



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORA: LISETH ALEXANDRA SALINAS TOLEDO

**TEMA: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE LA
BACTERIA *Gluconacetobacter diazotrophicus* EN EL
CRECIMIENTO DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum
officinarum*) OBTENIDAS *in vitro***

DIRECTOR: PABLO LANDÁZURI MSc.

CODIRECTORA: BSc. KARINA PONCE

SANGOLQUÍ, SEPTIEMBRE 2014

LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Liseth Alexandra Salinas Toledo

COORDINADORA DE CARRERA

Dra. María Augusta Chávez

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Vinicio Zabala J.

Lugar y fecha: _____

CERTIFICACIÓN

Pablo Landázuri MSc.

BSc. Karina Ponce

Certifican:

Que el trabajo titulado “**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE LA BACTERIA *Gluconacetobacter diazotrophicus* EN EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*) OBTENIDAS *in vitro***”, realizado por la Srta. **LISETH ALEXANDRA SALINAS TOLEDO**, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE, en el reglamento de estudiantes de la misma.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto, el cual contiene los archivos en forma portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a **LISETH ALEXANDRA SALINAS TOLEDO** que lo entregue a la Dra. María Augusta Chávez, en su calidad de coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, Septiembre 2014.

Pablo Landázuri MSc.

Director

BSc. Karina Ponce

Codirectora

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Liseth Alexandra Salinas Toledo

Declaro que:

El proyecto de grado “**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE LA BACTERIA *Gluconacetobacter diazotrophicus* EN EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*) OBTENIDAS *in vitro***” ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Septiembre 2014.

Liseth Alexandra Salinas Toledo.

AUTORIZACIÓN

Yo, Liseth Alexandra Salinas Toledo

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE LA BACTERIA *Gluconacetobacter diazotrophicus* EN EL CRECIMIENTO DE PLANTAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*) OBTENIDAS *in vitro***”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Septiembre 2014.

Liseth Alexandra Salinas Toledo.

DEDICATORIA

A la memoria de mi abuelita Blanca, que día a día ha sido una estrella en este camino; iluminándome, acompañándome y bendiciéndome desde el cielo.

A mis padres, Ana y Fernando, el pilar más importante de mi vida.

Liseth Alexandra Salinas Toledo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser lo primero y la base en mi vida.

A mi mami Ana, por ser mi ejemplo de lucha, trabajo y amor incondicional; por ser mi confidente y estímulo para cada día ser mejor, por confiar en mí, acompañarme y estar pendiente de cada paso que doy; gracias a su sacrificio y esfuerzo he logrado alcanzar cada una de mis metas.

A mi papi Fernando, por prepararme desde niña para el mundo real, por enseñarme a enfrentar mis temores, no conformarme, y salir adelante frente a las adversidades, porque con su ejemplo aprendí que nada es más importante que ser yo misma.

A mi hermano Fernando, por ser parte esencial de mi crecimiento personal e intelectual, porque a pesar de todo nunca dejaré de ser su primera pupila.

A mi abuelita Martha, por ser mi segunda madre, compartir mis alegrías y tristezas, y brindarme siempre su dulzura.

A mi tía Susi, por su cariño, ejemplo de bondad y ser mi apoyo incondicional de toda la vida.

A Alfonso, Mateo y mis pequeños, por mantener viva la ternura en mí, brindarme paz y hacer que todos los días siga valorando las cosas sencillas de la vida.

A mis amigos, por su apoyo y compañía, que en diferentes etapas, ha sido esencial para continuar.

A Marquito, por sus sugerencias, colaboración, guía, preocupación e interés en el desarrollo de mi investigación; por escucharme y aconsejarme, sobre todo por brindarme su amistad, mi gratitud eterna.

A la Dra. Ligia Ayala, por su confianza y predisposición para, mediante el aporte de sus conocimientos, enriquecer el presente proyecto.

A mis directores de tesis, Pablo Landázuri MSc. y BSc. Karina Ponce, por aceptar ser parte de este proyecto, colaboración y apertura ante mis inquietudes.

De manera especial a mi novio Jaime, por ser mi compañero, soporte y mejor amigo, por su paciencia, ternura y motivación; por estar a mi lado siempre, apretando mi mano en los momentos difíciles, sentir suyos mis triunfos, ser mi colaborador y guía, siempre confiar en mí y ser una luz en la oscuridad, sin su amor nada sería igual.

Liseth Alexandra Salinas Toledo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	ii
CERTIFICACIÓN.....	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iv
AUTORIZACIÓN.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	ix
LISTADO DE TABLAS	xii
LISTADO DE FIGURAS.....	xiv
LISTADO DE ANEXOS.....	xxii
RESUMEN..	xxiv
ABSTRACT	xxv
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema.....	3
1.3 Objetivos	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
1.4 Marco teórico	6
1.4.1 Caña de azúcar	6
1.4.2 Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	11
1.4.3 Bacterias endófitas	13
1.6 Sistema de hipótesis.....	17
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1 Participantes	18
2.1.2 Responsable del proyecto	18
2.1.3 Instituciones.....	18
2.1.4 Colaboradores científicos	18
2.2 Zona de estudio	18

2.2.1 Fase de muestreo.....	18
2.2.2 Fase de laboratorio.....	19
2.2.3 Fase de aclimatación.....	19
2.3 Período de tiempo de investigación.....	19
2.4 Diseño experimental y análisis estadístico.....	19
2.4.1 Fase de aislamiento y caracterización bacteriana.....	19
2.4.2 Fase de inoculación de la bacteria en plantas <i>in vitro</i>	20
2.4.3 Fase de aclimatación.....	21
2.5 Procedimiento.....	21
2.5.1 Fase de campo.....	21
2.5.2 Fase de laboratorio.....	22
2.5 Análisis de datos.....	44
CAPÍTULO 3 RESULTADOS.....	45
3.1 Muestreo de plantas de caña de azúcar.....	45
3.2 Aislamiento de la bacteria <i>G. diazotrophicus</i>	46
3.3 Purificación y caracterización de la bacteria <i>G. diazotrophicus</i>	49
3.4 Propagación de la bacteria <i>G. diazotrophicus</i>	63
3.5 Inoculación de <i>G. diazotrophicus</i> en plantas <i>in vitro</i> de caña de azúcar.....	65
3.6 Evaluación del mejor tratamiento de colonización bacteriana en plantas <i>in vitro</i> de caña de azúcar.....	66
3.6.1 Estado de la planta.....	66
3.6.2 Contaminación.....	67
3.6.3 Crecimiento bacteriano y su abundancia en medio LGI-P.....	68
3.6.4 Color y homogeneidad del crecimiento bacteriano en medio PDA.....	75
3.7 Aclimatación de plantas de caña de azúcar inoculadas con <i>G.</i> <i>diazotrophicus</i>	81
3.8 Evaluación de plantas de caña de azúcar inoculadas con <i>G.</i> <i>diazotrophicus</i>	83
3.8.1 Evaluación del efecto en la altura.....	84
3.8.2 Evaluación del efecto en la biomasa.....	86
3.8.3 Evaluación del efecto en el desarrollo de raíz.....	88
3.8.3 Confirmación de la presencia de la bacteria <i>G. diazotrophicus</i>	89

3.8.4 Evaluación del efecto en el contenido de nitrógeno	90
CAPÍTULO 4 DISCUSIÓN	91
4.1 Muestreo de plantas de caña de azúcar	91
4.2 Aislamiento de la bacteria <i>G. diazotrophicus</i>	91
4.3 Purificación y caracterización de la bacteria <i>G. diazotrophicus</i>	91
4.4 Propagación de la bacteria <i>G. diazotrophicus</i>	92
4.5 Evaluación del mejor tratamiento de colonización bacteriana en plantas <i>in vitro</i> de caña de azúcar	93
4.6 Aclimatación de plantas de caña de azúcar inoculadas con <i>G.</i> <i>diazotrophicus</i>	94
4.7 Evaluación de plantas de caña de azúcar inoculadas con <i>G.</i> <i>diazotrophicus</i>	94
CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES	96
CAPÍTULO 6 RECOMENDACIONES	98
CAPÍTULO 7 BIBLIOGRAFÍA	99
ANEXOS.....	113

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1	Clasificación taxonómica de la caña de azúcar.	6
Tabla 1.2	Clasificación taxonómica de la bacteria <i>G. diazotrophicus</i>	14
Tabla 2.1	Escala de valoración para el estado de la planta luego del período de inoculación con <i>G. diazotrophicus</i>	32
Tabla 2.2	Escala de valoración para contaminación en la planta luego del período de inoculación con <i>G. diazotrophicus</i>	33
Tabla 2.3	Escala de valoración para el crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio LGI-P a partir de partes de planta de caña de azúcar luego del período de inoculación.	34
Tabla 2.4	Escala de valoración para la abundancia de crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio LGI-P a partir de partes de planta de caña de azúcar luego del período de inoculación.	35
Tabla 2.5	Escala de valoración para el color de crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio PDA a partir de aislados en medio LGI-P.	36
Tabla 2.6	Escala de valoración para la homogeneidad del color de crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio PDA a partir de aislados en medio LGI-P.	36
Tabla 3.1	Muestras obtenidas de las plantas de caña de azúcar seleccionadas en la parroquia Mindo.	45
Tabla 3.2	Resultados de crecimientos bacterianos en medio LGI-P líquido a partir de muestras silvestres de caña de azúcar obtenidas en la parroquia Mindo.	46
Tabla 3.3	Resultados de crecimientos bacterianos en medio LGI-P sólido, a partir de aislados de plantas de caña de azúcar en medio LGI-P líquido.	50
Tabla 3.4	Resultados de crecimientos bacterianos, a partir de colonias positivas para <i>G. diazotrophicus</i> , sembradas por estría simple en medio LGI-P sólido.	53
Tabla 3.5	Resultados de crecimientos bacterianos, a partir de colonias positivas para <i>G. diazotrophicus</i> , sembrado por estría simple en medio PDA.	56

