col., 2010). En cada placa se sembraron 5µl de suspensión celular y se realizaron 3 repeticiones por cepa para cada enzima.

En el caso de la determinación de la actividad pectinolítica, las placas se incubaron a 28°C durante 4 días. Luego de la aparición de colonias, el medio fue cubierto con lugol durante 2' observándose la aparición o no de un halo alrededor del inóculo. Como control positivo de la actividad pectinolítica se utilizó la cepa *Raoultella terrigena* (Rodríguez Blanco, 2011).

Para la actividad endoglucanasa, después de 48h de incubación a 30°C, las placas se cubrieron con una solución de rojo Congo ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), se incubaron a temperatura ambiente durante 30' y se lavaron con una solución de NaCl 1M. Se observó la aparición o no de un halo de degradación de la CMC alrededor del inóculo (Theather y Wood, 1982). Como control positivo de la actividad endoglucanasa se utilizó la cepa *Pseudomonas* sp. (Rodríguez Blanco, 2011).

Con los datos obtenidos en los ensayos descritos en los ítems 2.2 y 2.3, se realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias empleando el test de LSD-Fisher ($\alpha \leq 0.05$) (Infostat, 2008).

2. RESULTADOS

2.1 Crecimiento de las cepas en diferentes condiciones de cultivo

2.1.1 Fuentes de carbono y nitrógeno

Las bacterias presentaron diferentes exigencias en fuentes de C y N para su crecimiento, información útil para delinear las estrategias de su uso futuro teniendo en cuenta la

posibilidad de desarrollar un inoculante. En general, todas las cepas mostraron alta versatilidad en la utilización de las fuentes de C y de N ensayadas, mostrando similar índice de crecimiento bacteriano (ICB) para las fuentes evaluadas. Sin embargo, la sacarosa y la glucosa a una concentración de 5g/l y los 3 aminoácidos y el cloruro de amonio, fueron las fuentes más utilizadas de C y N respectivamente (cuadro 3). Todas las cepas presentaron un ICB máximo en la fuente de C de donde fueron aisladas (ácido málico y sacarosa) (cuadro 1), con la excepción de la cepa *Stenotrophomonas* sp. UYSO27 que presentó un ICB menor. A su vez, dicha bacteria presentó un crecimiento en todas las fuentes de C y N menor al resto de las cepas. *G. diazotrophicus* PAI-5 fue la única que no utilizó el ácido málico como fuente de C (cuadro 3).

Al evaluar los azúcares a 100 y 200 g/l, se destacó que la sacarosa, en las 2 concentraciones mencionadas, fue la fuente de C más utilizada por las bacterias en general (cuadro 3). Las cepas crecidas en presencia de sacarosa y acnr a 100g/l mostraron mayor crecimiento en comparación a la concentración de 200g/l (cuadro 3). *G. diazotrophicus* PAI-5 mostró un alto crecimiento en las dos fuentes de C y en ambas concentraciones. Las cepas aisladas en LGI-P (cuadro 1), medio que contiene 100g/l de sacarosa, mostraron un mayor crecimiento en esa fuente de C. *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Rhanella* sp. UYSO22, a diferencia de las restantes cepas, formaron una cápsula gomosa en algunas fuentes de C y N (cuadro 3).

Cuadro 3.- Índice del crecimiento bacteriano de las cepas diazótrofes endófitas de caña según fuente de carbono y nitrógeno utilizada.

Cepas bacterianas									
	UYSO02	UYSO03	UYSO10	UYSO13	UYSO21	UYSO22	UYSO24	UYSO27	PAI-5
Fuentes de C									
Sacarosa (5 g/l)	2	2	2*	2	2	2*	2	1	2
Sacarosa (100 g/l)	1	2	2*	2	2	2*	2	1	2
Sacarosa (200 g/l)	1	1	1	2	1	2	1	1	2
Glucosa (5 g/l)	2	2	2*	2	2	2	2	1	2
Glicerol (5 g/l)	2	1	2*	2	2	2*	2	1	2
Ácido málico (5 g/l)	2	2	2	2	2	2	2	1	0
Manitol (5 g/l)	1	1	2*	2	2	2*	2	1	2
Acnr (5 g/l)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Acnr (100 g/l)	1	2	2*	2	2	2	1	1	2
Acnr (200 g/l)	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Fuentes de N (5 mM)									
Cloruro de amonio	2	2	2	2	2	2	2	1	2
L-tirosina	2	2	2	2	2	2	2	1	2
L-asparagina	2	2	2	2	2	2	2	1	2
L-ácido glutámico	2	2	2*	2	2	2*	2	1	2
Sulfato de amonio	2	2	2	1	2	2	2	1	1
Nitrato de potasio	1	2	2	2	2	2*	2	1	1

Índice de crecimiento bacteriano (ICB): sin crecimiento (0); colonias aisladas en la estría (1); crecimiento continuo sin colonias aisladas en la estría (2). Cepas bacterianas: *Achromobacter* sp. UYSO02, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Enterobacter* sp. UYSO10, *Pantoea* sp. UYSO13, *Pseudomonas* sp. UYSO21, *Rhanella* sp. UYSO22, *Shinella* sp. UYSO24, *Stenotrophomonas* sp. UYSO27 y *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI-5. acnr: azúcar de caña no refinada. C: carbono. N: nitrógeno. Asterisco: cepas productoras de una cápsula gomosa en esas fuentes de carbono y nitrógeno.

A partir de la suma de los valores de ICB para la sacarosa y acnr a concentraciones de 5, 100 y 200 g/l (cuadro 3) se generó el gráfico 1. En el mismo se destaca una relación inversamente proporcional entre el ICB y la concentración de sacarosa, observándose mayor crecimiento a 5g/l. Para el acnr, el mínimo crecimiento bacteriano se presenta a una concentración de 5g/l y el máximo de crecimiento se observa a 100g/l, igualando valores de ICB del ácido málico y manitol a 5g/l. El gráfico 1 muestra que la sacarosa en cualquiera de las tres concentraciones fue la fuente de C más utilizada por las cepas estudiadas.

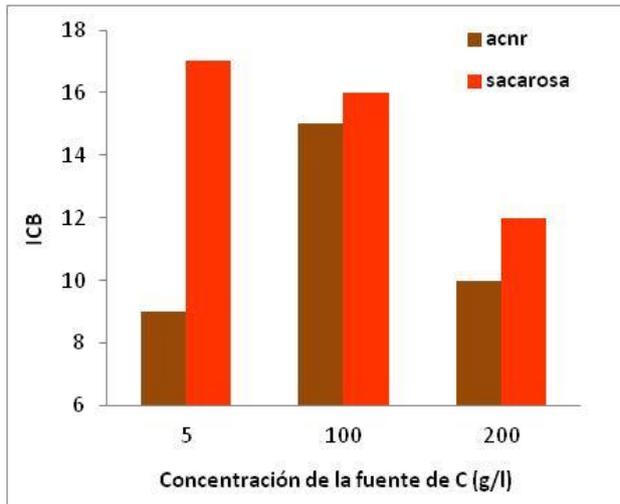


Gráfico 1.- Índice de crecimiento bacteriano (ICB) total de bacterias diazótrofes endófitas de caña en sacarosa y acnr como fuentes de carbono (C) evaluadas a una concentración de 5, 100 y 200g/l.

El conteo de células viable en placas validó la evaluación cualitativa del crecimiento de las cepas. En el cuadro 4 se muestra que las cepas que tuvieron igual ICB, coincidieron en el mismo valor ó en un rango delimitado de ufc/ml (cuadro 4).

ICB	Recuento en placa
0	no hay crecimiento
1	<10 ufc/ml
2	10^{10} - 10^{12} ufc/ml

Cuadro 4.- Relación entre el Índice de crecimiento bacteriano (ICB) de bacterias diazótrofes endófitas de caña y las unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml)

2.1.2 Resistencia intrínseca a antibióticos

Los antibióticos kanamicina, estreptomycin, espectinomycin y ampicilina se seleccionaron porque todos actúan sobre bacterias Gram negativas (como las seleccionadas en este capítulo) y pertenecen a diferentes grupos de antibióticos: aminoglucósidos (kanamicina y estreptomycin), glicopéptidos (espectinomycin) y betalactámicos (ampicilina).

En el cuadro 5, se observa que todas las cepas mostraron resistencia a la ampicilina y a la espectinomycin. La mayor resistencia se observó en ampicilina, con valores

superiores a 1g/l. Las cepas *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Enterobacter* sp. UYSO10, *Pantoea* sp. UYSO13 y *Pseudomonas* sp. UYSO21, no mostraron resistencia a la estreptomycinina ni a la kanamicina en las condiciones ensayadas, y *Achromobacter* sp. UYSO02 y *Shinella* sp. UYSO24 no fueron capaces de crecer en presencia de kanamicina únicamente. Más detalladamente, *Rhanella* sp. UYSO22 y *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, mostraron resistencia a 450mg/l de estreptomycinina; *Pseudomonas* sp. UYSO21, *Rhanella* sp. UYSO22, *Shinella* sp. UYSO24, *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, resistieron concentraciones de 1g/l de ampicilina; *Rhanella* sp. UYSO22 y *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, presentaron resistencia a concentraciones de 650mg/l de kanamicina; y las cepas *Rhanella* sp. UYSO22 y *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, mostraron resistencia en 800mg/l de espectinomicina. Por lo tanto, *Rhanella* sp. UYSO22 y *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, presentaron resistencia intrínseca a todos los antibióticos en las más altas concentraciones (cuadro 5).

Cuadro 5.- Evaluación *in vitro* de la resistencia intrínseca a 4 antibióticos por las cepas diazótroficas endófitas de caña

Cepas bacterianas	Antibióticos (mg/l)			
	STR	AMP	KAN	SPC
<i>Achromobacter</i> sp. UYSO02	1/20*	250/300*	0	150/200*
<i>Acinetobacter</i> sp. UYSO03	0	100/150*	0	100/150*
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	0	450/500*	0	150/200*
<i>Pantoea</i> sp. UYSO13	0	50/100*	0	10/20*
<i>Pseudomonas</i> sp. UYSO21	0	>1000**	0	150/200*
<i>Rhanella</i> sp. UYSO22	>450**	>1000**	>650**	>800**
<i>Shinella</i> sp. UYSO24	40/50*	>1000**	0	300/350*
<i>Stenotrophomonas</i> sp. UYSO27	>450**	>1000**	>650**	>800**
<i>G. diazotrophicus</i> PAI-5	50/100*	200/250*	40/50*	50/100*

STR: estreptomycinina, AMP: ampicilina, KAN: kanamicina, SPC: espectinomicina. 0: NO resistente, * Resistente / NO resistente. ** Resistente a concentraciones mayores. En negrita se destacan los valores mayores.

2.2 Características promotoras del crecimiento vegetal

2.2.1 Producción de sideróforos

Una de las características de PCV evaluada fue la capacidad de las cepas de producir sideróforos. De las 9 cepas evaluadas, 2 produjeron sideróforos en las condiciones experimentales establecidas, presentando valores significativamente inferiores a los controles positivos (gráfico 2 y figura 1).

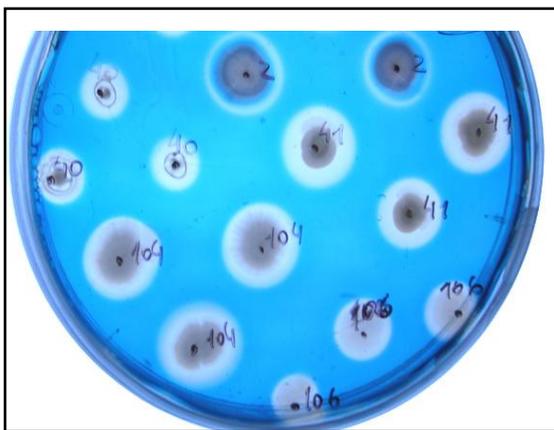
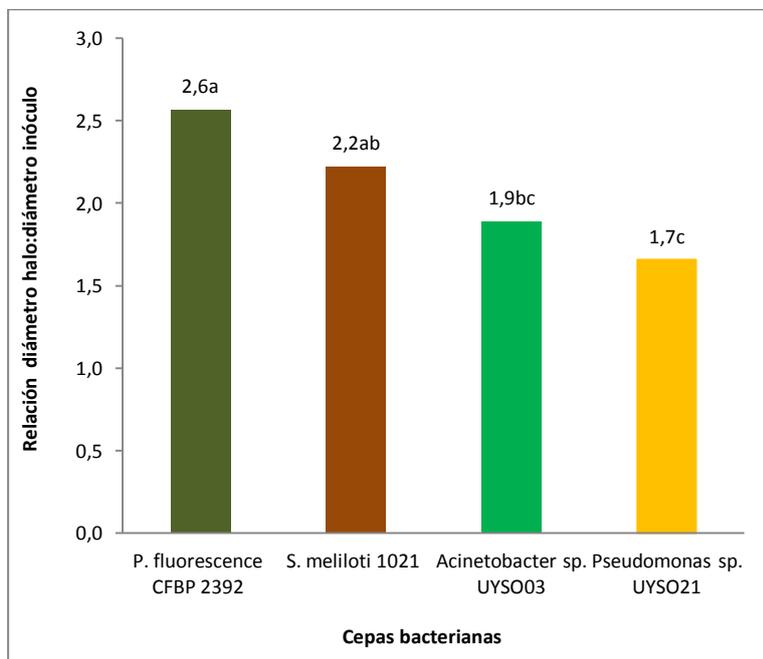


Figura 1.- Visualización del halo naranja producido por bacterias diazótrofas endófitas de caña en placas con medio CAS.

2.2.2 Capacidad antagónica a hongos fitopatógenos

Otra característica de estudio de interés agrícola fue la capacidad de controlar fitopatógenos comúnmente encontrados en cultivos. En general las cepas estudiadas mostraron alto control de los hongos fitopatógenos siendo *Pantoea* sp. UYSO13 y *G. diazotrophicus* PAI-5 las que inhibieron el crecimiento de todos los hongos ensayados. A su vez, *Acinetobacter* sp. UYSO03 inhibió a *F. oxysporum* f.sp. *cepae*, *F. oxysporum* f.sp. *fragariae* y *F. graminearum* 06005, y *Shinella* sp. UYSO24 inhibió a *F. graminearum* 02026. Como se puede observar en los gráficos 3A y 3B, la cepa *G. diazotrophicus* PAI-5 mostró porcentajes de inhibición con respecto al control igual o superior al 50% y *Acinetobacter* sp. UYSO03 y *Pantoea* sp. UYSO13 mostraron porcentajes de inhibición entre un 40 y 50% para *F. oxysporum* f.sp. *cepae* y *F. oxysporum* f.sp. *fragariae*. En el gráfico 3C se observa que la cepa que tuvo mayor porcentaje de inhibición de *F. graminearum* 06005 fue *Pantoea* sp. UYSO13. Si bien, *F. graminearum* 02026, no fue inhibido por la cepa *Acinetobacter* sp. UYSO03, quien mostró inhibición del crecimiento de los restantes patógenos evaluados, *Shinella* sp. UYSO24 inhibió a este patógeno, mostrando el mayor porcentaje de inhibición (15%) (gráfico 3D).