Tabla 3.6 Resultados obtenidos en las pruebas morfológico-bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas a partir de las muestras M3T1 y M3H2.	62
Tabla 3.7 Características de los tratamientos de inoculación de <i>G. diazotrophicus</i> a plantas <i>in vitro</i> de caña de azúcar.	65
Tabla 3.8 Medias de los valores de verdor según tratamiento.....	66
Tabla 3.9 Medias de los valores de crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio LGI-P sólido según tratamiento.	69
Tabla 3.10 Medias de los valores de abundancia de crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio LGI-P sólido según tratamiento.....	72
Tabla 3.11 Medias de los valores de color del crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio PDA según tratamiento.....	75
Tabla 3.12 Medias de los valores de homogeneidad de color del crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio PDA según tratamiento.	78
Tabla 3.13 Porcentajes de contaminación y supervivencia de plantas de caña de azúcar luego del período de aclimatación.	81

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Plantación de caña de azúcar (<i>S. officinarum</i>). Fuente: (SIAP, 2014).	7
Figura 1.2 Plantas de caña de azúcar en la fase de enraizamiento en el laboratorio de cultivo de tejidos Jardín Botánico de Atlanta, Georgia, EE.UU.	12
Figura 1.3 Bacilos Gram negativos de la especie <i>G. diazotrophicus</i> , observados al microscopio.	15
Figura 1.4 Crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio LGI-P luego de 7 días de incubación a 30 ° C. A: medio semisólido. B: medio sólido.	16
Figura 1.5 Cambio de coloración del crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio PDA enriquecido con sacarosa, en diferentes días de incubación a 30 °C.....	17
Figura 2.1 Muestras de caña de azúcar (<i>S. officinarum</i>) obtenidas en la Parroquia Mindo, empacadas para el transporte hacia el laboratorio.....	22
Figura 2.2 Crecimiento bacteriano a partir de tallo de caña de azúcar en medio LGI-P líquido luego de 7 días de incubación a 30 °C. A: Medio LGI-P incoloro. B: Película superior de color amarillo.....	23
Figura 2.3 Siembra de crecimiento bacteriano en medio LGI-P líquido a medio LGI-P sólido.	23
Figura 2.4 A: Crecimiento bacteriano en medio LGI-P luego de 7 días de incubación a 30 °C. B: Colonias bacterianas amarillas, planas y de forma irregular.	24
Figura 2.5 Proceso de tinción Gram en bacterias obtenidas en medio PDA con características correspondientes a <i>G. diazotrophicus</i>	24
Figura 2.6 Colocación de colonia bacteriana sobre portaobjetos en una gota de peróxido de hidrógeno para la prueba de catalasa.....	25
Figura 2.7 A: Reactivo de Kovac's-oxidasa. B: Colocación de reactivo en papel filtro. C: Extensión de colonia bacteriana para prueba de oxidasa.	25
Figura 2.8 A: Solidificación en pico de flauta de agar citrato de Simmons. B: Siembra bacteriana por picadura en medio citrato de Simmons.....	26
Figura 2.9 A: Medio SIM. B: Siembra bacteriana por picadura en medio SIM.....	26

- Figura 2.10** Medios LGI-P sembrados por estría simple, con diferentes aminoácidos como única fuente de carbono. **A:** L-prolina. **B:** L-cisteína. 27
- Figura 2.11** Medios LGI-P sembrados por estría simple, con diferentes azúcares como única fuente de carbono. **A:** D-maltosa. **B:** D-lactosa. **C:** D-xilosa. **D:** D-manitol. **E:** D-celobiosa. 28
- Figura 2.12** Medios de cultivo para determinar la mejor multiplicación de *G. diazotrophicus*. **A:** LGI-P líquido. **B:** Caldo V8. **C:** Agar nutriente. 29
- Figura 2.13** **A:** Medio líquido sin inoculación bacteriana y patrones de turbidez McFarland, para concentraciones de 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC·mL⁻¹. **B:** Espectrofotómetro Spectroflex 6600. 29
- Figura 2.14** **A:** Plantas *in vitro* de caña de azúcar. **B:** Raíces de plantas *in vitro* de caña de azúcar. **C:** Lavado de la raíz con agua destilada estéril. 30
- Figura 2.15** **A:** Inmersión de raíz de caña de azúcar *in vitro* en cultivo de *G. diazotrophicus*. **B:** Siembra de planta de caña de azúcar inoculada con *G. diazotrophicus* en medio MS modificado. 30
- Figura 2.16** Plantas *in vitro* de caña de azúcar testigo e inoculadas con *G. diazotrophicus* en incubación a 30°C con una iluminación de 60 μ PPF..... 31
- Figura 2.17** **A:** Partes de planta de caña de azúcar, preparadas para ser licuadas, en solución de sacarosa al 10 %. **B:** Licuados obtenidos. 31
- Figura 2.18** **A:** Obtención de inóculo a partir de hoja licuada de caña de azúcar. **B:** Siembra por estría simple en medio LGI-P sólido. 32
- Figura 2.19** Aspecto visual de plantas de caña de azúcar para la evaluación de su estado. **A:** Muerta. **B:** Amarilla. **C:** Con predominancia de hojas amarillas. **D:** Con predominancia de hojas verdes. **D:** Verde. 33
- Figura 2.20** Aspecto visual de medio MS con plantas de caña de azúcar para la evaluación de contaminación. **A:** Presencia de contaminación. **B:** Ausencia de contaminación. 34
- Figura 2.21** Características de crecimiento bacteriano en medio LGI-P luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Crecimiento bacteriano no esperado. **B:** Crecimiento bacteriano esperado con contaminación. **C:** Crecimiento bacteriano esperado puro. **D:**

Ausencia de crecimiento. E: Crecimiento escaso. F: Crecimiento abundante.....	35
Figura 2.22 Crecimiento bacteriano en medio PDA luego de 15 días de incubación a 30 °C. A: Crecimiento bacteriano no esperado. B: Crecimiento bacteriano marrón claro. C: Crecimiento bacteriano marrón. D: Crecimiento bacteriano marrón oscuro. E: Coloración no homogénea. F: Coloración homogénea.	37
Figura 2.23 A: Fibra de coco en envases plásticos para plantas individuales. B: Planta de caña de azúcar en fibra de coco como único sustrato, cubierta totalmente al inicio de la fase de aclimatación para mantener una humedad relativa elevada. C: Plantas de caña de azúcar en tratamiento, al inicio de la fase de aclimatación en la sala de incubación.	38
Figura 2.24 Riego de planta de caña de azúcar en fibra de coco con 5 mL de medio líquido MS modificado durante los seis primeros días de la etapa de aclimatación.....	39
Figura 2.25 Agujeros en la cobertura de planta de caña de azúcar para la reducción de la humedad relativa en la etapa de aclimatación.	39
Figura 2.26 Plantas de caña de azúcar distribuidas en réplicas en invernadero, a los 9 días del inicio de la etapa de aclimatación.	40
Figura 2.27 Plantas de caña de azúcar descubiertas a los 12 días del inicio de la fase de aclimatación.	40
Figura 2.28 Riego de planta de caña de azúcar con 10 mL de medio MS modificado al 50 % con 15 g·L ⁻¹ de sacarosa, a los 15 días de iniciada la fase de aclimatación.	41
Figura 2.29 Determinación de la altura y biomasa de planta de caña de azúcar luego de la fase de aclimatación. A: Medición de biomasa en una balanza analítica. B: Medición de altura con un calibrador Vernier.	42
Figura 2.30 Plantas de caña de azúcar, en recipientes plásticos, listas para ser licuadas.....	42
Figura 2.31 A: Planta de caña de azúcar con H ₂ SO ₄ , CuSO ₄ y K ₂ SO ₄ . B: Solución obtenida luego de su ebullición en digestor de bloque.....	43
Figura 2.32 A: Muestras, en análisis, con el reactivo de Nessler, se observa su coloración amarilla. B: Colocación de muestra en el espectrofotómetro.....	43

- Figura 3.1** Crecimientos positivos para *G. diazotrophicus* a partir de muestras de plantas de caña de azúcar en medio LGI-P líquido luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Muestra M3R2, medio totalmente incoloro. **B:** Muestra M3R2, película superior amarilla. **C:** Muestra M3T2, medio parcialmente incoloro. **D:** Muestra M3T2, burbujas en la parte superior del medio. **E:** Muestra M1T1, medio parcialmente incoloro. **F:** Muestra M1T1, grumos en la parte superior del medio. 498
- Figura 3.2** Crecimientos negativos para *G. diazotrophicus* a partir de muestras de plantas de caña de azúcar en medio LGI-P líquido luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Muestra M1R2, medio turbio. **B:** Muestra M1R2, película superior blanca. **C:** Muestra M5H2, medio turbio. **D:** Muestra M5H2, contaminación fúngica en la parte superior del medio. **E:** Muestra M5H2, contaminación fúngica en el fondo del medio. 49
- Figura 3.3** Crecimientos positivos para *G. diazotrophicus* en medio LGI-P sólido, luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Muestra M3R2, descartada por contaminación fúngica. **B:** Muestra M5H3, medio incoloro, contaminación bacteriana. **C:** Muestra M5H3, colonias amarillas, planas e irregulares. **D:** Muestra M3H2, el medio no es completamente incoloro debido a su exceso, se distingue crecimiento bacteriano esperado. **E:** Muestra M3H2, colonias amarillas, planas e irregulares. 51
- Figura 3.4** Crecimientos negativos para *G. diazotrophicus* en medio LGI-P sólido, luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Muestra M1R1, medio de cultivo color azul. **B:** Muestra M1R1, colonias rosadas, planas e irregulares. **C:** Muestra M2T1, medio de cultivo incoloro. **D:** Muestra M2T1, colonias blancas, planas y redondas. **E:** Muestra M4T4, medio de cultivo amarillo. **F:** Muestra M4T4, colonias amarillas, planas y circulares. 52
- Figura 3.5** Crecimientos positivos para *G. diazotrophicus* en medio LGI-P sólido, luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Muestra M3T1, medio de cultivo incoloro. **B:** Muestra M3T1, crecimiento amarillo. **C:** Muestra M4T3, medio de cultivo incoloro. **D:** Muestra M4T3, crecimiento amarillo de aspecto líquido. **E:** Muestra M5R1, medio de cultivo incoloro. **F:** Muestra M5R1, contaminación fúngica a lo largo del estriado amarillo. 54
- Figura 3.6** Crecimientos negativos para *G. diazotrophicus* en medio LGI-P sólido, luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Muestra M1H2,

- medio de cultivo azul. **B:** Muestra M1H2, crecimiento rojo. **C:** Muestra M4T2, medio de cultivo amarillo. **D:** Muestra M4T2, crecimiento amarillo. **E:** Muestra M3H1, medio de cultivo amarillo. **F:** Muestra M3H1, crecimiento de tres colonias amarillas. 55
- Figura 3.7** Crecimientos positivos para *G. diazotrophicus* en medio PDA a los 8, 11, 13 y 15 días de incubación a 30 °C de incubación (de arriba hacia abajo), se observa una coloración marrón paulatina. **A, B, C y D:** Muestra M3H2. **E, F, G y H:** Muestra M3T1..... 57
- Figura 3.8** Crecimientos negativos para *G. diazotrophicus* en medio PDA a partir de las muestras M4T3 y M5R2 (izquierda y derecha de la caja respectivamente), se observa una coloración blanca durante todo el período de incubación a 30 °C. **A:** 8 días de incubación. **B:** 11 días de incubación. **C:** 13 días de incubación. **D:** 15 días de incubación..... 58
- Figura 3.9** Pruebas morfológico-bioquímicas de bacterias sospechosas para *G. diazotrophicus*, a partir de un cultivo de 72 horas de incubación a 30 ° C. **A y B:** Fotografías en microscopio (objetivo de 100x), se observan bacilos Gram negativos debido a su coloración rosada. **C:** Reacción positiva para catalasa debido a la formación inmediata de burbujas. **D:** Reacción negativa para oxidasa al no existir cambio de coloración a azul-violeta. 59
- Figura 3.10** Pruebas morfológico-bioquímicas de bacterias sospechosas para *G. diazotrophicus*, luego de 96 horas de incubación a 30 ° C. **A:** Prueba de motilidad positiva en medio SIM, se observa crecimiento bacteriano alrededor de la línea de siembra. **B:** Prueba de citrato positiva, cambio de coloración del medio citrato de Simmons de verde a azul. **C:** Prueba positiva para indol en medio SIM, formación de anillo rojo al adicionar el reactivo de Kovac's. **D:** Prueba negativa para ácido sulfhídrico, permanencia del color ámbar del medio SIM. 60
- Figura 3.11** Pruebas bioquímicas sobre utilización de fuentes de carbono en medio LGI-P de bacterias sospechosas para *G. diazotrophicus*, luego de siete días de incubación a 30 ° C. **A:** Control positivo, sacarosa. **B:** D-manitol, se observa crecimiento. **C:** D-maltosa, crecimiento escaso. **D:** D-xilosa, crecimiento escaso. **E:** L-prolina, sin crecimiento. **F:** L-cisteína, sin crecimiento. **G:** D-celobiosa, sin crecimiento. **H:** D-lactosa, sin crecimiento. 61

Figura 3.12 Crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en caldo V8 luego de 15 días de incubación a 30 °C (derecha) junto al tubo control, sin inoculación bacteriana (izquierda).	63
Figura 3.13 Ausencia de crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio agar nutritivo luego de 15 días de incubación a 30 °C.	64
Figura 3.14 Crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio LGI-P líquido luego de 15 días de incubación a 30 °C (izquierda) junto el tubo control, sin inoculación bacteriana (derecha).	64
Figura 3.15 Clasificación de los tratamientos según el estado de la planta por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.	67
Figura 3.16 Porcentajes de contaminación según tratamiento aplicado, se puede apreciar que los tratamientos con bacteria tienen porcentajes menores de contaminación.	68
Figura 3.17 Clasificación de los tratamientos según crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio LGI-P, a partir de raíz, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.	70
Figura 3.18 Clasificación de los tratamientos según crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio LGI-P, a partir de tallo, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.	71
Figura 3.19 Clasificación de los tratamientos según crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio LGI-P, a partir de hoja, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.	71
Figura 3.20 Clasificación de los tratamientos según abundancia de crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio LGI-P, a partir de raíz, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.	73
Figura 3.21 Clasificación de los tratamientos según abundancia de crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio LGI-P, a partir de tallo, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.	74
Figura 3.22 Clasificación de los tratamientos según abundancia de crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio LGI-P, a partir de	

hoja, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.	74
Figura 3.23 Clasificación de los tratamientos según el nivel de color del crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio PDA, a partir de raíz, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.	76
Figura 3.24 Clasificación de los tratamientos según el nivel de color del crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio PDA, a partir de tallo, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.	77
Figura 3.25 Clasificación de los tratamientos según el nivel de color del crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio PDA, a partir de hoja, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.	77
Figura 3.26 Clasificación de los tratamientos según homogeneidad de color del crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio PDA, a partir de raíz, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.	79
Figura 3.27 Clasificación de los tratamientos según homogeneidad de color del crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio PDA, a partir de tallo, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.	80
Figura 3.28 Clasificación de los tratamientos según homogeneidad de color del crecimiento de <i>G. diazotrophicus</i> en medio PDA, a partir de hoja, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.	80
Figura 3.29 Plantas de caña de azúcar a los 19 días de iniciada la fase de aclimatación. A: Plantas inoculadas con la bacteria <i>G. diazotrophicus</i> , las seis viven. B: Plantas testigo, solo una de las seis vive.	82
Figura 3.30 Plantas de caña de azúcar, inoculada con la bacteria <i>G. diazotrophicus</i> (TB) y planta testigo (T) en diferentes etapas del ensayo, desde el día 0 hasta el día 34. A: Planta T al inicio de la fase de incubación. B: Planta TB al inicio de la fase de incubación. C: Planta T al final de la fase de incubación e inicio de la aclimatación. D: Planta TB al final de la fase de incubación e inicio de la aclimatación. E: Planta T al final de la fase aclimatación. F: Planta TB al final de la fase aclimatación.	83

- Figura 3.31** Tasas de crecimiento en altura de tallos de plantas de caña de azúcar inoculadas con la bacteria *G. diazotrophicus*, según tratamiento..... 85
- Figura 3.32** Tasas de crecimiento en biomasa para plantas de caña de azúcar inoculadas con la bacteria *G. diazotrophicus*, según tratamiento..... 87
- Figura 3.33** Relaciones entre longitud de raíz y longitud promedio de tallos para plantas de caña de azúcar, luego de la fase de aclimatación en invernadero, según tratamiento. 88
- Figura 3.34** Resultados de siembra en medios LGI-P y PDA a partir de plantas inoculadas (TB) y testigo (T) de caña de azúcar luego del período de aclimatación. **A:** Crecimiento bacteriano amarillo, característico de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P, a partir de planta TB. **B:** Medio de cultivo LGI-P, sin crecimiento, a partir de planta T. **C:** Crecimiento bacteriano marrón, característico de *G. diazotrophicus* en medio PDA, a partir de planta TB. **D:** Medio de cultivo PDA, sin crecimiento, a partir de planta T. 89
- Figura 3.35** Porcentajes de nitrógeno para plantas de caña de azúcar, luego de la fase de aclimatación en invernadero, según tratamiento..... 90

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A. Resultados esperados de las pruebas morfológico-bioquímicas para <i>G. diazotrophicus</i>	113
ANEXO B. Resultados de las pruebas ANOVA.....	114
B1. Estado de planta.....	114
B2. Crecimiento bacteriano en medio LGI-P.....	114
B3. Abundancia de crecimiento bacteriano en medio LGI-P.....	115
B4. Color del crecimiento bacteriano en medio PDA.....	115
B5. Homogeneidad de color de crecimiento bacteriano en medio PDA...	116
B6. Evaluación del efecto en la altura.....	117
B7. Evaluación del efecto en la biomasa.....	118
B8. Evaluación del efecto en el desarrollo de raíz.....	118
B9. Evaluación del efecto en el contenido de nitrógeno.....	119
ANEXO C. Plantas de caña de azúcar a los 19 días de iniciada la fase aclimatación.....	120
C1. Plantas inoculadas con la bacteria <i>G. diazotrophicus</i>	120
C2. Plantas testigo.....	121
ANEXO D. Tasas de crecimiento en altura para tallos de plantas de caña de azúcar, por réplicas, según tratamiento.....	123
D1. Fase <i>in vitro</i>	123
D2. Fase en invernadero.....	123
D3. Desde la inoculación hasta el final de la aclimatación.....	124
ANEXO E. Tasas de crecimiento en biomasa de plantas de caña de azúcar, por réplicas, según tratamiento.....	125
E1. Fase <i>in vitro</i>	125
E2. Fase en invernadero.....	125
E3. Desde la inoculación hasta el final de la aclimatación.....	126
ANEXO F. Desarrollo del sistema radicular de plantas de caña de azúcar luego de la fase de aclimatación en invernadero.....	127