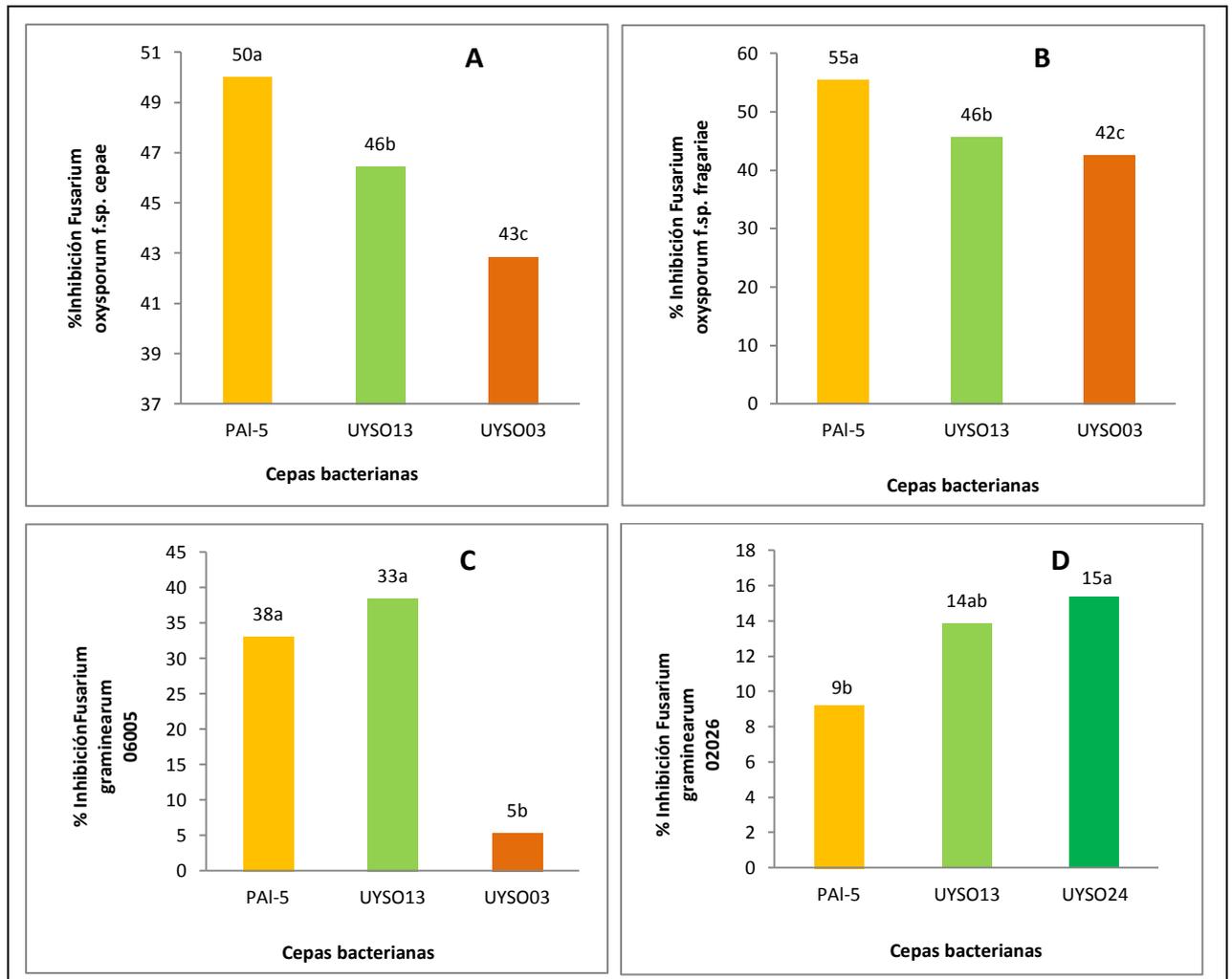


Gráfico 3.- Porcentaje de inhibición del crecimiento de los cuatro fitopatógenos por las cepas diazótrofas endófitas de caña. Cepas bacterianas: *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Pantoea* sp. UYSO13, *Shinella* sp. UYSO24, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI-5. **A-** % de inhibición de *F. oxysporum* f.sp. *cepae*. **B-** % de inhibición de *F. oxysporum* f.sp. *fragariae*. **C-** % de inhibición de *F. graminearum* 06005. **D-** % de inhibición de *F. graminearum* 02026. n=3. Letras diferentes en cada columna de cada gráfico indican diferencias significativas (LSD Fisher $\alpha \leq 0.05$).

2.3 Producción de enzimas pectinolíticas y endoglucanasas

Con la finalidad de conocer si las cepas en estudio producen enzimas hidrolíticas, se les determinó *in vitro* su capacidad de hidrolizar CMC y pectina lo que evidenciaría la presencia de actividad endoglucanasa y pectinolítica respectivamente. En el gráfico 4A se presentan los resultados de las 5 cepas bacterianas que formaron un halo traslúcido alrededor del inóculo en el medio con pectina (figura 2A). Si bien la cepa control *R. terrigena* mostró mayor producción de enzimas pectinolíticas, se destacó *Acinetobacter*

sp. UYSO03 por presentar la mayor capacidad de hidrolizar pectina, con un valor de relación de 2,07 (diámetro halo:diámetro inóculo).

En el ensayo de actividad endoglucanasa no se observó halo de hidrólisis alrededor de ninguno de los inóculos. Sin embargo, luego de retirar las colonias y lavar la superficie de la placa con NaCl, se pudieron distinguir zonas claras en el medio de cultivo, indicando hidrolización de la CMC debajo del inóculo (figura 2B). Si bien 6 cepas hidrolizaron CMC, se observó mayor actividad en *Shinella* sp. UYSO24, al ser comparado con las demás cepas, incluyendo el control positivo. A su vez, no se observaron diferencias significativas entre la cepa control *Pseudomonas* sp. y las otras cepas evaluadas (gráfico 4B).

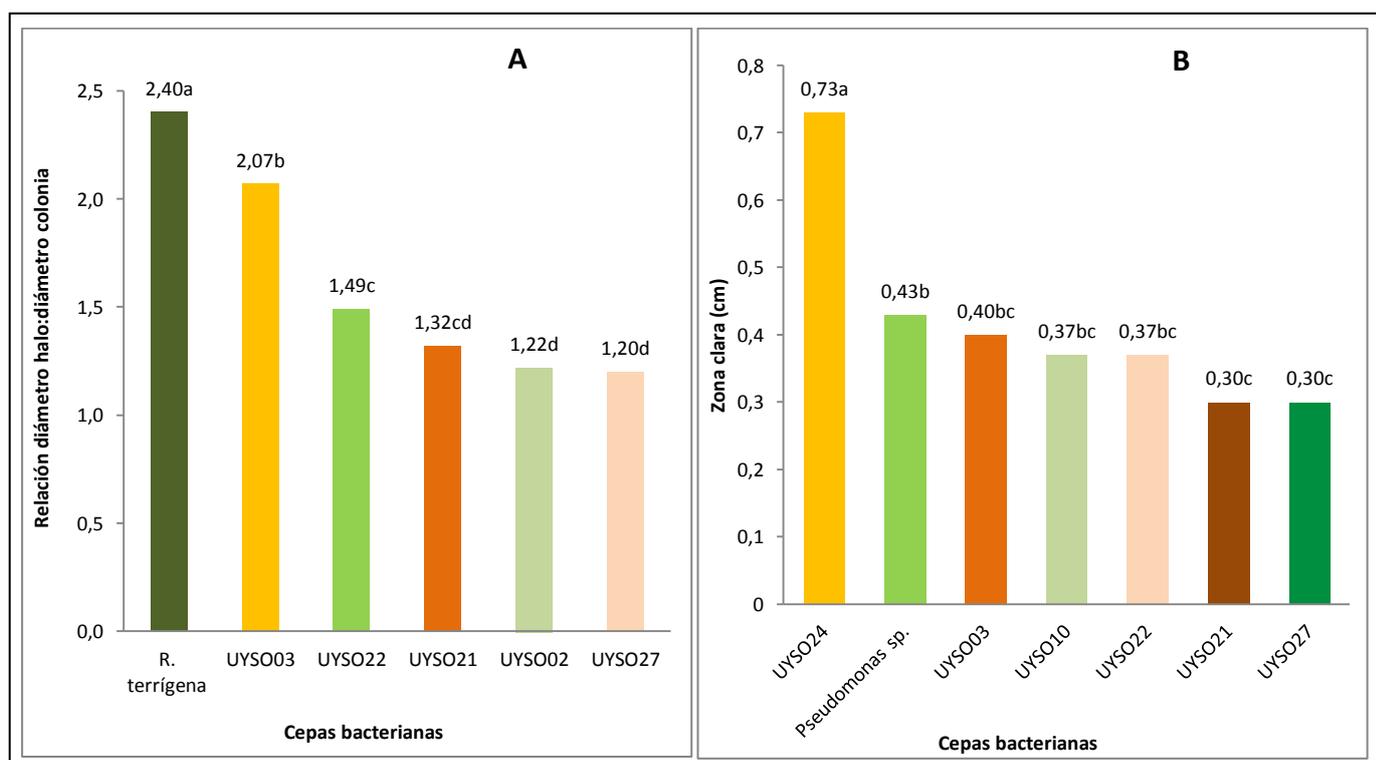


Gráfico 4.- Cepas endófitas diazótrofes de caña productoras de enzimas hidrolíticas **(A)** Relación diámetro del halo:diámetro del inóculo de las cepas productoras de enzimas pectinolíticas. **(B)** Medida de la zona clara (cm) producida por las cepas con actividad endoglucanasa. Cepas bacterianas: *Achromobacter* sp. UYSO02, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Enterobacter* sp. UYSO10, *Pseudomonas* sp. UYSO21, *Rhanella* sp. UYSO22, *Shinella* sp. UYSO24, *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, *Raoultella terrigena* (control positivo para pectina) y *Pseudomonas* sp. (control positivo para CMC) . n=3. Letras diferentes indican diferencias significativas (LSD Fisher $\alpha \leq 0.05$).

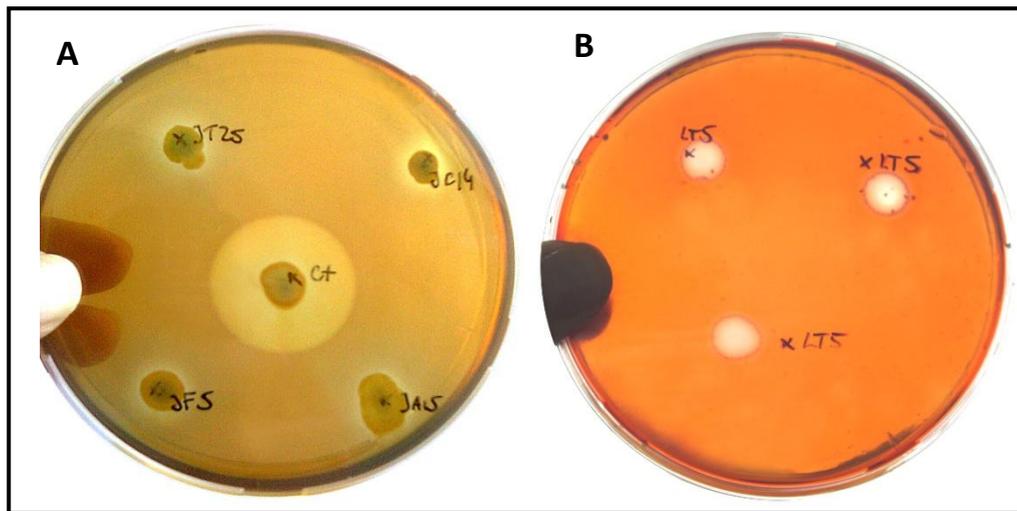


Figura 2.- Cepas endófitas diazótroficas de caña productoras de enzimas hidrolíticas. **(A)** Actividad pectinolítica. **(B)** Actividad endoglucanasa.

3. DISCUSIÓN

El estudio de las características fisiológicas y bioquímicas de la microbiota endófitas de la caña de azúcar constituye uno de los pilares fundamentales de las nuevas tecnologías relacionadas a ese cultivo. Estas tecnologías posibilitarán el desarrollo de prácticas de producción sustentable, dirigidas hacia la explotación racional de los recursos naturales y la reducción del uso de sustancias químicas.

Las cepas aisladas de caña de azúcar tienen una alta versatilidad al uso de las fuentes de C y N evaluadas. Esta característica fundamental les proporciona una mayor capacidad de crecer en diferentes condiciones de disponibilidad de nutrientes. La sacarosa y la glucosa fueron las fuentes de C más utilizadas por las bacterias. Justamente, la sacarosa, disacárido formado por glucosa y fructosa, es el azúcar que se encuentra entre un 8 y 15% en los tallos de la caña (Fuentes-Ramírez y col., 1999). A su vez, la utilización de la sacarosa al 10 y 20% superó al azúcar de caña no refinada (acnr). Sin embargo, en la sacarosa la concentración óptima de crecimiento bacteriano fue al 0,5%, mientras que

en la acnr fue al 10%, coincidiendo con la concentración interna de sacarosa en la planta de caña.

Una característica importante que se destacó en los resultados obtenidos, fue que todas las cepas crecieron en glicerol y acnr, fuentes económicas de C y accesibles en nuestro país, señalándose como propiedad positiva en la formulación de medios de cultivo bacterianos a escala industrial.

G. diazotrophicus PAI-5 fue la única cepa que no creció en ácido málico, resultado que coincide con Álvarez y Martínez-Drets (1995), quienes demostraron que dicha bacteria no utiliza ácidos carboxílicos como succinato, fumarato y malato, los cuales inhiben la actividad nitrogenasa y el crecimiento en medios que los contengan.

Las bacterias diazótroficas crecen sin una fuente de N en el medio, como se observó en este trabajo con los medios de aislamientos. Sin embargo el agregado de una pequeña dosis de N al medio de cultivo puede facilitar un crecimiento inicial más rápido de las bacterias, favoreciendo los tiempos de crecimiento si se piensa a nivel de producción industrial. En este trabajo, aunque se observó que las cepas bacterianas crecieron en todas las fuentes de N evaluadas, las más utilizadas fueron los aminoácidos y el cloruro de amonio, indicando que las bacterias son capaces de crecer tanto en fuentes orgánicas como inorgánicas de N. Estos resultados concuerdan con estudios realizados por Tejera y col. (2004) que demostraron que *G. diazotrophicus* PAI-5 crece en medio LGI-P conteniendo diferentes aminoácidos como fuentes de N. Específicamente informaron que aminoácidos como asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico y glutamina en concentración de 10mM, incrementaron el crecimiento de la cepa en comparación con 10mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de N.