F1. Plantas testigo.....	127
F2. Plantas inoculadas con la bacteria <i>G. diazotrophicus</i>	127
F3. Planta inoculada con la bacteria <i>G. diazotrophicus</i> (izquierda), se observa raíz más profunda de una longitud similar a la longitud promedio de sus tallos. Planta testigo, se observa escaso desarrollo del sistema radicular en relación a la longitud promedio de sus tallos.	128
ANEXO G. Curva de calibración para el método de Nessler.....	129
ANEXO H. Comparación entre planta inoculada con la bacteria <i>G. diazotrophicus</i> (TB) y planta testigo (T) a lo largo del ensayo realizado.....	130
H1. Día 0 - planta TB (izquierda), planta T (derecha).....	130
H2. Día 15 - planta TB (izquierda), planta T (derecha).....	130
H3. Día 18 - planta TB (izquierda), planta T (derecha).....	131
H4. Día 24 - planta TB (izquierda), planta T (derecha).....	131
H5. Día 27 - planta TB (izquierda), planta T (derecha).....	132
H6. Día 30 - planta TB (izquierda), planta T (derecha).....	132
H7. Día 34 - planta TB (izquierda), planta T (derecha).....	133
H8. Día 34 - planta TB (izquierda), planta T (derecha).....	133
H9. Muestras obtenidas a partir de plantas de caña de azúcar completas, durante el proceso de análisis de contenido de nitrógeno mediante el método colorimétrico de Nessler, la intensidad del color amarillo y la turbidez son directamente proporcionales a la cantidad de nitrógeno presente. Planta TB (izquierda), planta T (derecha).....	134

RESUMEN

Como alternativa a la fertilización química y orgánica en base a nitrógeno, en la presente investigación se aisló por primera vez en el Ecuador, utilizando medio de cultivo LGI-P líquido, la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a partir de cortes de tallo y hoja de caña de azúcar que crece de manera silvestre en la parroquia Mindo. La bacteria se caracterizó como bacilo Gram negativo, con formación de colonias amarillas, planas y de forma irregular en medio LGI-P sólido y marrón en PDA, además presentó consistencia con los resultados reportados para esta especie en las pruebas bioquímicas realizadas. Posteriormente la bacteria se propagó hasta una concentración de $1.7 \cdot 10^7$ UFC·mL⁻¹ para ser inoculada en plantas *in vitro* de caña de azúcar, teniendo el mejor resultado de colonización bacteriana utilizando medio MS modificado al 10 %, suplementado con 2 g·L⁻¹ de sacarosa, luego de 15 días, tiempo en el que la bacteria se estableció en raíz, tallo y hoja. El efecto de la bacteria sobre las plantas se evaluó en una fase *in vitro* y otra en invernadero, en las que se demostró que la bacteria promovió el crecimiento en altura, biomasa, y desarrollo del sistema radicular; por otro lado se observó un aumento en el contenido de nitrógeno en ausencia de fertilización nitrogenada, lo que demostró la capacidad fijadora de la bacteria.

Palabras claves: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, bacteria endófito, fijación de nitrógeno, caña de azúcar, inoculación *in vitro*.

ABSTRACT

As an alternative to chemical and organic, nitrogen based fertilizers, *Gluconacetobacter diazotrophicus* bacteria was first isolated in Ecuador, using liquid LGI-P medium, from stems and leaves of wild sugar cane growing in Mindo. Bacteria was characterized as Gram negative bacillus, with yellow, flat and irregularly shaped colonies on solid LGI-P medium and brown on solid PDA and also consistent with the results reported for this species in biochemical tests. Subsequently the bacteria was spread to $1.7 \cdot 10^7$ CFU·ml⁻¹ concentration and inoculated into *in vitro* sugar cane plants, best result for bacterial colonization were reached using modified MS 10%, supplemented with 2 g·L⁻¹ sucrose, after 15 days, when the bacteria was established in root, stem and leaf. The effect of the bacteria on plants was evaluated in two phases, *in vitro* and greenhouse, those showed that the bacteria promoted growth in height, biomass and root development; by the other hand an increase in the nitrogen content in the absence of nitrogen fertilizer was observed, demonstrating the N₂-fixation by the bacteria.

Key words: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, endophytic bacteria, nitrogen fixation, sugar cane, *in vitro* inoculation.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

La caña de azúcar, *Saccharum officinarum* (Linneo, 1753) es una de las plantas terrestres con mayor eficiencia al capturar, almacenar y transformar energía solar a fibra y azúcares; de esta se obtiene la materia prima para la producción de alimentos destinados a animales, abonos, fertilizantes, endulzantes y bebidas alcohólicas, lo que la convierte en un punto de gran interés para el sector agrícola debido al aporte a la economía de los países que la producen (FAO, 1988).

En el Ecuador, es considerado el segundo cultivo en importancia, luego del banano, el mismo que está destinado en un 60 % a la producción de etanol y azúcar a partir de melaza y jugo de caña respectivamente, mientras que el 40 % restante es para la fabricación de panela y alcohol artesanal (CINCAE, 2013; INEC, 2012).

A causa de la importancia de la caña de azúcar y debido a la influencia negativa de ciertos factores como enfermedades, microorganismos patógenos, así como la propia decadencia genética del cultivo, se ha estado utilizando una técnica de amplia producción que proporciona plantas vigorosas, libres de patógenos y enfermedades; el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, que es la opción para cultivar: tejidos, órganos, células o protoplastos en un medio artificial; de forma aséptica, bajo condiciones adecuadas y controladas de temperatura e iluminación para el crecimiento (Arellano *et al.*, 2009; Barba, Luna & Romero, 2001; Muñoz, 2004).

La técnica de propagación *in vitro* maximiza la generación de plántulas de caña de azúcar en un menor espacio, con el principal propósito de obtener plantas sanas, con un valor agregado, que incrementen la producción en campo (Zuñiga, 2012).

Dentro del manejo del cultivo de caña y sumada a la siembra de plantas sanas, se encuentran las técnicas de fertilización que incluyen al nitrógeno como macronutriente, del que se necesitan de 130 a 200 kg·ha⁻¹·año⁻¹; el que debe ser adicionado mediante fertilizantes, pues las bacterias fijadoras de nitrógeno que podrían contribuir a la disponibilidad del mismo en el suelo estarán ausentes ya que las plantas *in vitro* se obtienen libres de microorganismos (Romero *et al.*, 2004).

Debido al excesivo nivel de nitrógeno que es suministrado a los cultivos, mediante la aplicación de fertilizantes, para suplir sus requerimientos nutricionales, el rendimiento económico del sector cañero se ha visto disminuido; y a pesar de esto, únicamente entre el 20 % y 50 % de nitrógeno es asimilado, lo que evidencia una acumulación del nutriente en el suelo provocando su erosión y una pérdida de recursos (Piñón *et al.*, 2002; Romero *et al.*, 2004).

Otro inconveniente del proceso de fertilización, debido al contenido de nitrógeno y fósforo, es la eutrofización de aguas superficiales y subterráneas, que conlleva a una proliferación de algas y alteraciones en las relaciones ecológicas en los cuerpos de agua; por esta razón, el uso de fertilizantes y otros agroquímicos podría ser restringido paulatinamente como ya lo ha sido en las últimas décadas en países como El Salvador, Colombia, República Dominicana, Nicaragua y otros de América Latina y el Caribe, pues sus gobiernos acogen las recomendaciones que se detallan en el “Estudio FAO de riego y drenaje-55”, en el

que la agricultura es considerada la principal fuente de contaminación del agua (FAO, 2013).

Es así que quedan pocas alternativas para satisfacer las necesidades nutricionales en los cultivos de caña de azúcar, lo que afecta de manera significativa a la economía agrícola e industrial del Ecuador.

1.2 Justificación del problema

El cultivo de caña de azúcar es considerado de suma importancia en el Ecuador, por lo que su rendimiento y productividad están directamente ligados a la economía de los sectores vinculados con su producción y la de sus derivados. Sin embargo, debido a los inconvenientes que existen en cuanto al cumplimiento de sus requerimientos de nitrógeno, como macronutriente y las consecuencias negativas que conlleva la aplicación de fertilizantes para solventar de cierta forma esta necesidad; es indispensable buscar una alternativa eficaz que sea amigable con el ambiente (Arellano *et al.*, 2009; INEC, 2012).

Se resalta al nitrógeno como el macronutriente de mayor importancia para el desarrollo de la caña de azúcar y el que determina su capacidad productiva, ya que al formar parte de aminoácidos, proteínas, aminos, amidas y ácidos nucleicos; su asimilación se ve reflejada en un mejor y mayor desarrollo de tallos y follaje, así como una adecuada formación de clorofila, evitando la formación de hojas secas y amarillentas (Quintero, 1995; Tisdale & Nelson, 1966).

Esta problemática, en los últimos años, ha impulsado el estudio de microorganismos endófitos, hongos y bacterias, que se desarrollan en el interior de células o tejidos vegetales sin ser perjudiciales; por el contrario, varios estudios describen la influencia positiva de estas simbiosis endófitas sobre el complejo con la planta en general, a diferencia de los sistemas asociativos, en donde gran parte

de su metabolismo se pierde por lixiviación, lavado e inmovilización por absorción de la microflora normal de suelo (Dibut, 2000; James *et al.*, 2001).

Se ha planteado así, la idea de emplear técnicas de ingeniería genética, con la finalidad de expresar la información génica, de estos microorganismos benéficos, en la planta; y aunque son algunos los avances realizados, al menos en el Ecuador no sería posible la transformación de plantas para su comercialización, por lo que es de interés el hallazgo de un microorganismo que habite en el interior del vegetal y que tenga la posibilidad de ser inoculado en cultivos de importancia económica (Shankaraiah, Gururaj-Hunsi & Hunsi, 2001).

Este es el caso de la bacteria endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Yamada, Hoshino & Ishikawa, 1997), la cual se ha encontrado en plantas de caña de azúcar de México, Cuba, Australia, Canadá y Brasil; esta coloniza el xilema de las plantas sin convertirse en patógeno, permitiendo que el nitrógeno atmosférico sea fijado y aprovechado por las plantas, estimulando su crecimiento y disminuyendo la dosis de fertilizantes aplicados (González, 1999; Torriente, 2010).