Sería importante en un futuro estudiar el efecto de las fuentes de C y N sobre la capacidad de fijación de N_2 de las bacterias. Existen trabajos donde se ha demostrado que la presencia de trazas de N inhibe la FBN de cepas diazótroficas. Por ejemplo, Tejera y col. (2004) demostraron aplicando la técnica de reducción de acetileno (ARA) *in vitro*, que el aminoácido asparagina (10mM) disminuye la actividad nitrogenasa de *G. diazotrophicus* cerca del 24% y que $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 y 15mM) causa el 18 y 32% de inhibición respectivamente, mientras que el KNO_3 (5 y 15mM) inhibe solamente el 4 y

17% respectivamente. Resultados similares fueron encontrados por Rodríguez Chang y col. (2005) aplicando la misma técnica, donde valores muy bajos de la actividad nitrogenasa de *G. diazotrophicus* fueron observados con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, arginina y asparagina, y valores mayores se obtuvieron con KNO_3 y sin N.

Investigaciones han determinado que *G. diazotrophicus* y *Herbaspirillum* spp. fijan N_2 en presencia de bajas concentraciones de extracto de levadura y nitrato (<10mM) (Muthukumarasamy y col., 1999). Además, la sensibilidad de la nitrogenasa al oxígeno y N combinado de *G. diazotrophicus* depende de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. Una concentración del 10% de sacarosa disminuye la asimilación del N combinado y algunos aminoácidos, favoreciendo la expresión de la nitrogenasa aun en su presencia. Reis y Döbereiner (1998) demostraron que la actividad de la nitrogenasa es menos inhibida con NH_4Cl (5 mM) cuando *G. diazotrophicus* crece en un medio conteniendo 10% de sacarosa comparado con un medio con 1% de sacarosa. Este mecanismo resulta de gran interés, si se tiene en cuenta que muchas endófitos diazótrofes, como *G. diazotrophicus*, viven en ambientes ricos en sacarosa, por lo que su nitrogenasa podría estar activa, aún cuando la bacteria disponga de compuestos nitrogenados (Reis y Döbereiner, 1998).

Rodríguez Chang y col. (2005) midieron por ARA la actividad nitrogenasa de cepas de *G. diazotrophicus*, *E. agglomerans* y *B. licheniformis* aisladas de caña de azúcar y encontraron que la fructosa, sacarosa, guarapo y glucosa fueron los azúcares que más favorecieron dicha actividad. Según Limmer y Drake (1998), esto se explicaría por el rendimiento de ATP obtenido por molécula de carbohidrato utilizada, por lo que un mayor rendimiento favorece tanto el crecimiento como la actividad nitrogenasa de los diazótrofes. Además, la fructosa y la sacarosa son azúcares muy abundantes en estas plantas (Fuentes-Ramírez y col., 1999), por lo que es lógico asumir que estas bacterias poseen las enzimas necesarias para su degradación.

En este trabajo se observó que *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Rhanella* sp. UYSO22 produjeron una cápsula gomosa según la fuente de C y N, probablemente exopolisacáridos (EPS). El crecimiento bacteriano frecuentemente está acompañado por la producción de polisacáridos los cuales se localizan fuera de la pared celular. Estos EPS

se encuentran como cápsulas unidas a la bacteria o ésta los libera al medio. Un EPS puede tener importancia para una bacteria ya sea en procesos de adhesión, infección (Hettwer y col.,1995) o protección (Gamar y col.,1997, von Wriqth y col., 1987) pero también pueden tener valor comercial por sus propiedades gelificantes, emulsificantes y otros pueden servir como fuente importante de monosacáridos.

Otro factor de interés que aporta información a las interacciones planta-microorganismo es la resistencia intrínseca que tiene una cepa bacteriana frente a determinado antibiótico. Esta característica se trasmite de forma vertical de generación en generación, confiriéndole una ventaja competitiva frente a otras bacterias. Se evidenció que todas las cepas presentaron resistencia a por lo menos un antibiótico, destacándose *Rhanella* sp. UYSO22 y *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, por presentar resistencia intrínseca a todos los antibióticos y en las concentraciones más altas. Esta información generada puede servir para la realización de estudios futuros de biología molecular y para la producción de un inoculante.

La promoción del crecimiento vegetal por las bacterias se evidencia por diversos mecanismos, entre ellos mayor disponibilidad de nutrientes producción de fitohormonas o control de fitopatógenos. En esta tesis se encontraron 2 cepas capaces de producir sideróforos: *Acinetobacter* sp. UYSO03 y *Pseudomonas* sp. UYSO21. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular capaces de unir hierro con una alta especificidad. Son producidos por microorganismos en condiciones de baja presencia de hierro y juegan un importante papel en las interacciones microbianas (Rojas, 2005). Algunas bacterias han desarrollado sistemas de captación de hierro de alta afinidad para incorporar ese elemento a su célula (Neilands, 1981). El sistema típico implica un sideróforo y una proteína que lo transporta al interior de la célula.

Otra capacidad de PCV evaluada de las bacterias estudiadas fue el control de 4 hongos patógenos del género *Fusarium*. Se destacan *Pantoea* sp. UYSO13 y *G. diazotrophicus* PAI-5 por inhibir el crecimiento de todos los fitopatógenos evaluados.

Las especies de *Fusarium* pueden ser fitopatógenos económicamente importantes del arroz, caña de azúcar, sorgo y maíz. En el caso de caña, *Fusarium moniliforme* produce la enfermedad “Cogollo retorcido”, causando diversos síntomas y disminuyendo significativamente el rendimiento del cultivo.

Nuestros resultados sobre el género *Pantoea* como cepa controladora concuerdan con los de investigaciones de países de la Comunidad Europea. En esos países, *Pantoea agglomerans* (CPA-2) está siendo actualmente estudiada por su efectividad en el control de enfermedades postcosecha en citrus y manzana. Su uso como agente de control biológico fue patentado en España en 1999 (Costa y col., 2001).

La importancia de las bacterias PCV se ha puesto de manifiesto por los estudios realizados por Logeshwarn y col. (2011), donde *G. diazotrophicus*, especie usada como control positivo en nuestro trabajo, controló al hongo *Fusarium oxysporum in vitro*, encontrando que la producción de antibióticos Pioluteorina y compuestos volátiles suprimen al patógeno. A su vez, resulta interesante que Arencibia y col. (2006) sugieran que *G. diazotrophicus* es capaz de generar respuestas de defensa de las plantas contra *Xanthomonas albilineans*, un patógeno de caña.

Si bien algunas bacterias tienen la capacidad de producir sideróforos y otras de biocontrolar patógenos, es interesante mencionar la relación entre estas dos características de promoción del crecimiento vegetal que puede existir en bacterias que poseen ambas características. La producción de sideróforos por una bacteria PCV le confiere una ventaja competitiva frente a microorganismos que no son capaces de producirlos, inhibiendo el crecimiento de patógenos en condiciones limitantes de hierro (Ardon y col., 1998). Esto fue evidenciado por Valencia-Cantero y col. (2005), quienes determinaron que la cepa *P. fluorescens* ZUM80 productora de sideróforos, logra inhibir el crecimiento *Fusarium oxysporum* en condiciones limitantes de hierro.

Finalmente el estudio de la producción de enzimas pectinolíticas y endoglucanasas por las bacterias endófitas diazótrofes se fundamentó asumiendo que estas enzimas facilitarían el ingreso activo de las bacterias a las plantas. Como se sabe, las paredes

vegetales están constituidas por celulosa, hemicelulosa pectina y lignina (Vazquez y col., 1992). El polímero más conocido es la celulosa, que constituye entre un 20-30% del peso seco de la mayoría de las paredes vegetales primarias. Las enzimas que hidrolizan los componentes de la pared vegetal, como celulasas y pectinasas, producen la rotura de paredes celulares y desintegración de tejidos. También pueden jugar un papel importante en la penetración intra e intercelular de los tejidos del huésped (Vazquez y col., 1992).

En este trabajo, *Acinetobacter* sp. UYSO03 se destacó por presentar la mayor capacidad de hidrolizar pectina y la cepa *Shinella* sp. UYSO24 por su mayor capacidad de hidrolizar CMC. Es interesante destacar que la cepa *Acinetobacter* sp. UYSO03 además de producir enzimas pectinolíticas y endoglucanasas, también fue capaz de producir sideroforos y controlar los hongos fitopatógenos del género *Fusarium* evaluados.

Nuestros resultados concuerdan con los de Pariona-Llanos y col. (2010), quienes encontraron que altas cantidades de pectinasas fueron liberadas por el 66% de las bacterias aisladas de plantas de caña de azúcar tratadas con fertilizantes convencionales, mientras que cantidades más altas de celulasas fueron liberados por el 80% de las cepas aisladas a partir de la caña tratada con fertilizantes orgánicos, sugiriendo que la capacidad de producir enzimas hidrolíticas debe ser una característica importante para el establecimiento de los microorganismos en los tejidos vegetales. También se demostró que *Azoarcus* sp. BH72 es capaz de ingresar a las raíces de plantas de arroz mediante un proceso activo mediado por una enzima exoglucanasa con actividad celobiohidrolasa, una α -glucosidasa, así como una endoglucanasa (Reinhold-Hurek y col., 2007). Según varios autores, *H. seropedicae* Z67 y *H. rubrisubalbicans* M4, para infectar las raíces de arroz, deben poseer celulasas y/o pectinasas para degradar la pared celular vegetal (James y col., 2002, Ebeltagy y col., 2001; Verma y col., 2001; Kovtunovych y col., 1999; Reinhold-Hurek y Hurek, 1998, 1998a; Hallmann y col., 1997). La producción de enzimas por parte de fitopatógenos que degradan la pared celular suele estar relacionada con la respuesta de defensa de la planta (Hallmann y col. 1997), pero en bacterias endófitas diazótrofes no patógenas, como *H. seropedicae* Z67,

Azoarcus, *Azospirillum* y *Klebsiella* spp. (Kovtunovych y col., 1999; Reinhold-Hurek y col., 1993; Patriquin y col., 1983), la producción de estas enzimas es relativamente baja e incluso completamente suprimida cuando la bacteria se ha establecido dentro de la planta, fundamentando la ausente o leve respuesta de defensa del huésped. Esta condición puede ser una explicación a la baja hidrólisis de CMC.

En este estudio se evidencio, que la cepa *Acinetobacter* sp. UYSO03 además de tener las características de PCV por la cual fue seleccionada (solubilización de fósforo, actividad de nitrogenasa y AIA), se añaden las de producción de sideróforos, biocontrol de hongos fitopatógenos y producción de enzimas hidrolíticas. En este capítulo se puso en evidencia que las características bioquímicas, fisiológicas y de PCV encontrados en las cepas de este trabajo constituyen una base fundamental para la selección de aquellas promisorias a evaluar en condiciones no controladas.

CAPITULO 4

Respuesta de las plantas de caña de azúcar a la inoculación con bacterias endófitas diazotrofas.

Este capítulo se dirigió a conocer la respuesta agronómica de la caña de azúcar a la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PCV) promisorias en forma individual o en consorcio. La respuesta a la inoculación bacteriana con cultivos líquidos o en turba se evidenció en variables cuantitativas del crecimiento vegetal obtenidas en condiciones semicontroladas (invernáculo) y en campo.

1. METODOLOGÍA

1.1 Respuesta de la caña de azúcar a la inoculación bacteriana

1.1.1 Ensayo en invernáculo

Se utilizaron macetas conteniendo como sustrato 1,5kg de arena-suelo en una proporción 1:1. El suelo fue extraído (0-20 cm de profundidad) de la zona experimental de Bella Unión (2 muestras), secado y tamizado antes de su uso. La arena fue lavada con agua corriente y esterilizada dos veces a 121°C durante 15' en autoclave. El análisis físico-químico del suelo fue realizado en el Laboratorio de Suelos, IECA-UNCIEP, Facultad de Ciencias (cuadro 1). El %N total del suelo fue bajo, lo cual posibilitó su uso en este ensayo.

Cuadro 1.- Características del suelo extraído de la zona experimental de Bella Unión y utilizado en el ensayo de invernáculo

Muestra	pH H ₂ O	pH KCl	M.O. %	N %	P ppm	N-NO ₃ ppm	K meq/100 g	Ca meq/100 g	Mg meq/100 g	Na meq/100 g
1	5,7	4,7	1,1	0,067	16	1,6	0,20	3,6	0,9	0,07
2	5,7	4,7	1,2	0,064	16	1,7	0,18	3,5	0,9	0,07

El diseño fue completamente al azar con 8 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos fueron inoculados con: *Achromobacter* sp. UYSO02, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Enterobacter* sp. UYSO10, *Pantoea* sp. UYSO13, *Pseudomonas* sp. UYSO21, *Rahnella* sp. UYSO22, *Shinella* sp. UYSO24, *Stenotrophomona* sp. UYSO27, la mezcla de las 8 cepas anteriores (denominado MIX) y la cepa *G. diazotrophicus* PAI5 como referencia. A las plantas del tratamiento control positivo se le agregó 20ml de una solución de urea (equivalente a 25Kg N/ha) por maceta a los 20, 35, 65 y 95 días desde la siembra, mientras que en el control negativo las plantas no se inocularon ni fertilizaron.

Se sembraron esquejes de la variedad LCP 85-384, traídos de Bella Unión (acondicionados en papel y bolsas plásticas) y en el laboratorio se lavaron con agua corriente, desinfectaron superficialmente con etanol 70% y cortaron en trozos (4-5 cm), dejando una yema por esqueje.

Las macetas fueron regadas con agua destilada a capacidad de campo y a los 3 días se sembraron 3 esquejes por maceta y se dejó 1 luego del raleo. Las macetas se colocaron en oscuridad en el cuarto de crecimiento de plantas controlado a 28°C y 60% de humedad relativa (HR), para facilitar la germinación de las yemas (5-7 días). Posteriormente se las expuso a un fotoperíodo de luz:oscuridad de 14:10h con intensidad luminosa de 5750-6700 luxes. Cuando las plántulas tuvieron aproximadamente 20cm de altura se trasladaron al invernáculo para favorecer su crecimiento.

Los inóculos de cada cepa se prepararon en matraces de 200ml de medio DYG`s con D.O. entre 0,6-0,8 a 560nm. Se utilizaron 20ml de inóculo por maceta y la inoculación se realizó a los 20 y 65 días luego de la siembra. El riego de las plantas se hizo en el plato inferior de la maceta según las necesidades de las plantas, utilizando agua corriente y una vez por semana solución nutritiva Faharaeus sin-N (Faharaeus, 1957).

A los 4 meses de la siembra se determinó el diámetro del tallo (mm) y altura de las plantas (cm). Las raíces y parte aérea se secaron por separado a 65°C (hasta peso constante) para la obtención del peso seco aéreo (PSA) y radical (PSR) en g/planta. La parte aérea se molió finamente para análisis de N-total por el método de Kjeldhal. Para este análisis se enviaron 0,5g de muestra en tubos Eppendorf al Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía, UdelaR.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias empleando el test de LSD Fisher ($\alpha \leq 0.05$) (Infostat, 2008).

1.1.2 Ensayo en campo

Se eligió un sitio en el campo experimental de ALUR (Bella Unión), de forma de que la preparación del suelo y el manejo de caña en el ensayo fuera lo mas similar posible a las siembras comerciales de caña de la zona. El análisis físico-químico del suelo fue realizado en tres profundidades (0-20cm, 20-40cm y 40-60cm) en el Laboratorio de Suelos, IECA-UNCIEP, Facultad de Ciencias (cuadro 2). Los valores de contenido total de N en el suelo fueron bajos en las tres profundidades, y la mayoría de las otras características no presentaron diferencias marcadas en profundidad, con excepción del contenido de fósforo (P), calcio (Ca) y magnesio (Mg).

Cuadro 2.- Características del suelo utilizado en el ensayo de campo (Bella Unión) en muestras extraídas a diferentes profundidades.

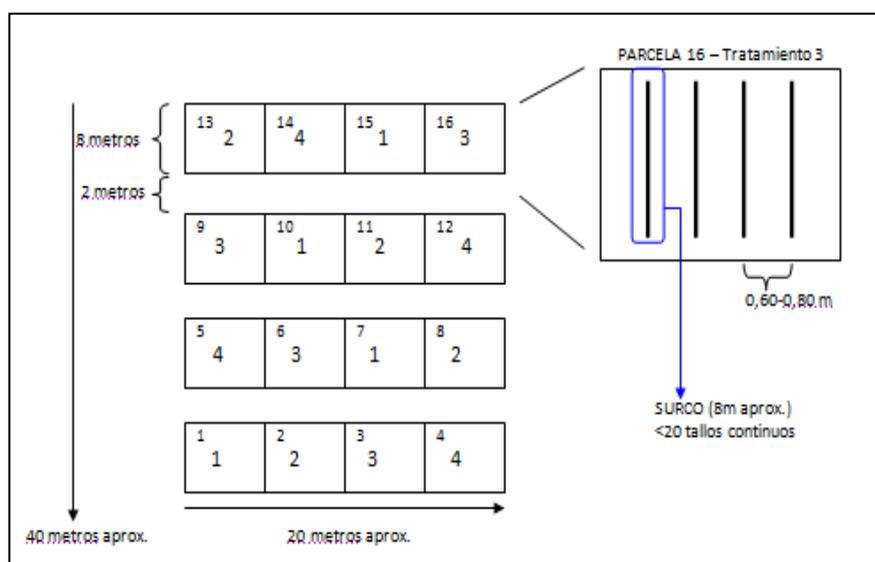
Profund.	pH H ₂ O	pH KCl	M.O. %	P ppm	N %	N-NO ₃ ppm	K meq/100 g	Ca meq/100 g	Mg meq/100 g	Na meq/100 g
0-20cm	6.8	5.8	1.1	8	0.053	0.9	0.11	9.7	1.7	0.25
20-40cm	6.7	5.5	1.0	6	0.055	0.7	0.14	12.6	2.2	0.36
40-60cm	6.7	5.4	0.9	3	0.048	0.7	0.20	15.6	2.5	0.46

El diseño fue de bloques completos al azar con 4 repeticiones. Cada bloque (4 en total) fue de 8m de ancho por 20m de largo separados entre sí por calles de 2m de ancho. Cada bloque estaba constituido por 4 parcelas (una por tratamiento) y cada parcela por 4 surcos separados por 0,60-0,80m (cuadro 3). Los surcos fueron abiertos con una sembradora convencional momentos antes de la siembra para evitar pérdida de humedad del suelo.

Las cepas a evaluar en el ensayo se seleccionaron teniendo en cuenta los resultados de la evaluación en suelo en invernáculo y los obtenidos por la inoculación de plantas de caña micropropagadas en el marco del Proyecto INIA FPTA-275; Taulé, 2011).

Se evaluaron 4 tratamientos en total: inoculación con *Enterobacter* sp. UYSO10; inoculación con *Shinella* sp. UYSO24; control positivo (fertilización con urea equivalente a 150Kg N/ha) y control negativo (sin inoculación y sin fertilización).

Cuadro 3.- Diagrama del ensayo realizado en el de campo experimental de ALUR, Bella Unión. Año 2011-2012



Números centrales corresponden a los tratamientos y números en vértices izquierdos corresponden a parcelas

Los inóculos fueron preparados 24h antes de instalar el ensayo. Las cepas crecieron en 400ml de medio DYG's, igualándose la D.O. (560 nm) de cada inóculo (entre 0,6-0,8). Dos bolsas de turba estéril (cedidas por Calister S.A.) se inyectaron estérilmente con

200ml de cada cepa, y se mezclaron manualmente. Con la finalidad de determinar la calidad y el comportamiento de las cepas en el soporte, adaptación, estabilidad y sobrevivencia, se realizaron recuentos en placa (medio DYG`s, ufc/g turba) a diferentes tiempos, 0, 7, 30, 60, 90 y 120 días luego de su preparación. En el momento de la siembra del ensayo, el personal de campo de ALUR cortó y preparó los esquejes de caña (40cm de largo y con 2-3 yemas) de la variedad LCP 85-384.

La inoculación de los esquejes de ambas cepas se realizó en tanques limpios. Se mezcló en 4 L de agua, 25g de inoculante y 80g de adherente S1 (Biagro S.A.) y se sumergieron los esquejes durante 10' para luego sembrarlos inmediatamente a razón de 20 esquejes continuos por surco (figura 1). La inoculación y la siembra se realizaron con todas las precauciones necesarias para evitar contaminación entre los tratamientos. Los esquejes se taparon inmediatamente de colocados en los surcos para evitar su desecación y previo al riego inicial se añadió al voleo fertilizante fosfatado (138 unidades de P/ha).



Figura 1.- Ensayo de inoculación en campo con las cepas *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 (campo experimental de ALUR, Bella Unión, Artigas). **(A)** Inoculación de los esquejes de caña con la cepa *Enterobacter* sp. UYSO10. **(B)** Siembra de los esquejes inoculados.

En la instalación y manejo del ensayo se siguió el paquete tecnológico recomendado por ALUR a los agricultores de caña. Por lo tanto, a los 5 días desde la siembra se aplicó

herbicida, a los 90 días se adicionó fertilizante potásico (160 unidades de K/ha) y a los 100 días se añadió, a las parcelas con N, 150 unidades de N/ha.

Con la finalidad de contar con una evaluación temprana del ensayo, se realizó un muestreo a los 3 meses de sembrado, diciembre-2011. Se determinó la altura y el número de hojas de 3 plantas elegidas al azar de los surcos centrales de cada parcela. Las hojas se secaron a 65°C (peso constante) y se pesaron obteniéndose el peso en gramos de las hojas de 3 plantas/parcela. Luego, se las molió finamente, para analizar el contenido de N-total por el método de Kjeldhal. El análisis de N-total se repitió en plantas colectadas a los 8 y 12 meses (cosecha final) de instalado el ensayo, mayo y setiembre-2012. Para este análisis se enviaron 0,5g de muestra en tubos Eppendorf al Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía, UdelaR. Por otra parte el personal de ALUR S.A. determinó a los 12 meses: 1) nº de tallos por hectárea (población), 2) rendimiento en toneladas/ha, 3) peso de tallos individuales, 4) % de azúcar (rendimiento industrial teórico), 5) rendimiento final en toneladas de azúcar/ha, 6) % de fibra, 7) daños por *Diatraea sacharalis*, 8) largo de cañas individuales (m), y 9) número de entrenudos/planta.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias empleando el test de LSD Fisher ($\alpha \leq 0.05$) (Infostat, 2008).

2. RESULTADOS

2.1 Ensayo en invernáculo

Una perspectiva aplicada y más natural de los estudios con bacterias aisladas y asociadas a caña de azúcar, se obtiene cuando se determina la respuesta a la inoculación de las plantas en condiciones ambientales poco controladas.

En un primer ensayo, se evaluó el desarrollo de caña inoculada con 8 cepas endófitas diazótrofes (caracterizadas en el capítulo 3) en macetas con suelo proveniente del área

de siembra de Bella Unión. Los resultados de ese ensayo en invernáculo se resumen en el cuadro 4.

Cuadro 4.- Respuesta de plantas de caña (variedad LCP- 85-384) a la inoculación con las bacterias diazótrofes endófitas de caña seleccionadas, en ensayo de invernáculo.

Tratamientos	Altura planta (cm)	Diámetro tallo (mm)	PSR (g)	PSPA (g)	Concentración de N PA (mg N/g PS)	Acumulación de N PA (mg N/planta)
C+	22,2 a	9,06 a	1,83 a	4,56 a	7,06 a	32,17 a
UYSO13	16,86 b	7,19 cd	1,45 bcd	2,92 b	4,98 ef	14,55 bcd
UYSO02	16,44 b	7,56 bcd	1,48 abc	2,24 cde	5,11 def	11,44 ef
MIX	16,43 b	7,38 bcd	1,10 de	2,59 bcd	5,09 ef	13,18 de
UYSO27	16,36 b	7,03 d	1,27 cd	2,72 bc	5,17 cdef	14,07 d
UYSO24	16,25 b	7,25 cd	1,35 bcd	2,67 bcd	6,10 bc	16,28 bc
UYSO03	16,25 b	7,99 b	1,38 bcd	2,64 bcd	4,89 f	12,90 de
PAI-5	16,19 b	7,41 bcd	1,27 cd	2,43 bcd	6,84 ab	16,61 b
UYSO10	16 b	7,72 bc	1,67 ab	2,36 cd	6,06 bcd	14,30 cd
UYSO22	15,57 bc	7,58 bcd	1,63 abc	2,67 bcd	5,10 cdef	13,86 d
UYSO21	14,43 cd	7,12 cd	1,48 abc	2,15 de	6,17 ab	13,25 de
C-	13,19 d	6,97 d	0,75 e	1,79 e	5,90 bcde	10,57 f

PSR: Peso seco radical; PSPA: peso seco parte aérea; PA: parte aérea. Tratamientos inoculados: *Achromobacter* sp. UYSO02, *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Enterobacter* sp. UYSO10, *Pantoea* sp. UYSO13, *Pseudomonas* sp. UYSO21, *Rhanelia* sp. UYSO22, *Shinella* sp. UYSO24, *Stenotrophomonas* sp. UYSO27, MIX: mezcla de las 8 cepas mencionadas anteriormente, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI-5, C+: urea equivalente a 100Kg N/ha y C-: sin N y sin inocular. En negrita se marcan los datos utilizados para calcular el % de incremento de concentración y acumulación de N de la PA con respecto al C-. n=3. Valores con diferente letra en cada columna son significativamente diferentes, test LSD-Fisher ($\alpha \leq 0,05$).

En general, la inoculación de caña, independientemente de la cepa, mostró diferencias significativas con el tratamiento control sin inocular (C-) en todas las variables evaluadas. La altura de la planta presentó diferencias significativas del C- en todos los tratamientos inoculados, excepto *Pseudomonas* sp. UYSO21. Con referencia al diámetro del tallo, las plantas inoculadas con *Acinetobacter* sp. UYSO03 y *Enterobacter* sp. UYSO10 se diferenciaron significativamente del C-, mientras que todos los tratamientos, a excepción del MIX, presentaron diferencias significativas del C- en PSR. En particular, es interesante destacar que las plantas inoculadas con *Achromobacter* sp. UYSO02, *Enterobacter* sp. UYSO10, *Pseudomonas* sp. UYSO21 y *Rhanelia* sp. UYSO22, no

difierieron con el control con N (C+). En PSPA, la mayoría de los tratamientos inoculados mostraron diferencias significativas con el C- (cuadro 4).

Se evidenció un probable aporte de N por la fijación ya que las plantas de los tratamientos inoculados presentaron en promedio un 36% de incremento en la acumulación de N de la PA comparado con las del C-. A su vez, la inoculación con *Shinella* sp. UYSO24, *G. diazotrophicus* PAI-5, *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Pseudomonas* sp. UYSO21 produjo en promedio un 6% de incremento en la concentración de N de la PA con respecto al C- (cuadro 4).

En resumen, la inoculación de caña produjo incrementos significativos en variables tan importantes como el PSR y PSPA así como en la concentración y acumulación de N en las plantas. Entre las cepas, se destaca *Enterobacter* sp. UYSO10 por diferir significativamente con el C- en todas las variables. Los tratamientos que mostraron diferencias con el C- en al menos 5 variables fueron: *Acinetobacter* sp. UYSO03, *Shinella* sp. UYSO24 y *G. diazotrophicus* PAI-5. Este presentó los mayores valores de concentración y acumulación de N en la PA luego del C+.

2.2 Ensayo en campo

Los resultados positivos de la inoculación de caña en invernáculo llevaron a su corroboración en campo con la inoculación de *Shinella* sp. UYSO24 y *Enterobacter* sp. UYSO10, cepas con características de PCV promisorias. Por primera vez se prepararon inoculantes en turba estéril para caña a escala experimental y se aplicaron en el ensayo en campo. Se obtuvo una alta calidad de los inoculantes de ambas cepas una vez preparados (tiempo 0) al igual que su sobrevivencia. *Enterobacter* sp. UYSO10 presentó una concentración inicial (tiempo 0) de 10^9 ufc/g de turba y aumentó hasta los 30 días un orden de magnitud (10^{10} ufc/g) para disminuir a 10^9 ufc/g al cabo de los 120 días. Para el caso de la cepa *Shinella* sp. UYSO24, a tiempo 0 se obtuvo un valor de 10^{10} ufc/g de turba, aumentando a los 7 días a 10^{12} ufc/g, y disminuyendo a 10^{10} ufc/g a los 90 días y a 10^9 ufc/g a los 120 días de preparado.

En el cuadro 5 se muestran los resultados de la inoculación de caña en campo en 2 etapas tempranas del cultivo, a los 3 y 8 meses de cultivo y aquellos obtenidos en la cosecha final, 12 meses después de la siembra.

Cuadro 5.- Respuesta de las plantas de caña en campo a la inoculación con dos cepas diazótrofes endófitas de caña. Datos a los 3, 8 y 12 meses después de sembrado el ensayo.