En el Ecuador no se ha reportado información sobre el aislamiento o identificación de este microorganismo, por lo que se buscó obtener por primera vez la bacteria *G. diazotrophicus* de ejemplares silvestres de caña de azúcar, lo que evita la utilización de cepas de microorganismos externos a la región, que pueden afectar el equilibrio ecológico de la zona en la que se trabaja. Además, de esta manera se cumple con la soberanía sobre los recursos naturales del país, que hace referencia a la conservación de la biodiversidad agrícola, silvestre y a su patrimonio genético (Gutiérrez, 2006).

Una vez aislada e identificada, la bacteria, se debe considerar su aplicación al cultivo de interés, en este caso la caña de azúcar, y debido a que la

industria agrícola cañera, trabaja con plantas propagadas de manera *in vitro*, se considera la opción de tener estas plantas en simbiosis con la bacteria endófitas, listas para su aclimatación en suelo.

Es así que la presente investigación propuso la colonización de *G. diazotrophicus* en plantas *in vitro* de caña de azúcar, de esta manera se obtuvieron plantas libres de patógenos, con una bacteria endófitas que estimuló la asimilación de nitrógeno mediante su fijación, incrementando la población vegetal con elongación y uniformidad de tallos, características que para la caña son la máxima representación de rendimiento. Una vez en el suelo, esta simbiosis disminuirá la aplicación de fertilizantes nitrogenados, su impacto ambiental, la incidencia de enfermedades, y la erosión del suelo; además elevará el rendimiento agroproductivo de la industria cañera.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la inoculación de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* en el crecimiento de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) obtenidas *in vitro*.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Aislar, purificar, caracterizar y propagar a la bacteria *G. diazotrophicus* de plantas silvestres de caña de azúcar para su inoculación en plantas *in vitro*.
2. Inocular plantas *in vitro* de caña de azúcar con la bacteria *G. diazotrophicus*, para la obtención de plantas con un mayor interés comercial.
3. Aislar la bacteria *G. diazotrophicus* de plantas de caña de azúcar inoculadas para la determinación del tratamiento más eficiente de colonización bacteriana.

4. Aclimatar en invernadero plantas de caña de azúcar inoculadas con la bacteria *G. diazotrophicus* que presenten el mejor tratamiento de colonización bacteriana para la evaluación de la simbiosis establecida.
5. Determinar el efecto en la altura y biomasa de plantas de caña de azúcar *in vitro* y aclimatadas para la verificación del aporte benéfico de la bacteria *G. diazotrophicus* en su desarrollo.
6. Determinar el contenido de nitrógeno total en plantas de caña de azúcar aclimatadas para la confirmación de la capacidad fijadora de nitrógeno de la bacteria *G. diazotrophicus*.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Caña de azúcar

1.4.1.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la caña de azúcar se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 1.1 Clasificación taxonómica de la caña de azúcar.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae
Género	<i>Saccharum</i>
Especie	<i>officinarum</i>

Fuente: USDA (2014).

1.4.1.2 Generalidades

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una gramínea nativa de las zonas tropicales y subtropicales del sudeste asiático, forma entre 4 y 12 tallos gruesos de 6 centímetros de grosor aproximadamente, y una altura entre 3 y 5 metros (figura 1.1). Se desarrolla de forma ideal en lugares con abundante luz solar, en un rango de temperatura de 16 a 30 °C. Su cultivo es posible en una gran variedad de suelos, desde los arenosos a los franco-arcillosos y arcillosos, con un pH entre 5.5 y 7.8, sin embargo el suelo óptimo es franco profundo y drenado (Ramírez, 2008).



Figura 1.1 Plantación de caña de azúcar (*S. officinarum*). Fuente: (SIAP, 2014).

Es una de las plantas terrestres con mayor eficiencia, ya que tiene una elevada producción de tallos y hojas, y en su madurez alrededor del 50 % de esta biomasa se encuentra en forma de fibra y azúcares. Luego de la siembra su desarrollo dura entre 12 y 18 meses en cuatro fases: establecimiento, que implica la germinación y emergencia; reposo fisiológico, donde se da el desarrollo del follaje y compactación de tallos; crecimiento rápido, involucra aumento de la biomasa y maduración de tallos; y finalmente la fase de cosecha. El tiempo de cada etapa dependerá de la variedad de caña y zona de cultivo. En relación a la

propagación, se realiza mediante la plantación de trozos de caña, cortados cuando la planta ha madurado; cada corte se llama zafra y de cada una se obtiene una nueva planta idéntica a la progenitora (Allen, 2006).

1.4.1.3 Factores críticos en el crecimiento

1.4.1.3.1 Nutrientes

Los requerimientos nutricionales de una planta hacen referencia a la cantidad total de nutrientes que necesita tomar del suelo para lograr una buena producción. En el caso de la caña de azúcar, al tener que cumplir con una gran generación de material vegetal, y por su largo período de desarrollo, existe una gran absorción de nutrimentos del suelo, alcanzando entre 800 y 1500 Kg de nutrientes por hectárea anualmente, cabe recalcar que estos valores fluctúan según la variedad de caña, el tipo de suelo, las condiciones climáticas y el manejo del cultivo. Entre los macronutrientes esenciales para la caña de azúcar están: nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio y magnesio (Aguilar, 2010; Romero *et al.*, 2004).

Por esta razón, la aplicación de nutrientes y fertilizantes constituye una práctica de gran importancia para que los cultivos de caña de azúcar alcancen altos rendimientos; sin embargo, al realizar análisis del balance de nutrientes se ha observado que grandes cantidades de estos quedan rezagados en las parcelas al no ser aprovechados por la planta. Consecuentemente la mejora en cuanto a la eficiencia de fertilización debe integrarse en el manejo general de los cultivos, permitiendo así una optimización de recursos y una excelente población vegetal, con uniformidad en tallos, los que en el caso de la caña, son la máxima representación de rendimiento (Romero *et al.*, 2004).

1.4.1.3.1.1 Nitrógeno

De los elementos que la caña de azúcar toma del suelo, puesto que son necesarios para su desarrollo, posiblemente el nitrógeno, que forma parte de aminoácidos, proteínas, aminos, amidas, ácidos nucleicos y clorofila; es el nutriente esencial de mayor determinación en su conducta productiva, y por ende en su rendimiento agroindustrial (Quintero, 1997; Wood, 1992).

La planta absorbe el nitrógeno en forma de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+), de la materia orgánica del suelo o de fertilizantes administrados, siendo la primera la más importante, ya que el nitrógeno amoniacal al aplicarse en suelo se convierte en nitrógeno nítrico, sin embargo este genera un gasto de energía en el momento de su absorción, lo que puede demorar el crecimiento si esta ocurre en etapas tempranas de desarrollo, o retrasar la maduración si se realiza en etapas tardías. Las formas iónicas del nitrógeno son fundamentales para la nutrición de la planta, debido a que las presentes en el suelo son gaseosas y se pierden del sistema debido a la desnitrificación (Domínguez, 1989).

Los efectos predominantes de este nutriente en la caña de azúcar se reflejan en un incremento de follaje y población de tallos, cada uno de estos con mayor peso y altura; también impulsa la formación de clorofila, lo que influye en la coloración de follaje y tamaño de sus cepas. Por otro lado, la deficiencia de este macronutriente se evidencia por la presencia de hojas secas y amarillentas, poco desarrollo en cepas y escasa población de tallos (Quintero, 1995; Tisdale & Nelson, 1966).

Los requerimientos de nitrógeno en el cultivo de caña de azúcar dependen de su variedad, etapa de desarrollo, tipo de suelo, rendimiento esperado, así como de las limitaciones que puedan existir como drenaje inadecuado, compactación y salinidad del suelo, entre otros. Para cumplir con estos, se opta por la aplicación

de fertilizantes, los más utilizados son la urea, y el UAN (una mezcla líquida de urea y nitrato de amonio), con 46 % y 32 % de contenido de nitrógeno respectivamente; sin embargo esta práctica no es suficiente, debido a que únicamente entre el 20 % y 50 % de este elemento, aplicado como fertilizante, es aprovechado. Además, debido a las restricciones paulatinas en la adquisición y aplicación de fertilizantes y productos agroquímicos, recomendadas por la FAO, esta alternativa es aún menos considerada al momento de satisfacer las necesidades nutricionales de la caña (FAO, 2013; Romero *et al.*, 2004).

El nitrógeno disponible proviene de tres fuentes, el fertilizante, la mineralización de la materia orgánica y el que puede recircular al estar acumulado en la planta. El nitrógeno de la urea será útil luego de 5 o 7 días de aplicación, mientras que el de la materia orgánica se puede aprovechar de manera progresiva y lenta dependiendo de la humedad y temperatura. Para la aplicación de fertilizantes se debe conocer el ritmo de absorción de la caña de azúcar, la que llega a su punto máximo en los primeros tres meses de cultivo, cuando tiene la capacidad de asimilar más nutriente y almacenarlo en sus tejidos para solventar los altos requerimientos en las fases de elevado crecimiento (Romero *et al.*, 2004).

1.4.1.3.2 Factores limitantes

Existen agentes que pueden ser limitantes para el cultivo de la caña de azúcar, los mismos que son característicos de la región o lugar de siembra, y son conocidos como agroproductivos; también puede tratarse de aquellos que aparecen por ciertas características edafológicas naturales y factores relacionados con la degradación del suelo a causa de actividades humanas (Aguilar, 2010).