Tratamiento	3 meses					8 meses
	PSPA (g)	Altura planta (cm)	N° hojas	Concentración de N PA (mg N/g PS)	Acumulación de N PA (mg N/planta)	% N-total PA
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	22,92 a	90,33 b	12,00 a	18,85 a	432,04 a	1,58 a
<i>Shinella</i> sp. UYSO24	21,24 a	96,67 ab	10,00 c	17,55 a	372,76 ab	1,58 a
C+	17,67 a	93,33 ab	11,33 ab	20,08 a	354,73 b	1,63 a
C-	17,07 a	104,33 a	10,33 bc	19,28 a	329,02 b	1,57 a
Tratamiento	12 meses					
	% N-total PA	Altura tallo* (m)	ENTR* (nº)	PT* (g)	LARCAÑA* (cm)	DIATINT* (% daño)
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	0,59 a	2,1 a	14,32 a	430,66 a	118,75 a	4,35 a
<i>Shinella</i> sp. UYSO24	0,61 a	2,1 a	15 a	468,51 a	122,75 a	2,08 a
C+	0,57 a	2,1 a	14,88 a	426,22 a	123,5 a	1,85 a
C-	0,59 a	2,08 a	13,95 a	436,0 a	123,75 a	1,63 a
Tratamiento	12 meses					
	TCH* (t/ha)	RIT* (% azúcar)	TAH* (t azúcar/ha)	FIB* (%)	NTH* (nº tallos/ha)	
<i>Enterobacter</i> sp. UYSO10	54,57 a	11,25 a	6,14 a	13,25 a	126,68 a	
<i>Shinella</i> sp. UYSO24	54,09 a	11,25 a	6,14 a	13,63 a	116,0 a	
C+	54,69 a	11,16 a	6,12 a	13,85 a	128,49 a	
C-	48,44 a	11,80 a	5,73 a	13,7 a	111,42 a	

PSPA: peso seco parte aérea; PA: parte aérea; C+: urea equivalente 150 unidades de N/ha; C-: sin N y sin inocular. Contenido total de N en la parte aérea determinado por Kjeldhal (%). Asterisco: medidas realizadas por los técnicos de ALUR en Bella Unión. ENTR: número de entrenudos, PT: peso de tallos individuales (g), LARCAÑA: largo de cañas individuales (cm), NTH: n° tallos/ha (población), TCH: toneladas caña/ha (rendimiento cultural), RIT: rendimiento industrial teórico (% de azúcar), TAH: toneladas azúcar/ha (rendimiento final), FIB: Fibra (%), DIATINT: % daños por *Diatraea saccharalis*. n=4. Medidas que tienen diferente letra en cada columna son significativamente diferentes (LSD-Fisher ($\alpha \leq 0,05$)).

A los 3 meses de cultivo, los valores de PSPA de los tratamientos inoculados dieron más altos pero no difirieron significativamente de C+ y C- (cuadro 5). En la variable número de hojas/planta, la inoculación con *Enterobacter* sp. UYSO10 presentó un valor más alto y significativo que el de las plantas C- (cuadro 10). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en la concentración de N de la PA, pero si en la acumulación de N/planta para *Enterobacter* sp. UYSO10 comparado con ambos

controles (cuadro 5). Con respecto a la altura de la planta (3 meses), se observó que el C- fue quien obtuvo un valor mayor a los restantes tratamientos, diferenciándose significativamente del tratamiento inoculado con *Enterobacter* sp. UYSO10 (cuadro 10). A los 8 y 12 meses de cultivo se determinó el %N-total de la PA, sin encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos. Las variables de rendimiento y aquellas de interés industrial para ALUR, no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos inoculados y sin inocular a los 12 meses de cultivo (cuadro 5).

3. DISCUSIÓN

El principal reto del cultivo de caña de azúcar en nuestro país es la producción de sacarosa por unidad de área a bajo costo. No obstante, últimamente se ha añadido un nuevo desafío, el de incrementar los rendimientos sin dañar el medio ambiente y en especial el recurso suelo no renovable. Cualquier monocultivo a largo plazo conlleva un uso excesivo de los suelos, con descenso en su contenido de materia orgánica y nutrientes y por lo tanto en el rendimiento/ha. La caña de azúcar en nuestro país no escapa a esa realidad y la disminución del rendimiento de los cultivos se relaciona con factores bióticos y abióticos adversos (F. Hackenbruch, comunicación personal). Se prioriza entonces como alternativa al agregado de grandes cantidades de fertilizantes, la búsqueda de bacterias en el propio ambiente natural del cultivo, que aporten macronutrientes y/o que muestren otros mecanismos de PCV, a fin de bajar el uso de fertilizantes sin afectar los rendimientos del cultivo. Debe tenerse en cuenta que se ha comprobado un aporte de la FBN en gramíneas forrajeras C₄ y en caña de azúcar, principalmente en condiciones ecológicas que favorezcan dicho proceso, alta temperatura del suelo y contenido hídrico, alta irradiación y exudación radical (Marschner, 1995).

Los resultados hasta ahora, nos condujeron a conocer algo más de las asociaciones bacterias-caña de azúcar, en diferentes condiciones ambientales, invernáculo y campo.

Así mismo, responder a la pregunta de ¿qué respuesta se tiene cuando el esqueje de caña tiene además del inóculo interno (natural) un inóculo bacteriano externo?

El hecho de disponer de cepas bacterianas aisladas de condiciones naturales, presumiblemente endófitas de caña de azúcar y con características promisorias de PCV, nos condujo a la inoculación de plantas y su evaluación agronómica en condiciones naturales.

Las cepas *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 mostraron características de PCV promisorias en invernáculo. Los valores de altura de las plantas, peso seco radical y biomasa aérea difirieron significativamente de las plantas control sin inocular. Su potencial de PCV también se observó en que las plantas inoculadas con ellas mostraron mayor concentración y acumulación de N en la parte aérea. La diferencia en acumulación de N en las plantas inoculadas comparadas con el control C- podría tener origen en las bacterias introducidas con la inoculación y/o en una interacción positiva con aquellas nativas presentes dentro del esqueje. Llama la atención que en general la respuesta a la inoculación de caña con géneros de bacterias diferentes fue homogénea en invernáculo y que se detectaron diferencias significativas con las plantas control en variables de importancia agronómica como PSR, PSPA y altura de plantas.

En otras gramíneas también se han observado resultados positivos al ser inoculadas con bacterias PCV. Por ejemplo Ferlini Micheli y Díaz (2006) encontraron que la inoculación con *Azospirillum brasiliense* en plantas de sorgo y maíz provocó un aumento en el peso seco radical y número de plantas/ha. A su vez, en plantas de caña de azúcar inoculadas con bacterias PCV de diferentes géneros aumentó la producción de tallos, el contenido de N-total y peso seco de la parte aérea Schultz y col. (2012).

En la elección de las cepas para campo se tuvo en cuenta la calidad de los inoculantes preparados y los resultados obtenidos en invernáculo. *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 fueron elegidas porque además de haber mostrado PCV en invernáculo, lograron buena concentración celular inicial y sobrevivencia en turba (al menos 3 meses), característica importante para los ensayos en campo. En Brasil, se han

preparado inoculantes para caña en turba y actualmente están en prueba en cultivos experimentales. Incluyen un consorcio de cepas, 5 en total que pertenecen a diferentes géneros de bacterias PCV (Urquiaga y col., 2010)

La evaluación temprana de la respuesta a la inoculación (3 y 8 meses) favoreció la observación de PCV en caña en variables como número de hojas/planta y acumulación de N (g/pl.), que podrían ser de importancia en los resultados esperados en etapas fenológicas tardías del cultivo (1 ó 2 años). Sin embargo, la mayor y significativa diferencia en acumulación de N en las plantas inoculadas con *Enterobacter* sp. UYSO10, podría ser transitoria o circunstancial. Esto último surge no sólo de los resultados a los 12 meses en que no se detectaron diferencias en esa variable, sino también de la opinión y experiencia de técnicos de ALUR, quienes han observado cambios significativos en las variables de producción, recién al segundo año de sembrada la caña. Por esta razón, se decidió continuar un año más el ensayo (2012-2013). Se utilizarán esquejes de los tallos de caña cosechados a los 12 meses (planta madre). En este caso, los inóculos serán preparados de forma similar a los utilizados en el primer ensayo y la re-inoculación será directamente en el surco en cada uno de los tratamientos.

Si bien los resultados a los 12 meses no indican una respuesta positiva a la inoculación de caña con bacterias PCV en variables de producción y en las de interés industrial, no deja de ser interesante la promoción observada en invernáculo en un número mayor de cepas. Es recomendable realizar evaluaciones tempranas de las plantas en campo a fin de visualizar diferencias.

Por otra parte, debemos mencionar por la importancia del tema, que las nuevas tecnologías, que incorporan nutrientes a los cultivos y controlan fitopatógenos a bajo costo, requieren investigación continua para que los agricultores tengan nuevos biofertilizantes. En el caso de que aporten nutrientes son una alternativa no solo de menor costo y bajo daño ecológico, sino de probable aumento en la productividad del cultivo (Chaves, 1999). En general, la biofertilización implica varias etapas, seleccionar microorganismos útiles y eficientes, cultivarlos y agregarlos a los suelos (Arauz, 1997).

Existen numerosos estudios sobre selección de bacterias de vida libre, rizosféricas y asociadas a plantas capaces de fijar N_2 , pero sólo algunas de ellas se destacan por otras características de PCV y por su potencial como biofertilizantes. Entre estas bacterias se encuentran especies de los géneros *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Ferrera-Cerrato, 1995; Rodríguez, 1995; Beringer, 1974).

Nuestros resultados aportan información útil en cuanto a que en caña se puede potenciar el empleo de bacterias PCV perfeccionando la interacción planta-bacteria de manera de definir el o los mecanismos implicados. También se destaca la identificación de géneros que tienen potencial de fijación de N_2 y otras características de PCV. Se sabe que la etapa final de producción de un inoculante es dificultosa sobre todo para el escalado del proceso y probablemente en caña esas dificultades son mayores por las características del cultivo (varios años) y por su manejo específico. Sin embargo, hemos logrado en este trabajo utilizar un inoculante en caña y evaluar su comportamiento en condiciones naturales.

En conclusión, los estudios realizados demuestran una respuesta positiva y significativa de caña a la inoculación con bacterias endófitas diazótrofes de diferentes géneros en invernáculo y en menor grado en campo, sin descartar que las diferencias se obtengan luego del primer año de cultivo. El trabajo aporta antecedentes relevantes para el cultivo de caña en nuestro país, tanto desde el punto de vista económico, ecológico y productivo.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados del presente trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

- 1) Se determinó el aporte de la FBN a la caña de azúcar en invernáculo y en campo por primera vez en nuestro país.
- 2) La aplicación de la técnica de abundancia natural de ^{15}N en campo y de dilución isotópica de ^{15}N en invernáculo evidenciaron que el cultivo de caña en las condiciones y suelos de Bella Unión (Departamento de Artigas) recibe entre 33%-48% de nitrógeno de la FBN. La variedad TUC 77-42 dio 70% de FBN.
- 3) Existen bacterias “probablemente” endófitas de los géneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, con potencial de promoción del crecimiento vegetal y de fijación de N_2 (diazótrofas) en las variedades de caña de Uruguay.
- 4) Las cepas bacterianas estudiadas tienen gran versatilidad en su metabolismo y resistencia a antibióticos, combinado con producción de sideróforos y control de hongos fitopatógenos *in vitro*, características importantes a tener en cuenta en la formulación y producción de un biofertilizante. Producen *in vitro* enzimas pectinasas y endoglucanasas de interés para el ingreso activo de las bacterias a la planta.
- 5) La respuesta a la inoculación de caña con géneros bacterianos diferentes en condiciones semi-controladas (invernáculo) fue homogénea y se detectaron diferencias significativas con las plantas del control negativo en variables de importancia agronómica como peso seco radical, biomasa aérea y altura de plantas. Las cepas *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 presentaron diferencias significativas con el control negativo en la mayoría de las variables evaluadas, incluyendo la concentración y acumulación de N en la parte aérea de la planta.

6) En campo, la inoculación de la variedad LCP 85-384 con *Enterobacter* sp. UYSO10 y *Shinella* sp. UYSO24 no mostró diferencias significativas en biomasa aérea y % N-total en la parte aérea, pero si se observó un valor similar en la acumulación de N/planta para *Enterobacter* sp. UYSO10 con respecto al control positivo. Estos resultados incentivaron a continuar un año más el ensayo de campo, con probabilidad de observar cambios significativos recién al segundo año.

PERSPECTIVAS

Los antecedentes de este trabajo permitirán diseñar nuevos ensayos de inoculación en invernáculo y campo. Aprovechando la colección de probables bacterias endófitas diazótrofes generada, se podrán seleccionar otras cepas por sus características de PCV (por ejemplo *Acinetobacter* sp. UYSO03) para evaluar la influencia de la interacción genotipo bacteria-variedad de caña sobre la FBN. A su vez, será interesante probar diferentes soportes de inoculantes (líquidos y sólidos) y co-inoculación bacteriana.

Los resultados obtenidos establecerán bases sólidas para desarrollar un biofertilizante apropiado y una forma eficiente de inoculación del cultivo de caña de azúcar.

ANEXO 1

Medios de cultivo sin-N

Componente	JNFb	LGI	LGI-P
Sacarosa	-	5,0 g	100 g
Ácido málico	5,0 g	-	-
K ₂ HPO ₄	0,6 g	0,2 g	0,2 g
KH ₂ PO ₄	1,8 g	0,6 g	0,6 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g	0,2 g	0,2 g
NaCl	0,1 g	-	-
CaCl ₂	0,015 g	0,015 g	0,015 g
Solución EDTA 1,64%	4,0 ml	4,0 ml	-
FeCl ₃	-	0,01 g	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	-	0,002 g	0,002 g
Solución de micronutrientes	2,0 ml	-	-
Solución de vitaminas	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
KOH	4,5 g	-	-
pH	5,8 (KOH 1%)	6-6,2 (H ₂ SO ₄ 5%)	5,5 (ác. acético 1%)
Azul de bromotimol	2,0 ml	5,0 ml	5,0 ml
H ₂ O c.s.p. 1 litro			

(Baldani y col., 1999; Cavalcante y Dobereiner., 1988)

A los medios sólidos se le agregó 12 g/l de agar y a los medios semisólidos 4 g/l de agar.

Solución de micronutrientes

Componente	
H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	2,08 g
znSO ₄ ·7H ₂ O	0,22 g
MoO ₃ ·H ₂ O	0,09 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08 g
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

Solución de vitaminas

Componente	
Biotina	0,01 g
Pyridoxal-HCl	0,02 g
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

Medios de cultivos ricos

Medio TY

Componente	
Triptona	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
CaCl ₂ .H ₂ O	0,9 g
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

(Beringer, 1974)

DYG`s

Componente	
Glucosa	2,0 g
Ácido málico	2,0 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extracto de levadura	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Ácido glutámico	1,5 g
H ₂ O c.s.p. 1 litro	

(Weber y col., 1999)

A los medios sólidos se le agregó 12 g/l de agar y a los medios semisólidos 4 g/l de agar

Medio para plantas

Medio Fahraeus

<u>Componente</u>	
Na ₂ HPO ₄	150 mg
KH ₂ PO ₄	100 mg
CaCl ₂	100 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	120 mg
Fe-citrato	5 mg
<u>H₂O c.s.p. 1 litro</u>	

(Fahraeus, 1957)

Buffer de Electroforesis

TBE (Tris-Ác. bórico-EDTA) 10X

<u>Componente</u>	
Tris	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA (0,5M, pH 8)	40 ml
<u>H₂O c.s.p. 1 litro</u>	

ANEXO 2

Lista de bacterias endófitas diazótrofes aisladas de variedades de caña de azúcar comerciales del Uruguay, seleccionadas para la amplificación del gen *nifH*.

Morfotipo	Variedad de caña	Medio de cultivo	Morfotipo	Variedad de caña	Medio de cultivo
1	TUC 78-14 (BF)	LGI	15	TUC 77-42 (BF)	LGI
1	TUC 78-14 (BF)	JNFb	15	TUC 77-42 (BF)	JNFb
1	TUC 77-42 (AF)	LGI	16	TUC 77-42 (AF)	LGI
1	TUC 77-42 (AF)	JNFb	16	TUC 77-42 (AF)	JNFb
1	LCP 85-384 (AF)	LGI	16	TUC 77-42 (BF)	LGI
1	LCP 85-384 (AF)	JNFb	16	TUC 77-42 (BF)	JNFb
1	LCP 85-384 (BF)	LGI	16	LCP 85-384 (AF)	LGI
1	LCP 85-384 (BF)	JNFb	17	TUC 77-42 (BF)	JNFb
2	TUC 78-14 (BF)	LGI	17	LCP 85-384 (AF)	LGI
2	TUC 78-14 (BF)	JNFb	18	TUC 78-14 (BF)	JNFb
2	LCP 85-384 (BF)	LGI	19	TUC 77-42 (BF)	LGI
3	TUC 78-14 (BF)	JNFb	19	TUC 77-42 (BF)	JNFb
3	LCP 85-384 (BF)	LGI	19	LCP 85-384 (AF)	JNFb
4	TUC 77-42 (BF)	JNFb	20	TUC 77-42 (BF)	JNFb
4	LCP 85-384 (AF)	LGI	21	TUC 77-42 (BF)	JNFb
5	LCP 85-384 (AF)	JNFb	22	TUC 77-42 (BF)	JNFb
6	TUC 78-14 (BF)	LGI	23	TUC 77-42 (BF)	JNFb
6	TUC 77-42 (AF)	LGI	24	TUC 77-42 (AF)	LGI
6	LCP 85-384 (AF)	LGI	24	TUC 77-42 (AF)	JNFb
6	LCP 85-384 (AF)	JNFb	24	LCP 85-384 (AF)	JNFb
6	LCP 85-384 (BF)	LGI	25	TUC 77-42 (AF)	LGI
6	LCP 85-384 (BF)	JNFb	26	TUC 77-42 (AF)	JNFb
7	TUC 78-14 (BF)	JNFb	27	TUC 78-14 (BF)	JNFb
8	TUC 77-42 (AF)	JNFb	27	TUC 77-42 (AF)	JNFb
9	LCP 85-384 (BF)	LGI	27	TUC 77-42 (BF)	LGI
10	TUC 78-14 (BF)	JNFb	27	TUC 77-42 (BF)	JNFb
10	TUC 77-42 (AF)	LGI	27	LCP 85-384 (AF)	JNFb
10	TUC 77-42 (AF)	JNFb	28	TUC 77-42 (AF)	JNFb
10	LCP 85-384 (AF)	LGI	29	TUC 77-42 (BF)	LGI
10	LCP 85-384 (BF)	LGI	30	TUC 77-42 (BF)	LGI
10	LCP 85-384 (BF)	JNFb	31	TUC 77-42 (BF)	LGI
11	TUC 78-14 (BF)	LGI	32	TUC 77-42 (AF)	JNFb
11	TUC 78-14 (BF)	JNFb	33	TUC 78-14 (BF)	LGI
11	TUC 77-42 (AF)	LGI	33	LCP 85-384 (BF)	JNFb
11	TUC 77-42 (AF)	JNFb	34	LCP 85-384 (BF)	JNFb
11	TUC 77-42 (BF)	JNFb	35	LCP 85-384 (BF)	LGI
11	LCP 85-384 (AF)	LGI	35	LCP 85-384 (BF)	JNFb
11	LCP 85-384 (AF)	JNFb	36	LCP 85-384 (BF)	LGI
11	LCP 85-384 (BF)	LGI	36	LCP 85-384 (BF)	JNFb
11	LCP 85-384 (BF)	JNFb	37	LCP 85-384 (BF)	JNFb
12	TUC 77-42 (BF)	JNFb	38	TUC 77-42 (BF)	JNFb
12	LCP 85-384 (AF)	LGI	39	LCP 85-384 (BF)	LGI
12	LCP 85-384 (BF)	LGI	40	TUC 77-42 (AF)	LGI
12	LCP 85-384 (BF)	JNFb	41	TUC 78-14 (BF)	LGI
13	TUC 77-42 (BF)	JNFb	41	TUC 78-14 (BF)	JNFb
14	TUC 77-42 (AF)	LGI	41	LCP 85-384 (BF)	JNFb
14	TUC 77-42 (AF)	JNFb	42	TUC 78-14 (BF)	LGI
14	TUC 77-42 (BF)	LGI	42	LCP 85-384 (BF)	LGI
14	TUC 77-42 (BF)	JNFb	43	LCP 85-384 (BF)	LGI
14	LCP 85-384 (AF)	LGI	43	LCP 85-384 (BF)	JNFb

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña G. (2004).** La agroindustria de la caña de azúcar en Costa Rica: características, organización y condiciones laborales. Asociación Servicios de Promoción Laboral.
- Alarcón A. (2001).** Los microorganismos en la nutrición de cultivos. En: Nutrición de Cultivos. Alcanzar G. (eds). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- ALUR S.A. (2010).** Informe ambiental Resumen.
- Álvarez B. y Martínez-Drets G. (1995).** Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. Can. J. Microbiol. 41: 918-924.
- Arauz F. (1997).** Hacia un uso racional de los plaguicidas sintéticos: una perspectiva agroecológica. Agronomía Costarricense 21: 19-23.
- Ardon O., Weizman H., Libman J., Shanzer A., Chen I. y Hadar Y. (1998).** Iron uptake in *Ustilago maydis*: tracking the iron path. Journal of Bacteriology 180: 2021-2026.
- Arencibia A.D., Vinagre F., Estevez Y., Bernal A., Perez J., Cavalcanti J., Santana I. y Hemerly A.S. (2006).** *Gluconacetobacter diazotrophicus* elicits a sugarcane defense response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. Plant Signal Behav 1: 265-273.
- Arguedas M. (2009).** La "corona de agallas" (*Agrobacterium tumefaciens*). Kurú: Revista Forestal. Costa Rica. 6: 1-5.
- Arsene F., Katupitiya S., Kennedy I.R. y Elmerich C. (1994).** Use of lacZ fusions to study the expression of nif genes of *Azospirillum brasilense* in association with plants. Mol. Plant-Microbe Interact. 7: 748-757.
- Asis Jr.C.A., Kubota M., Chebotar V.K., Ohta H., Arima Y., Nishiyama K., Tsuchiya K.I. y Akao S. (2000).** Endophytic bacterial population in Philippine sugarcane cultivars and isolation of nitrogen-fixing strains. Microbes Environ. 15: 209-216.
- Axmann H. y Zapata F. (1990).** Stable and radioactive isotopes. En: Use of nuclear techniques in studies of soils-plant relationships. Hardarson G. (ed.). Training Course series Nº 2. International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria. pp 9-25.
- Balandreau J. y Knowles R. (1978).** The rhizosphere. En: Interactions between nonpathogenic soil organisms and plants. Dommergues Y.R. y Krupa S.V. (eds.). Elsevier/North-Holland Publishing Co. The Netherlands, Amsterdam, pp. 243-268.
- Baldani J.I., Baldani V.L.D., Seldin L. y Döbereiner J. (1986).** Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 451-456.
- Baldani V.L.D., Álvarez M.A., Baldani J.I. y Döbereiner J. (1986a).** Establishment of inoculated *Azospirillum* sp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. Plant Soil 90: 35-46.
- Baldani V.L.D., Baldani J.I., Olivares F.L. y Döbereiner J. (1992).** Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. Symbiosis 13: 65-73.
- Baldani J.I., Caruso L., Baldani V.L.D., Goi S. y Döbereiner J. (1997).** Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biol. Biochem. 29: 911-922.
- Baldani V.L.D., Baldani J.I. y Döbereiner J. (2000).** Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. Biol. Fertil. Soils 30: 485-491.
- Baldani J.I., Reis V.M., Baldani V.L.D. y Döbereiner J. (2002).** A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. Funct. Plant Biol. 29: 417-423.
- Baldani J.I. y Baldani V.L. (2005).** History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. Anais da Academia Brasileira de Ciências 77: 549-79.
- Barea J. (1991).** Cuantificación de la fijación biológica de N mediante el uso de ¹⁵N. En: Fijación de N y micorrizas. Fijación y movilización biológica de nutrientes. Olivares J. y Barea J. (eds.). Consejo Superior de Investigaciones Científicas, RAYCAR S. A. Vol. II. Madrid, España. pp 105-124.
- Barlocco C. (2008).** Bacterias endófitas de maíz (*Zea mays* L.): caracterización y detección del gen *nifH*. Tesis de grado. Facultad de Ciencias, UdelaR. Uruguay.
- Bastian F., Cohen A., Piccoli P., Luna V., Baraldi R. y Bottini R. (1998).** Production of índole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined cultura media. Plant Growth Research 24: 7-11.
- Bell C., Dickie G., Harvey W. y Chan J. (1995).** Endophytic bacteria in grapevine. Can. J. Microbiol. 41: 46-53.
- Bellone C., Belone S. y Pedraza R. (1996).** Hydric deficiency and acetylen reduction in sugar cane roots. En: International Symposium of Nitrogen Fixation with Non-Legumes, 7. Faisalabd. Abstracts. pp 125-126.
- Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora A., Ulrich A. y Hallmann J. (2005).** Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS Microbiology Ecology 5: 1215-229.

- Bergersen F. y Turner G. (1983).** An evaluation of ^{15}N methods for estimating nitrogen fixation in a subterranean clover perennial ryegrass sward. *Australian J. Agric. Res.* 34: 391-401.
- Beringer J. (1974).** R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* 84: 188-198.
- Bifani P. (1999).** Medio ambiente y desarrollo sostenible. Instituto de Estudios Políticos para América Latina y África (IEPALA). Cuarta Edición. Madrid, España.
- Biggs I.M., Stewart G.R., Wilson J.R. y Critchley C. (2002).** ^{15}N natural abundance studies in Australian commercial sugarcane. *Plant and Soil* 238: 21-30.
- Binks P.R., Nicklin S. y Bruce N.C. (1995).** Degradation of RDX by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1. *Appl Environ Microbiol* 61: 1813-1322.
- Boddey R.M. y Victoria R.L. (1986).** Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ^{15}N labeled organic matter and fertilizer. *Plant and Soil* 90: 265-292.
- Boddey R.M., de Oliveira O.C., Urquiaga S., Reis V.M., de Olivares F.L., Baldani V.L.D. y Döbereiner J. (1995).** Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* 174: 195-209.
- Boddey R.M., Silva G., Reis V.M., Alves B.J.R. y Urquiaga S. (2000).** Assessment of bacterial nitrogen fixation in grass species. En: *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process*. Triplet E. (Ed). Horizon Scientific. Wymondham, UK. pp 705-726.
- Boddey R., Polidoro J., Resende A., Alves B. y Urquiaga S. (2001).** Use of the ^{15}N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N_2 fixation to sugar cane and other grasses. *J. Plant Physiol.* 28: 889-895
- Boddey R., Urquiaga S., Alves B. y Reis V. (2003).** Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil* 252: 139-149.
- Bowen G. y Rovira A. (1999).** The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Adv. Agron.* 66: 1-102.
- Bracho M., Díaz L. y Soto L.M. (2004).** Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela. *SciELO* 38: 1-9.
- Burris R.H. (1994).** Comparative study of the response of *Azotobacter vinelandii* and *Acetobacter diazotrophicus* to changes in pH. *Protoplasma* 183: 62-66.
- Cariello M.E., Castaneda L., Riobo I. y González G. (2007).** Endogenous microorganisms inoculant to speed up the composting process of urban swage sludge. *J. Soil Sc. Plant Nutr.* 7: 26-35.
- Casagrande A.A. (1991).** Tópicos de morfología e fisiología de caña-de-azúcar. Jaboticabal: FUNEP. pp 157.
- Castro-González R., Martínez-Aguilar L., Ramírez-Trujillo A., Estrada de los Santos P. y Caballero-Mellado J. (2011).** High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. *Plant soil*. DOI 10.1007/s11104-011-0768-0
- Cavalcante V. y Döbereiner J. (1988).** A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar cane. *Plant Soil* 108: 23-31.
- Cervantes M. (2001).** Ciclo del nitrógeno. Biblioteca virtual. San Pablo. pp 55. <http://cervantesvirtual.com>.
- Chanway C.P. (1998).** Bacterial endophytes: ecological and practical implications. *Sydowia*. 50: 149-170.
- Chaves, M. (1999).** Nutrición y fertilización de la caña de azúcar en Costa Rica. Conferencia 78. III Congreso Nacional de Suelos. XI Congreso Nacional Agronómico. pp 193-214. <http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_XI/a50-6907-III_193.pdf>.
- Chelsius M.K. y Triplett E.W. (2000).** Diazotrophic endophytes associated with maize. En: *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A model system for analysis of a biological process*. Horizont Scientific Press. pp 779-791.
- China A., Nass H., Doboin C. y Díaz M. (2000).** Escaldadura foliar. En: *Enfermedades y daños de la caña de azúcar en Latinoamérica*. Imprecolor C.A. Barquisimeto, Venezuela. pp 108.
- Cocking E.C., Webster G., Batchelor C.A. y Davey M.R. (1994).** Nodulation of non-legume crops. A new look. *Agro-Food-Industry Hi-Tech*. pp 21-24.
- Costa J.M.T. y Ruschel A.P. (1981).** Seasonal variation in the microbial populations of sugar-cane plants. En: *Associative N_2 -fixation*. Vose P.B. y Ruschel A.P. (eds.). Boca Raton, CRC. 2: 109-118.
- Costa E., Teixidó N., Usall J., Ates E. y Viñas I. (2001).** Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Applied Microbiology Biotechnology* 56: 367-371
- Danso S. (1995).** Assessment of biological nitrogen fixation. *Fertilizer Research* 42: 33-41.
- Dixon R. y Kahn D. (2004).** Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 612-631.
- Döbereiner J. (1961).** Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. *Plant Soil* 15: 211-216.
- Döbereiner J. (1992).** History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis* 13: 1-13.