Según Aguilar (2010) y Kropff (1997), entre los factores que pueden representar problemas para el desarrollo vegetal están:

- El suministro y disponibilidad del agua, dependientes de la calidad del agua, intensidad de las lluvias y el sistema de riego aplicado.
- Las características del suelo como textura, salinidad, porosidad y pH.
- El sistema de drenaje relacionado con los niveles freáticos y profundidad del terreno.
- La variedad de caña de azúcar con la que se trabaja, debido a distintos caracteres genotípicos.
- El clima, que involucra distintas condiciones de temperatura, humedad relativa, precipitaciones y luz solar.
- Plagas, malezas, fenómenos naturales y agentes contaminantes.

Los factores mencionados influyen de manera directa en la fisiología vegetal, principalmente en el proceso de fotosíntesis, el que determina la productividad del 90 % de la biomasa seca y 100 % de la sacarosa y bagazo generados (Aguilar, 2010).

1.4.2 Cultivo de tejidos *in vitro*

Es un conjunto de técnicas que se encarga del crecimiento y mantenimiento de órganos y tejidos vegetales (explantes), en condiciones estériles y controladas, con el fin de replicar o transformar este material y obtener plantas libres de contaminación, enfermedades y patógenos. Estas plantas posteriormente serán aclimatadas a condiciones naturales en las que tendrán un óptimo desarrollo (Roca & Mroginski, 1991).

1.4.2.1 Micropropagación

La micropropagación *in vitro* es una herramienta biotecnológica que cumple con la finalidad de propagar plantas seleccionadas por determinadas características fenotípicas o genotípicas de interés, con una mayor tasa de multiplicación que por vía sexual, manteniendo además un elevado nivel de

sanidad y estabilidad genética; en espacios reducidos y durante todo el año, ya que al trabajar de manera *in vitro* no son afectadas por condiciones ni estaciones climáticas (Cruz, 2004).

Dentro del proceso de micropropagación se distinguen fases generales que pueden ser aplicadas a cualquier especie vegetal, las que dependiendo de cada caso pueden someterse a ciertos cambios. Estas fases son: selección y preparación de la planta, desinfección del material vegetal, introducción *in vitro*, multiplicación de brotes, enraizamiento y aclimatación (Castillo, 2004).

De todas las etapas las de importancia para el presente estudio son: la fase de enraizamiento, donde los explantes que ya desarrollaron brotes con hojas, en la fase de multiplicación, serán individualizados y transferidos a un medio de cultivo regulado con auxinas, las que estimularán la formación de raíces y así completarán la producción de una planta autótrofa (figura 1.2); y la etapa de aclimatación, en la cual se adaptará anatómica y fisiológicamente a condiciones *ex vitro*; que en la actualidad se recomienda realizarla en fibra de coco como sustrato, ya que por sus características físicas permite un adecuado enraizamiento, además al tener una cobertura inerte que conserva la humedad disminuye el estrés hídrico de las plantas (Cruz, 2004; Reckmann, 2011).



Figura 1.2 Plantas de caña de azúcar en la fase de enraizamiento en el laboratorio de cultivo de tejidos Jardín Botánico de Atlanta, Georgia, EE.UU.

Fuente: (Daderot, 2007).

1.4.3 Bacterias endófitas

Las bacterias endófitas son aquellas que forman una asociación biológica con plantas mediante la colonización de sus tejidos internos sin ocasionarles efectos negativos. Estos microorganismos se encuentran dispersos en pequeños agregados, donde cumplen funciones importantes para la fisiología de la planta hospedera, ya que son capaces de impulsar su crecimiento, elevar la resistencia a enfermedades y patógenos, así como ayudar a la fijación de nitrógeno (Hallmann, Quadt-Hallmann, Mahaffee, & Kloepper, 1997; Verma, Ladha & Tripathi, 2001).

1.4.3.1 Fijación biológica de nitrógeno

Es el proceso por el cual ciertos microorganismos captan nitrógeno molecular (N_2) del aire y lo convierten en formas asimilables por las plantas, como iones amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-); la necesidad de transformar al nitrógeno se debe a que la forma molecular del mismo, presente en la atmósfera, al tener un triple enlace entre sus dos átomos, es una molécula prácticamente inerte que no es aprovechada por la mayoría de organismos vivos (Mayz, 2004).

La fijación biológica de nitrógeno está dada por el complejo nitrogenasa de los microorganismos, el cual requiere un elevado gasto de energía y una baja concentración de oxígeno, regulada por actividades propias del agente fijador, ya que este inhibe la actividad reductasa (Ureta & Nordlund, 2002).

El mecanismo de fijación puede ser realizado por hongos, algas o bacterias en vida libre, o en simbiosis con plantas, como es el caso de la bacteria endófito *G. diazotrophicus* con la caña de azúcar (*S. officinarum*) (Muñoz, 2004).

1.4.3.2 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

1.4.3.2.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la bacteria *G. diazotrophicus* se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 1.2 Clasificación taxonómica de la bacteria *G. diazotrophicus*.

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Alphaproteobacteria
Orden	Rhodospirillales
Familia	Acetobacteraceae
Género	<i>Gluconacetobacter</i>
Especie	<i>diazotrophicus</i>

Fuente: NCBI (2014).

1.4.3.2.2 Historia

En el año 1988, por Cavalcante y Döbereiner, fue aislada por primera vez una bacteria fijadora de nitrógeno a partir de tallos y raíces de caña de azúcar (*S. officinarum*), recibiendo el nombre de *Saccharobacter nitrocaptans*. Sin embargo, en el informe escrito de este estudio se añadió como addendum el cambio de nombre de la bacteria, debido a estudios de hibridación genómica, a *Acetobacter nitrocaptans*. Posteriormente en una separata se observó una corrección hecha por Döbereiner, que nombraba a la nueva bacteria como *Acetobacter diazotrophicus*; y finalmente, Yamada, Hoshino & Ishikawa la nombraron como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, debido a que plantearon una nueva taxonomía para la familia Acetobacteraceae (Muñoz & Caballero, 2001).

1.4.3.2.3 Características generales

Esta bacteria endófito posee un alto potencial agrobiotecnológico, ya que pertenece al único género de la familia Acetobacteraceae con la capacidad de fijar nitrógeno molecular (N_2), en presencia de nitratos, excretándolo en más del 50 % directamente en el interior de los tejidos de la planta, en forma asimilable, cubriendo en gran parte sus requerimientos para la síntesis de macromoléculas esenciales. Posee la capacidad de producir auxinas como el ácido indol acético y citocinas, las que influyen en la fisiología y crecimiento de la caña de azúcar; además actúa como controlador biológico de patógenos, ya que en base a estudios *in vitro* se ha demostrado que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos perjudiciales para la caña de azúcar, como el hongo *Colletotrichum falcatum* Went y la bacteria *Xanthomonas albilineans* (Bastian *et al.*, 1998; Muthukumarasamy, Revathi & Vadivelu, 2000; Piñón *et al.*, 2002).

G. diazotrophicus es una bacteria aerobia capaz de oxidar etanol a ácido acético y posteriormente a dióxido de carbono y agua, presenta pequeñas células en forma de bacilos Gram negativos (figura 1.3) con hasta tres flagelos laterales. Su crecimiento se da de manera estricta en presencia de sacarosa, fructosa o glucosa, pH ácido, con un valor óptimo de 5.5 y una temperatura de 30 °C (Muñoz & Caballero, 2001).



Figura 1.3 Bacilos Gram negativos de la especie *G. diazotrophicus*, observados al microscopio. Fuente: (Gaviria, 2010).

1.4.3.2.4 Aislamiento y caracterización bioquímica

El aislamiento de un microorganismo endófito depende en gran medida de la técnica así como del medio de cultivo a utilizar, es por eso que en el caso particular de la bacteria *G. diazotrophicus*, las plantas seleccionadas deben desinfectarse de manera superficial para la eliminación de microorganismos externos y así evitar posibles contaminaciones; este material vegetal requiere inocularse en un medio de cultivo libre de nitrógeno en el cual la bacteria manifieste su capacidad de fijarlo (Muñoz & Caballero, 2001).

El medio de cultivo en el que se han obtenido los mejores resultados de aislamiento y desarrollo de *G. diazotrophicus* es conocido como LGI-P, en este medio, líquido o semisólido, se evidencia su presencia por el desarrollo de una película superficial de color amarillo (figura 1.4a) y en medio sólido, se distinguen colonias planas de aspecto irregular del mismo color (figura 1.4b). Debido al crecimiento bacteriano, luego de 7 días de incubación, se observa un viraje del indicador de pH azul de bromotimol, que contiene el medio, de amarillo (pH 5.5) a incoloro (pH <5.5), debido a la formación de ácido acético (Dibut, Ortega, Martínez, Fey & Ríos, 2005).

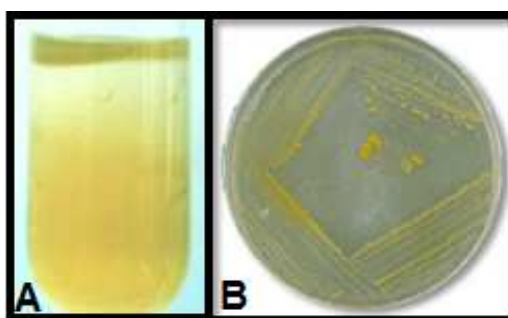


Figura 1.4 Crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P luego de 7 días de incubación a 30 ° C. **A:** medio semisólido. **B:** medio sólido. Fuente: (Gaviria, 2010).

Sin embargo, las características mencionadas no son únicas de la especie *G. diazotrophicus*, por lo que para una identificación adecuada es necesario el reconocimiento de sus características fenotípicas y su comportamiento metabólico frente a diferentes sustratos mediante la realización de pruebas morfológico-bioquímicas como: asimilación de azúcares y aminoácidos como única fuente de carbono, oxidasa, catalasa, motilidad, utilización de citrato, producción de indol a partir de triptófano, producción de ácido sulfhídrico y la formación progresiva de colonias de color marrón en el medio Agar Dextrosa Papa, PDA, enriquecido con sacarosa (figura 1.5); la que es en realidad una prueba decisiva, ya que es la única especie fijadora de nitrógeno del género *Gluconacetobacter* con esta característica (Dibut *et al.*, 2005; Muñoz & Caballero, 2001).