- Döbereiner J., Urquiaga S., Boddey R.M. y Ahmad N. (1995).** Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. Nitrogen economy in tropical soil. *Fertil. Res.* 42: 339-346.
- Dong Z., Canny M., McCully M., Roboredo M., Cabadilla C., Ortega E. y Rodés R. (1994).** A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. *Plant Physiol.* 105: 1139-1147.
- Doty S., Oakley B., Xin G., Kang J.W., Singleton G., Khan Z., Vajzovic A. y James T.S. (2009).** Diazotrophic endophytes of native black cottonwood and willow. *Symbiosis* 47: 23-33.
- Elbeltagy A., Nishioka K., Sato T., Suzuki H., Ye B., Hamada T., Isawa T., Mitsui H. y Minamisawa K. (2001).** Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5285-5293.
- Espinoza S., Ovalle C., del Pozo A., Zagal E. y Urquiaga S. (2011).** Biological fixation of N₂ in mono and polyspecific legume pasture in the humid mediterranean zone of Chile. *Chilean J. Agric. Res.* 71: 132-139.
- Estrada P., Mavingui P., Cournoyer B., Fontaine F., Balandreau J. y Caballero-Mellado J. (2002).** A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 285-294.
- Fahraeus G. (1957).** The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Journal of General Microbiology* 16: 374-381.
- Fallik E., Okon Y., Epstein E., Goldmann A. y Fischer M. (1989).** Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense*-inoculated maize roots. *Soil Biol. Biochem.* 21: 147-153.
- FAO (2003).** Food and Agriculture Organization.
- Ferlini Micheli H.A. y Díaz S.C. (2006).** Incremento de la materia orgánica radicular en los cultivos de Maíz (*Zea mays*) y Sorgo Granífero (*Sorghum bicolor*) inoculados con *Azospirillum brasilense*. Maíz y Sorgo Granífero inoculados con *Azospirillum brasilense*.
- Ferrera-Cerrato R. (1995).** Agricultura en México. En: Primera reunión Internacional de Ecología Microbiana, Programas y resúmenes. I.P.N. 8-12 de mayo. Distrito Federal, México. pp 43.
- Ferrera R. y Alarcón A. (2001).** La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. En: Memorias XXII Congreso Nacional de Control Biológico. Rodríguez L. y Escobar J. (eds.). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. Ciencia Ergo Sum 8: 175-183.
- Fogliatta F. (1995).** Agronomía de la caña de azúcar. El graduado. Tucumán.
- Franche C., Lindström K. y Elmerich C. (2009).** Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* 321: 35-59
- Fried M. y Middelboe V. (1977).** Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. *Plant Soil* 47: 713-715.
- Frioni L. (2006).** Ciclo biológico del nitrógeno. En: Microbiología: básica, ambiental y agrícola. Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la Republica. pp. 169-190.
- Frioni L. (2011).** Microbiología básica, ambiental y agrícola. Primera. Orientación Grafica. Buenos Aires.
- Fuentes-Ramírez L.E., Jimenez-Salgado T., Abarca-Ocampo I.R. y Caballero-Mellado J. (1993).** *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil* 154: 145-150.
- Fuentes-Ramírez L.E., Caballero-Mellado J., Sepúlveda J. y Martínez-Romero E. (1999).** Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* by high fertilization. *FEMS Microbiol. Ecology* 29: 117-128.
- Gamalero E., Martinotti M.G., Trotta A., Lemanceau P. y Berta G. (2002).** Morphogenetic modifications induced by *Pseudomonas fluorescens* A6RI and *Glomus mosseae* BEG12 in the root system of tomato differ according to plant growth conditions. *New Phytologist* 155: 293-300.
- Gammar L., Blondeau K. y Simonet J. (1997).** Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology* 83:281-287.
- Giller K. y Wilson K. (1991).** Nitrogen fixation in tropical cropping systems. CAB International, Wallingford, UK. pp 313.
- Gopalakrishnan S., Humayun P., Kiran B.K., Kannan I.G.K., Vidya M.S., Deepthi K. y Rupela O. (2010).** Evaluation of bacteria isolated from rice rhizosphere for biological control of charcoal rot of sorghum caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *World J Microbiol Biotechnol* DOI 10.1007/s11274-010-0579-0.
- Gyaneshwar P., James E.K., Reddy P.M., Reinhold-Hurek B. y Ladha J.K. (2002).** *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminum tolerant rice varieties. *New Phytol.* 154: 131-146.
- Hall J.A., Peirson D., Ghosh S. y Glick B.R. (1996).** Root elongation in various agronomic crops by the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Israel J. Plant Sci.* 44: 37-42.
- Hallmann J., QuadtHallmann A., Mahaffee W. y Kloepper J. (1997).** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895-914.

- Hallmann J., Berg G. y Schulz B. (2006).** Isolation procedures for endophytic microorganisms. En: Microbial Root Endophytes. Schulz B., Boyle C. y Sieber T.N. (eds.). Novena edición. Springer. Berlin.
- Halvorson A., Follett R., Bartolo M. y Schweissing F. (2002).** Nitrogen fertilizer use efficiency of furrow-irrigated onion and corn. *Agronomy Journal* 94: 442-449.
- Hardy R., Holsten R., Jackson E. y Burns R. (1968).** The $C_2H_2-C_2H_4$ assay for N_2 fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1207.
- Hettwer U., Gross M. y Rudolph K. (1995).** Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. *Journal of Bacteriology* 177: 2834-2839.
- Hill S. y Postgate J.R. (1969).** Failure of putative nitrogen-fixing bacteria to fix nitrogen. *Journal of General Microbiology* 58: 277-285.
- Hoefsloot G, Termorshuizen A. J., Watt D.A. y Cramer M.D. (2005).** Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown South African sugarcane cultivar. *Plant Soil* 277: 85-96
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A. y Staley J.T. (1994).** Bergey's manual of determinative bacteriology. Novena edición. Williams and wilkins company. Baltimore, MD, USA. pp. 255-273.
- Hu Y., Fay A., Lee C. y Ribbe M. (2007).** P-cluster maturation on nitrogenase MoFe protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 10424-10429.
- Hulton C., Higgins C., Sharp P. (1991).** ERIC sequences: a novel family of repetitive element in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology* 5: 825-834.
- Humbert R. (1974).** El cultivo de la caña de azúcar. Continental. México. pp 719.
- Hurek T., Reinhold-Hurek B., Van M. y Kellenberger E. (1994).** Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in grasses. *Journal of Bacteriology* 176: 1913-1923.
- Hurek T. y Reinhold-Hurek B. (2005).** Molecular Ecology of N_2 -fixing microbes associated with gramineous plants: hidden activities of unknown bacteria. En: Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment. Werner D. y Newton W.E. (eds.). Springer. Netherlands. pp 173-198
- IBGE. (2009).** Levantamento sistemático da produção agrícola. Sistema IBGE de recuperação automática-SIDRA.
- Idris H., Labuschagne N. y Korsten L. (2007).** Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biol. Control* 40: 97-106
- InfoStat (2008).** InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- James E.K. (2000).** Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* 65: 197-209.
- James E.K., Gyaneshwar P., Mathan N., Barraquio W. L., Reddy P.M., Lannetta P.P.M., Olivares F.L. y Ladha J.K. (2002).** Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67; *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 894-906.
- Jenkinson D. (2001).** Nitrogen in a global perspective, with focus on temperate areas-state of the art and global perspectives. *Plant and Soil* 228: 3-15.
- Jeyabal A. y Kuppuswamy G. (2001).** Recycling of organic wastes for the production of vermicompost and its response in rice-legume cropping system and soil fertility. *European Journal of Agronomy* 15: 153-170.
- Jha P. y Kumar A. (2009).** Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from Wheat Plant. *Microb. Ecol.* 58: 179-188
- Jimenez-Salgado T., Fuentes-Ramirez L.E., Tapia-Hernandez A., Mascarua-Esparza M.A., Martinez-Romero E., Caballero-Mellado J. (1997).** *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Applied Environmental Microbiology* 63: 3676-3683.
- Junior F., Reis V., Urquiaga S. y Dobereiner J. (2000).** Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane. *Plant Soil.* 219: 153-159.
- Kämpfer P., Ruppel S. y Reiner R. (2005).** *Enterobacter radicincitans* sp. Nov., a plant growth promoting species of the family *Enterobacteriaceae*. *Systematic App. Microbiol.* 28: 213-221.
- Kass D. (1996).** Fertilidad de Suelos. Primera Edición. UNED. San Jose, Costa Rica. pp 233.
- Katupitiya S., Millet J., Vesk M., Viccars L., Zeman A., Lidong Z., Elmerich C. y Kennedy I.R., (1995).** A mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 impaired in occlusion with a modified colonization pattern and superior nitrogen fixation in association with wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1987-1995.
- Kobayashi D. y Palumbo J. (2000).** Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. En: Microbial endophytes. Bacon C. y White J. (eds). Marcel Dekker Inc. New York. pp. 199-233.
- Kovtunovych G., Lar O., Kamalova S., Kordyum V., Kleiner D. y Kozyrovska N. (1999).** Correlation between pectate lyase activity and ability of diazotrophic *Klebsiella oxytoca* VN 13 to penetrate into plant tissues. *Plant Soil* 215: 1-6.

- Lane D. (1991).** *16S/23S rRNA* sequencing. En: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Stackebrandt E. y Goodfellow M. (eds). Wiley, New York. pp 115-175.
- Lemanceau P. y Alabouvette C. (1991).** Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and nonpathogenic *Fusarium*. Crop Protection 10: 279-286.
- Li R.P y Macrae I.C. (1992).** Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. Soil Biol Biochem. 24: 413-419.
- Lima E., Boddey R.M. y Döbereiner J. (1987).** Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided nitrogen balance. Soil Biol. Biochem. 19: 165-170.
- Limmer C. y Drake H.L. (1998).** Effects of carbon, nitrogen and electron acceptor availability on anaerobic N₂-fixation in a beech forest soil. Soil Biol. and Bioch. 30: 153-158.
- Logeshwarn P., Thangaraju M. y Rajasundari K. (2011).** Antagonistic potential of *Gluconacetobacter diazotrophicus* against *Fusarium oxysporum* in sweet potato (*Ipomea batatas*). Phytopathology and Plant Protection 44: 216-223.
- Loiret F. (2004).** A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. J. Appl. Microbiol. 97: 504-11.
- Lynch D., Brien J.O., Welch T., Clarke P., Ócui P., Crosa J.H. y Connell M.O. (2001).** Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of Rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. Journal of Bacteriology 183: 2576-2585.
- Marschner H. (1995).** Fisiología de la nutrición (Parte I) En: Mineral nutrition of higher plants. Segunda edición. Academic Press. London. Cap. 7.6.
- Matos G. y Zúñiga D. (2003).** Viabilidad de cepas de rizobios en inoculantes basados en soportes no esteriles. Ecología Aplicada 2: 81-85.
- Mayz-Figueroa J. (2004).** Fijación biológica de nitrógeno. Revista científica UDO Agrícola 4: 1-20.
- McAuliffe C., Chamblee D.S., Uribe-Aragon H. y Woodhouse Jr.W.W. (1958).** Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by ¹⁵N. Agronomy Journal 50: 334-337.
- Modak J.M. (2002).** Haber process for ammonia synthesis. Resonance. 7: 69-77. (<http://www.ias.ac.in/resonance/Sept2002/pdf/Sept2002p69-77.pdf>)
- Montañez A., Abreu C., Gill P., Hardaron G., Sicardi M. (2009).** Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. Biol. Fertil. Soils 45: 253-263
- Moore P. y Maretzki A. (1996).** Sugarcane. En: Photoassimilate distribution in plants and crops. Source-sink Relationships Zamski E. y Schaffer A. (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp: 643-668.
- Muñiz O., Rives N., Fabr e L., Socorro M., Alves B. y Urquiaga S. (2010).** Contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la nutrición nitrogenada del cultivo de arroz irrigado en Cuba. La Habana: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Congreso Científico del INCA, XVII, San José de las Lajas, 22-26 nov. 978-959-7023-48-7
- Muñoz Rojas J. y Caballero Mellado J. (2003).** Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. Microbial Ecology. 46: 454-464.
- Muthukumarasamy R., Revathi G. y Lakshminarasimhan C. (1999).** Diazotrophic associations in sugar cane cultivation in South India. Tropical-Agriculture 76: 171-178.
- Muthukumarasamy R., Revathi G. y Lakshminarasimhan C. (1999a).** Influence of N-fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. From Indian sugarcane varieties. Biology and Fertility of Soils 29: 157-167.
- Muthukumarasamy R., Revathi G. y Vadivelu M. (2000).** Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal of red-rot of sugarcane. Curr. Sci. 78: 1063-1065.
- Neilands J.B. (1981).** Microbial iron compounds. Annu. Rev. Biochem. 50: 715-731.
- Newman L.A. y Reynold C.M. (2005).** Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. Trends in Biotechnology 23: 6-8.
- Newton W.E. (2007).** Physiology, biochemistry and molecular biology of nitrogen fixation. En: Biology of the nitrogen cycle. Bothe H., Ferguson S.J. y Newton W.E. (eds). Elsevier. Amsterdam. pp 109-130.
- Nguyen T.H., Deaker R., Kennedy I.R. y Roughley R.J. (2003).** The positive yield response of field-grown rice to inoculation with a multistrain biofertiliser in the Hanoi area, Vietnam. Symbiosis 35: 231-245.
- Olivares F.L., Baldani V.L.D., Reis V.M., Baldani J.I. y Döbereiner J. (1996).** Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in root, stem, and leaves, predominantly of *Gramineae*. Biol. Fertil. Soils 25: 197-200.
- Oliveira A., Urquiaga S., Döbereiner J. y Baldani J. (2002).** The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. Plant Soil 242: 205-215.

- Olson J., Stegge T., Litaker R. y Paerl H. (1998).** N₂-fixing microbial consortia associated with the ice cover of Lake Bonney, Antartica. *Microbial Ecology* 36: 231-238.
- Orozco-Jaramillo C. y Martínez-Nieto P. (2009).** Evaluation of inoculation with asymbiotic nitrogen-fixing microorganisms isolated from rhizosphere of *Pinus patula* in Colombia. *Bosque* 30: 70-77.
- Ortega E., Fernández L., Ortega-Rodés P. y Rodés R. (2010).** La fijación biológica del nitrógeno en la caña de azúcar. Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de la Habana.
- O'Sullivan D.J. y O'Gara F. (1992).** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol Rev* 56: 662-676.
- Otero A. (2008).** El hidrógeno en procesos catalíticos. Universidad de Castilla-La Mancha. España. <<http://www.uclm.es/profesorado/afantinolo/curso%20de%20catalisis/Puertollano%202007/A.Otero.doc.pdf>>.
- Palus J., Borneman J., Ludeen P. y Triplett E. (1996).** A diazotrophic bacteria endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* *Illis* and *Doebley*. *Plant and Soil* 186: 135-142
- Pan B., Bai Y., Leibovitch S. y Smith D. (1999).** Plant-growth promoting rhizobacteria and kinetic as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. *European Journal of Agronomy* 11: 179-186.
- Pariona-Llanos R., Ibañez de Santi Ferrara F., Soto Gonzales H. y Ramos Barbosa H. (2010).** Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. *European J. Soil Biol.* 46: 387-393.
- Park M., Chungwoo K., Jinchul Y., Lee H., Wansik S., Seunghwan K. y Tongmin S. (2005).** Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol. Res.* 160: 127-133.
- Patriquin D.G., Döbereiner J. y Jain D.K. (1983).** Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 900-915.
- Perin L., Baldani J. y Reis V. (2004).** Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de caña de açúcar cultivada no Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.* 39: 763-770.
- Perin L., Martínez-Aguilar L., Castro-González R., Estrada-de los Santos P., Cabellos-Avelar T., Guedes H., Reis V., Caballero-Mellado J. (2006).** Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. *Appl Environ Microbiol* 72: 3103-3110
- Peters J.W., Fisher K. y Dean D.R. (1995).** Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 335-366.
- Potrich D.P., Passaglia L.M.P. y Schrank I.S. (2001).** Partial characterization of *nif* genes from the bacterium *Azospirillum amazonense*. *Braz J Med Biol Res.* 34: 1105-1113.
- Prakamhang J., Minamisawa K., Teamtaisong K., Boonkerd N. y Teaumroong N. (2009).** The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) *Appl. Soil Ecol.* 42: 141-14.
- Proyecto INIA FPTA-275 (2012).** Producción sustentable en caña de azúcar: bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su aplicación agronómica a cultivos comerciales.
- Punschke K y Mayans M. (2011).** Selección de cepas de *Herbaspirillum* spp. promotoras del crecimiento de arroz. *Agrociencia Uruguay* vol.15 no.1 Montevideo. ISSN 1510-0839.
- Quadt-Hallmann A., Benhamou N. y Kloepper J. (1997).** Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Can. J. Microbiol.* 43: 577-582.
- Quagliotto L., Azziz G., Bajsa N., Vaz P., Pérez C., Ducamp F., Cadenazzi M., Altier N. y Arias A. (2009).** Three native *Pseudomonas fluorescens* strains tested under growth chamber and field conditions as biocontrol agents against damping-off in alfalfa. *Biological Control* 51: 42-50.
- Quispel A. (1992).** A search for signals in endophytic microorganisms. En: *Molecular signals in plant-microbe communications*. Verma D. (eds.). CRC press, Boca Raton. pp 471-49.
- Reinhold-Hurek B., Hurek T., Gillis M., Hoste B., Vancanneyt M., Kersters K., y De-Ley J. (1993).** *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 574-584
- Reinhold-Hurek B. y Hurek T. (1998).** Life in grasses: diazotrophic endophytes. *Trends Microbiol.* 6: 139-144.
- Reinhold-Hurek B. y Hurek T. (1998a).** Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17: 29-54.
- Reinhold-Hurek B., Krause A., Leyser B., Miché L. y Hurek T. (2007).** The rice apoplast as a habitat for endophytic N₂-fixing bacteria. En: *The Apoplast of Higher Plants: Compartment of Storage, Transport and Reactions*. Sattelmacher B. y Horst W.J. (eds.). Springer. pp. 427-443.

- Reis V.M., Olivares F. y Dobereiner J. (1994).** Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J Microbiol Biotech* 10: 101-104.
- Reis V.M. y Döbereiner J. (1998).** Effecto high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.* 171: 13-18.
- Reis F.B., da Silva L.G., Reis V.L.M. y Döbereiner J. (2000).** Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 35: 985-994.
- Reis F.B., Reis V.M., Urquiaga S. y Dobereiner J. (2000a).** Influence of nitrogen fertilization of the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). *Plant and Soil* 210: 153-159.
- Resende A.S.D, Xavier R.P., Oliveira O.C.D, Urquiaga S., Alves B.J.R. y Boddey R.M. (2006)** Long-term effects of pre-harvest burning on yield of sugar cane and soil carbón and nitrogen stocks on a plantation in Pernambuco. *Plant and Soil* 281: 337-349.
- Ricaud C. y Ryan C.C. (1989):** Leaf scald. En: Disease of sugarcane. Ricaud C., Egan B.T., Gillaspie Jr.A.G. y Hughes C.G. (eds). Elsevier Science Publishers. Amsterdam. The Netherlands. pp 39-58.
- Rivas R., Velázquez E., Valverde A., Mateos P.F. y Martínez-Molina E. (2001).** A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* 22: 1086-1089
- Rodríguez M. (1995).** Microorganismos libres de nitrógeno. En: Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable. Ferrera-Cerrato R. y Pérez-Morreno J. (eds.). Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. pp. 105-126
- Rodríguez Blanco A. (2011).** Comunidades de diazótrofos asociados a maíz: efecto del genotipo de la planta y de la fertilización nitrogenada. Tesis de Doctorado. PEDECIBA Biología. Uruguay. pp 1-179.
- Rodríguez Chang A., Trujillo Cerón I., Bringas Y., Rojas Badía M., Manzano Castañeda J. y Heydrich Pérez M. (2005).** Caracterización fisiológica de la comunidad microbiana endófito de la caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología.* Vol. VII, n° 001. Universidad Nacional de Colombia. pp 66-77.
- Rojas M.M. (2005).** Caracterización de *Gluconacetobacter diazotrophicus* aislado de variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) cultivadas en Cuba. Tesis de grado. Facultad de Biología. Universidad de la Habana.
- Roncato-Maccari L.D.B., Ramos H.J.O., Pedrosa F.O., Alquini Y., Chubatsu L.S., Yates M.G., Rigo L.U., Steffens M^a.B.R. y Souza E. (2003).** Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. *FEMS Microbiol. Ecology* 45: 39-47.
- Rosas S.B., Altamirano F., Schroder E. y Correa N. (2001).** *In vitro* biocontrol activity of *Pseudomonas aurantiaca*. *Phyton-International J. Experimental Botany* 67: 203-209.
- Rosenblueth M. y Martínez-Romero E. (2006).** Review: Bacterial endophytes and their interactions whit hosts. *American Phytol. Society* 19: 827-837.
- Rovera M., Andres J., Carlier E., Pasluosta C. y Rosas S. (2008).** *Pseudomonas aurantiaca*: plant growth promoting traits, secondary metabolites and inoculation response. En: *Plant-Bacteria Interactions. Strategies and techniques to promote plant growth.* Ahmad I., Pichtel J. y Hayat S. (eds.). Wiley-VCH. Germany. pp 155-164.
- Rózycki H., Dahm H., Strzelczyk E. y Li C.Y. (1999).** Diazotrophic bacteria in root-free soil and in the root zone of pine (*Pinus sylvestris* L.) and oak (*Quercus robur* L.). *Applied Soil Ecology* 12: 239-250.
- Rubio L.M. y Ludden P.W. (2005).** Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle. *J Bacteriol* 187: 405-414.
- Rubio L.M. y Ludden P.W. (2008).** Biosynthesis of the iron molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annu. Rev. Microbiol* 62: 93-111.
- Ruschel A.P. (1981).** Associative N₂ fixation by sugarcane. En: *Associative N₂-Fixation.* Vose P.B. y Ruschel A.P. (eds.). CRC Press, Boca Raton. Vol. 2. pp. 81-90.
- Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J. y Dowling D.N. (2008).** Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* 278: 1-9.
- Sakiyama C.C.H. Paula E.M., Pereira P.C., Borges A.C. y Silva D.O. (2001).** Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Letter in Applied Microbiology* 333: 117-121.
- Schultz N., de Moraes F.R., Alves da Silva J., Baptista B.R., Oliveira P.R., Leite J.M., Pereira W., de Barros Carneiro Júnior J., Rodrigues Alves B.J., Baldani J.I., Boddey R.M., Urquiaga S. y Reis V.M. (2012).** Avaliação agrônômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. *Pesq. agropec. bras.* 47: 261-268.
- Schwyn B. y Neilands J.B. (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry* 160: 47-56.
- Seldin L., Soares R.A., Cruz D., Nobrega A., Dirk J.E. y Paiva E. (1998).** Comparison of *Paenibacillus azotofixans* Strains isolated from rhizoplane, rhizosphere and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3860-3868.

- Sevilla M., de Oliveira A., Baldani I. y Kennedy C. (1998).** Contributions of the bacterial endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition: a preliminary study. *Symbiosis* 25: 181-191.
- Sevilla M. y Kennedy C., (1999).** Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. En: *Nitrogen Fixation in Bacteria: Molecular and Cellular Biology*. Triplett E.W. (eds.). Horizon Scientific Press. Norwich, UK. (in press).
- Sevilla M. y Kennedy C. (2000).** Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. En: *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process*. Triplett E.W. (eds.). Horizon Scientific. Norwich, UK. pp 737-760.
- Sevilla M., Burris R.H., Gunapala N. y Kennedy C. (2001).** Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif-mutant strains. *Molecular plant-microbe interactions* 14: 358-366.
- Sharma A., Johri B.N., Sharma A.K. y Glick B.R. (2003).** Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP(3) influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiate* L. Wilzeck). *Soil Biol. Biochem.* 35: 887-894.
- Shearer G. y Khol D. (1986).** N₂ fixation in field setting-estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Australian J. Plant Physiol.* 13: 699-756.
- Shiomi H., Alves S.H., Soares I., Vieira F. y Wagner B. (2006).** Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Sci. Agric.* 63: 32-39.
- Shoebitz M., Ribaud C.M., Pardo M.A., Cantore M.L., Ciampi L. y Cura J.A. (2008).** Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* doi:10.1016/j.soilbio.2007.12.031.
- Steenhoudt O. y Vanderleyden J. (2000).** *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 487-506.
- Strobel G. y Daisy B. (2003).** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol.* 67: 491-502.
- Subirós J.F. (1995).** El Cultivo de la Caña de Azúcar. 1ed. San José, Costa Rica. EUNED. pp 353-370.
- Subirós J.F. (1998).** Calidad de los jugos y contenido de fibra de tres variedades de caña de azúcar en un ciclo de crecimiento en Guanacaste, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 22: 173-184.
- Tan Z.Y., Peng G.X. y Xu P.Z. (2009).** Diversity and high nitrogenase activity of endophytic diazotrophs isolated from *Oryza rufipogon* Griff. *Chinese Sci. Bull.* 54: 2839-2848.
- Taulé, C. (2011).** Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a variedades de caña de azúcar en Uruguay: identificación, caracterización y estudios de interacción. Tesis de Maestría PEDECIBA Biología, subárea Microbiología. Montevideo, Uruguay.
- Tejera N., Ortega E., Rodés R. y Lluch C. (2004).** Influence of carbon and nitrogen sources on growth, nitrogenase activity, and carbon metabolism of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Can. J. Microbiol.* 50: 745-750.
- Thaweenut N., Hachisuka Y., Ando S., Yanagisawa S. y Yoneyama T. (2011).** Two seasons' study on *nifH* gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia. *Plant and Soil* 338: 435-449
- Tsavelkova E.A., Cherdyntseva T.A., Botina S.G. y Netrusov A.I. (2007).** Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research* 162: 69-76.
- Turner G. y Gibson A. (1980).** Measurement of nitrogen fixation by indirect means. En: *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. Bergersen F. (eds.). Wiley J. y Sons. Chichester, UK. pp 111-138.
- Uncovich M., Herridge D., Peoples M., Cadisch G., Boddey B., Giller K., Alves B. y Chalk P. (2008).** ¹⁵N natural abundance method. En: *Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems*. Clarus Design Pty Ltd (eds). ACIAR Monograph N° 136. Cap. 8. pp 131-162.
- Urquiaga S., Cruz K.H.S. y Boddey R.M. (1992).** Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56: 105-114.
- Urquiaga S., Reis V.M., Jantalia C.P., Alves B.J.R. y Boddey R.M. (2010).** La fijación biológica de nitrógeno y la economía de fertilizante nitrogenado en caña de azúcar. Artículo técnico. EMBRAPA-Agrobiología. Brasil. pp 16-22. http://www.tecnica.org/pdf/2010/tec_no24_2010_p18-24.pdf.
- Urquiaga S., Xavier R.P., de Moraes R.F., Batista R.B., Schultz N., Leite J.M., Maia e Sá J., Barbosa K.P., de Resende A.S., Alves B.J.R. y Boddey R.M. (2011).** Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. *Plant Soil.* (in press)
- Urzúa H. (2000).** Fijación simbiótica de nitrógeno en Chile: Importante herramienta para una Agricultura Sustentable. Proc. XX Reunion Latinoamericana de Rhizobiología. Arequipa, Peru. pp. 211-227.

- Valencia-Cantero E., Villegas-Moreno J., Sánchez-Yáñez J.M., Peña-Cabriales J.J. y Farías-Rodríguez R. (2005).** Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *Terra Latinoamericana* 23: 81-88.
- Valles de la Mora B., Cadisch G. y Schunemann A. (2003).** Comparación de metodologías de isótopos para evaluar fijación de N atmosférico y su destino en suelos y plantas. *Colegio de Postgraduados. México. Agrociencia* 37: 117-128.
- Van Berkum P. y Bohlool B. (1980).** Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. *Microbiol. Rev.* 44: 491-517
- Vázquez C., Sellek R. y Fernández N. (1992).** Enzimas que degradan paredes vegetales en *Fusarium oxysporum*. *Bol. San. Veg. Plagas* 18: 693-698.
- Verma, S.C., Ladha, J.K. y Tripathi, K. (2001).** Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. *Journal of Biotechnology* 91: 127-141.
- Vessey J.K. (2003).** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.
- Vessey J., Pawlowski K. y Bergman B. (2005).** Root-based N₂ –fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. *Plant and Soil.* 274: 51-78.
- Videira S.S. (2007).** Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bacterias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas. *EMBRAPA, Documentos* 234.
- von Wright A., Tynkynen S. (1987).** Construction of *Streptococcus lactis* subsp *lactis* Strain with a single plasmid associated with mucoid phenotype. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1385-1386.
- Watanabe I. y Barraquio W.L. (1979).** Low levels of fixed nitrogen required for isolation of free-living N₂-fixing organisms from rice roots. *Nature* 227: 565-566.
- Weber O., Baldani B., Texeira K., Kirchof G., Baldani J. y Dobereiner J. (1999).** Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil* 210: 103-113.
- Weller D.M., Raijmakers J.M., Gardener B.B.M. y Thomashow L.S. (2002).** Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Rev. Phytopathol.* 40: 309-348.
- Wenbo M., Zalec K. y Glick B. (2001).** Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 137- 144.
- Whipps, J.M. (2001).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.
- Woese C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-227.
- Wolf A., Fritze A., Hagemann M. y Berg G. (2002).** *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1937-1944.
- Yim W.J., Poonguzhali S., Madhaiyan M., Palaniappan P., Siddijee M.A. y Sa T. (2009).** Characterization of plant growth promoting diazotrophic bacteria isolated from field grown Chinese cabbage under different fertilization conditions. *J. Microbiol.* 47: 147-155
- Yoneyama T., Muraoka T., Kim T., Dacanay E. y Nakanishi Y. (1997).** The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). *Plant and Soil* 189: 239-244.
- Zehr J.P., Jenkins B.D., Short S.M. y Steward G.F. (2003).** Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5: 539-554.
- Zheng L., Cash D.L., Flint D.H. y Dean D.R. (1998).** Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBAfdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* 273: 13264-1327272
- Zinniel D., Lambrecht P., Harris B., Feng Z., Kuczmariski D., Higley P., Ishimaru C., Arunakumari A., Barletta R. y Vidaver A. (2002).** Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2198-2208.