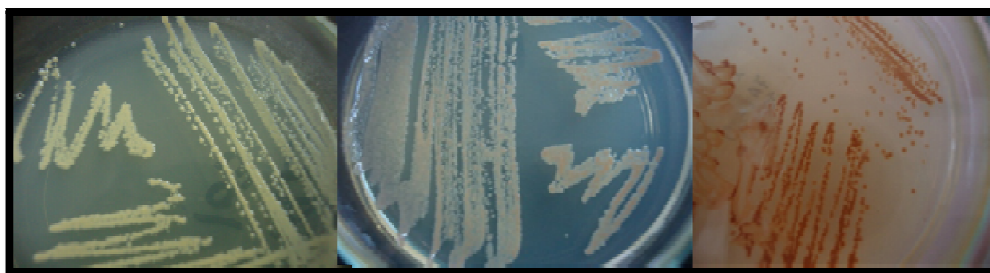


Figura 1.5 Cambio de coloración del crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio PDA enriquecido con sacarosa, en diferentes días de incubación a 30 °C. Fuente: (Gaviria, 2010).

1.6 Sistema de hipótesis

H1: Es posible aislar, purificar, caracterizar y propagar a la bacteria *G. diazotrophicus* de plantas de caña de azúcar que crecen de manera silvestre en el Ecuador.

H2: La inoculación de la bacteria *G. diazotrophicus* a plantas *in vitro* de caña de azúcar aumenta su altura, biomasa y contenido de nitrógeno.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

2.1.2 Responsable del proyecto

Liseth Alexandra Salinas Toledo.

2.1.3 Instituciones

Laboratorios de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

2.1.4 Colaboradores científicos

Pablo Landázuri MSc. Director del proyecto.

BSc. Karina Ponce. Codirectora del proyecto.

Lic. Marco Taco. Encargado de los laboratorios de Química y Suelos IASA I.

2.2 Zona de estudio

2.2.1 Fase de muestreo

El muestreo de caña de azúcar se realizó en la parroquia Mindo, cantón San Miguel de los Bancos, provincia de Pichincha, al noroeste de la ciudad de Quito.

Latitud: 00° 03' 32.8" N.

Longitud: 78° 45' 42.2" E.

Altitud: 1264 m.s.n.m.

2.2.2 Fase de laboratorio

Se realizó en los laboratorios de la Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, ubicados en la parroquia Loreto, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

2.2.3 Fase de aclimatación

Las plantas de caña de azúcar se aclimataron en invernadero, en la Parroquia Tumbaco, cantón Quito, provincia de Pichincha.

Latitud: 00° 11' 11.0" N.

Longitud: 78° 22' 49.6" E.

Altitud: 2384 m.s.n.m.

2.3 Período de tiempo de investigación

El presente proyecto inició en Enero y finalizó en Agosto del 2014.

2.4 Diseño experimental y análisis estadístico

2.4.1 Fase de aislamiento y caracterización bacteriana

Para el aislamiento bacteriano se tomaron muestras de plantas de la parroquia Mindo, ya que en esta región existen cultivos silvestres de caña de azúcar que crecen sin la aplicación de fertilizantes, por lo que existía mayor probabilidad de encontrar la bacteria de interés de acuerdo a lo indicado por Pérez, Ovalle, Rodas, López & Hernández (2003).

Cada parte de la planta que fue inoculada en el medio de cultivo específico para bacterias fijadoras de nitrógeno, constituyó una unidad

experimental; a continuación, la bacteria aislada, se la sembró en diferentes medios de cultivo para su caracterización y multiplicación. En esta fase no se realizaron pruebas estadísticas pues no se comparó métodos, únicamente se buscó obtener y purificar la bacteria.

2.4.2 Fase de inoculación de la bacteria en plantas *in vitro*

En la fase de inoculación se comparó concentración del medio de cultivo Murashige & Skoog, MS, y concentración de la fuente de carbono, sacarosa; por lo que se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial de dos factores: concentración del medio de cultivo (m) y concentración de sacarosa (s); cada uno en dos niveles.

Tratamientos:

Arreglo factorial de $2 * 2$.

Tratamientos (T) = $2 * 2 = 4$

De acuerdo a esto y con la interacción entre (m) y (s), se tiene:

- T1: m1s1
- T2: m1s2
- T3: m2s1
- T4: m2s2

Se utilizó también un grupo blanco, como testigo, para cada uno de los tratamientos, los que no fueron inoculados con el cultivo bacteriano.

Repeticiones:

4 tratamientos * 5 réplicas = 20 repeticiones.

4 tratamientos * 5 réplicas para blancos = 20 repeticiones.

De acuerdo a esta distribución se realizará un total de 40 repeticiones.

La evaluación de los resultados de inoculación bacteriana, se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) por modelos mixtos y la prueba basada en conglomerados de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) al 95 %, evaluando la inoculación, características de las colonias obtenidas, estado de la planta y características del medio de cultivo, con lo que se pudo determinar la metodología con la que se alcanzó la más eficiente colonización (Paulino, Kessler, Ochoa & De michelis, 2013).

2.4.3 Fase de aclimatación

Con el mejor método de inoculación se trataron 18 plantas distribuidas en tres réplicas de seis repeticiones cada una, para en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, evaluar si existieron diferencias en la altura, biomasa y contenido de nitrógeno de cada planta; adicionalmente se utilizó el mismo número de plantas sin inoculación bacteriana, grupo blanco. En esta fase se evaluó un total de 36 plantas.

Con los resultados obtenidos se realizó un ANOVA, por modelos mixtos que permitió determinar si existieron diferencias entre los valores muestrales analizados; y pruebas de significancia de DGC, al 95 % de confianza, para establecer cuáles fueron estas diferencias y contrastes entre las plantas inoculadas y el grupo blanco, para lo cual se utilizó el lenguaje de programación R y paquete informático Infostat versión 2014.

2.5 Procedimiento

2.5.1 Fase de campo

2.5.1.1 Muestreo de plantas de caña de azúcar

Se tomaron muestras de hojas, tallos y raíces de plantas de caña de azúcar (*S. officinarum*), que crecen de manera silvestre en la parroquia Mindo. Las

muestras se cortaron y almacenaron en fundas plásticas herméticas hasta su traslado al laboratorio figura (2.1). A cada muestra obtenida se le asignó un código de identificación dado por la letra M, el número de planta y la inicial de la parte de la planta de la que se obtuvo. Es así que para la muestra obtenida a partir de raíz de la planta 1, el código asignado fue M1R.



Figura 2.1 Muestras de caña de azúcar (*S. officinarum*) obtenidas en la Parroquia Mindo, empacadas para el transporte hacia el laboratorio.

2.5.2 Fase de laboratorio

2.5.2.1 Aislamiento de *G. diazotrophicus*

Para aislar la bacteria de las muestras vegetales, se desinfectaron superficialmente mediante un lavado con agua y detergente, se enjuagaron con agua corriente y a continuación se realizaron tres enjuagues con agua destilada (Pérez *et al.*, 2003).

Posteriormente se realizaron cortes de aproximadamente 10 mm de longitud para raíz, 25 mm² para hoja y 125 mm³ para tallo. Cada uno de estos se inoculó, en un tubo de ensayo con el medio de cultivo líquido LGI-P propuesto por

Döbereiner, Baldani & Baldani (1995), selectivo para bacterias fijadoras de nitrógeno, que contiene: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 2H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, Fe-EDTA, azul de bromotimol y sacarosa, con un pH ajustado a 5.5. Los tubos de ensayo se incubaron durante 7 días a 30 °C.

2.5.2.2 Purificación y caracterización de la bacteria *G. diazotrophicus*

De los tubos de ensayo que presentaron cambio de coloración del medio a incoloro y crecimiento bacteriano en forma de película amarilla en la parte superior (figura 2.2), se tomó con un asa de inoculación, una pequeña cantidad de bacterias y se sembró por agotamiento en medio LGI-P sólido, con el fin de obtener colonias aisladas (figura 2.3); se incubaron a 30 °C durante 7 días (Dibut *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2001).



Figura 2.2 Crecimiento bacteriano a partir de tallo de caña de azúcar en medio LGI-P líquido luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Medio LGI-P incoloro. **B:** Película superior de color amarillo.



Figura 2.3 Siembra de crecimiento bacteriano en medio LGI-P líquido a medio LGI-P sólido.

Las colonias que se presentaron de forma irregular con una coloración amarilla (figura 2.4), para su identificación, fueron tomadas y sembradas mediante la técnica de estría simple en cajas Petri con medio PDA, ya que únicamente las colonias de la especie *G. diazotrophicus*, luego de 7 días de incubación a 30 °C, presentan una coloración marrón (Dibut *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2001).

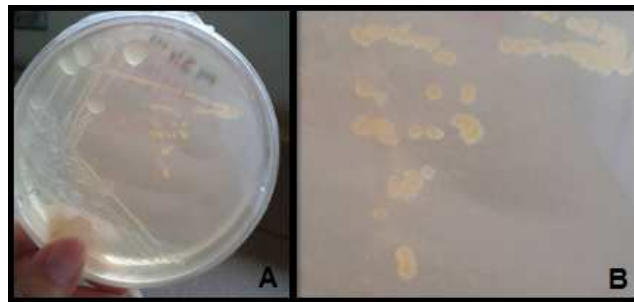


Figura 2.4 A: Crecimiento bacteriano en medio LGI-P luego de 7 días de incubación a 30 °C. **B:** Colonias bacterianas amarillas, planas y de forma irregular.

Una vez obtenido el crecimiento esperado en medio PDA, se lo sembró en LGI-P y de este se tomó una colonia bacteriana, se realizó un frotis sobre un portaobjetos y se fijó para la realización de una tinción Gram (figura 2.5) y su posterior observación al microscopio y reconocer las características morfológicas de la bacteria, bacilo Gram negativo (Cavalcante & Döbereiner, 1988; FDA, 1998).



Figura 2.5 Proceso de tinción Gram en bacterias obtenidas en medio PDA con características correspondientes a *G. diazotrophicus*.

Para la caracterización bioquímica de la bacteria, se realizaron pruebas en diferentes medios de cultivo, con el primer crecimiento bacteriano observado en medio LGI-P sólido (Dibut *et al.*, 2005), las pruebas realizadas fueron:

Catalasa: Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno sobre un portaobjetos, a continuación se agregó mediante un asa de platino una colonia bacteriana (figura 2.6). Se esperó la reacción positiva representada por la formación inmediata de burbujas (Gamazo, López & Díaz, 2005).

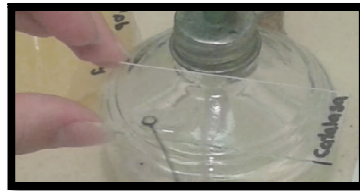


Figura 2.6 Colocación de colonia bacteriana sobre portaobjetos en una gota de peróxido de hidrógeno para la prueba de catalasa.

Oxidasa: Se colocaron dos gotas del reactivo de Kovac's-oxidasa sobre papel filtro, a continuación se tomó con el asa de platino, una colonia del cultivo bacteriano y se la extendió sobre el reactivo (figura 2.7). De manera inmediata se esperó la reacción negativa, en la que no existe cambio de coloración (Dibut *et al.*, 2005; Gamazo *et al.*, 2005).

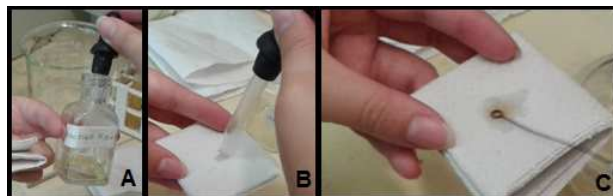


Figura 2.7 A: Reactivo de Kovac's-oxidasa. **B:** Colocación de reactivo en papel filtro. **C:** Extensión de colonia bacteriana para prueba de oxidasa.

Utilización de citrato: Se utilizó el medio de cultivo agar citrato de Simmons, se solidificó con inclinación (pico de flauta) en tubo de ensayo; se tomó una muestra de crecimiento bacteriano con una aguja de inoculación y se sembró por picadura en el fondo y luego por estría simple sobre el pico de flauta (figura 2.8). Luego de incubación a 30°C, se esperó la reacción positiva representada por el cambio de coloración del medio de verde a azul (Dibut *et al.*, 2005; Gamazo *et al.*, 2005).



Figura 2.8 A: Solidificación en pico de flauta de agar citrato de Simmons. **B:** Siembra bacteriana por picadura en medio citrato de Simmons.

Producción de ácido sulfhídrico, indol a partir de triptófano y motilidad: Se utilizó el medio de cultivo sulfide-indole-motility, SIM, se solidificó en tubos de ensayo; se tomó una muestra de crecimiento bacteriano con una aguja de inoculación y se sembró por picadura en el fondo (figura 2.9).

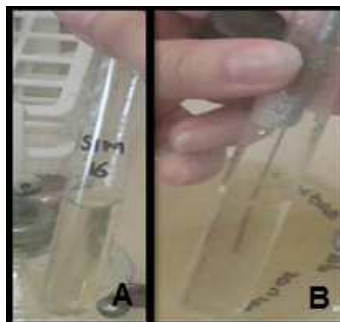


Figura 2.9 A: Medio SIM. **B:** Siembra bacteriana por picadura en medio SIM.

Luego de incubación a 30°C se esperaron los siguientes resultados:

- Turbidez o crecimiento alrededor de la línea de siembra, debido a la motilidad de la bacteria.
- Permanencia del color ámbar, original del medio, debido a la reacción negativa a la producción de ácido sulfhídrico.

Finalmente, observado el crecimiento bacteriano se agregaron cinco gotas del reactivo de Kovac's y se esperó observar una coloración roja en el medio de cultivo, debido a una respuesta positiva para la generación de indol (Anitha & Thangaraju, 2010; Dibut *et al.*, 2005; Gamazo *et al.*, 2005).

Asimilación de aminoácidos como única fuente de carbono: Se utilizó el medio de cultivo LGI-P con la sustitución de sacarosa por cada uno de los siguientes aminoácidos: L-prolina y L-cisteína; al 0.1 %. Se consideró como control positivo al medio LGI-P original. Se tomó una muestra de crecimiento bacteriano y se sembró por estría simple en cada uno de los medios (figura 2.10), se incubaron a 30°C durante 7 días (Fuentes *et al.*, 2001).

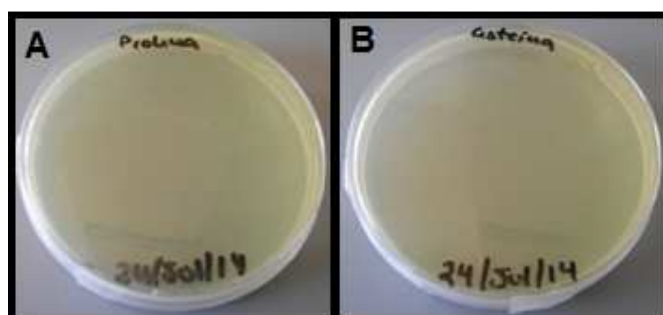


Figura 2.10 Medios LGI-P sembrados por estría simple, con diferentes aminoácidos como única fuente de carbono. **A:** L-prolina. **B:** L-cisteína.

Asimilación de azúcares como única fuente de carbono: Se usó el medio de cultivo LGI-P con la sustitución de sacarosa por cada uno de los siguientes azúcares: D-celobiosa, D-lactosa, D-maltosa, D-manitol y D-xilosa; al 1 %. Se consideró como control positivo al medio LGI-P original. Se tomó una muestra de crecimiento bacteriano y se sembró por estría simple en cada uno de los medios (figura 2.11), se incubaron a 30°C durante 7 días (Fuentes *et al.*, 2001).

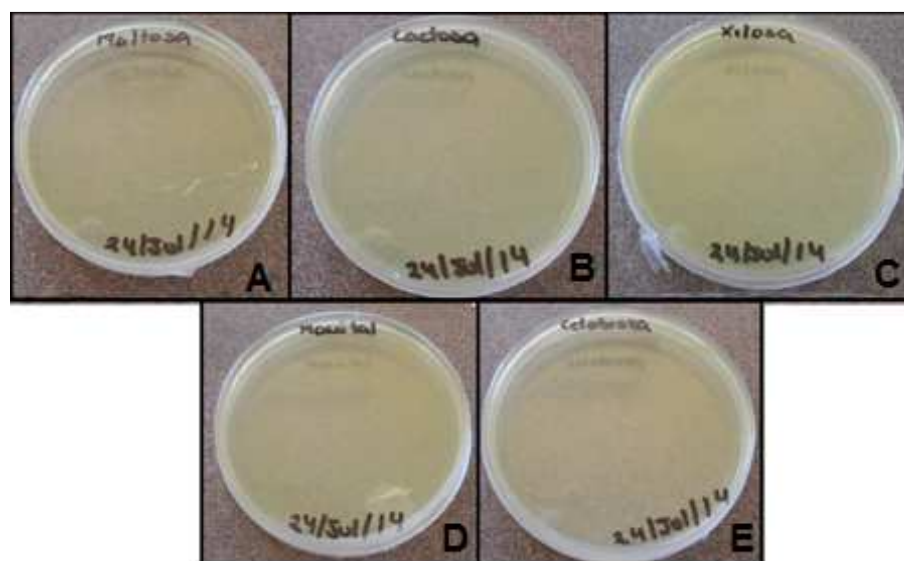


Figura 2.11 Medios LGI-P sembrados por estría simple, con diferentes azúcares como única fuente de carbono. **A:** D-maltosa. **B:** D-lactosa. **C:** D-xilosa. **D:** D-manitol. **E:** D-celobiosa.

En el anexo A se muestra una tabla con el resumen de los resultados en las pruebas morfológico-bioquímicas esperados para la bacteria *G. diazotrophicus*.

2.5.2.3 Propagación de la bacteria *G. diazotrophicus*

A continuación, las bacterias caracterizadas e identificadas se sembraron e incubaron a 30 °C en tres medios de cultivo para determinar en cuál se dio una

mejor multiplicación, los seleccionados fueron: medio líquido LGI-P, caldo V8 y medio agar nutritivo (figura 2.12) (Pérez *et al.*, 2003).

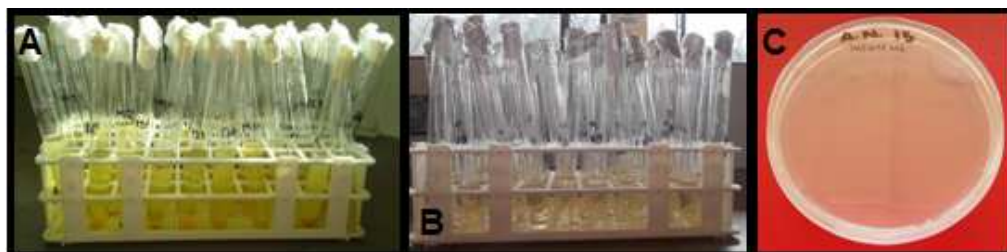


Figura 2.12 Medios de cultivo para determinar la mejor multiplicación de *G. diazotrophicus*. **A:** LGI-P líquido. **B:** Caldo V8. **C:** Agar nutriente.

Luego de determinar el mejor medio cultivo, en este se realizó la multiplicación bacteriana hasta obtener una concentración, según lo propuesto por Li & MacRae (1992), de aproximadamente 10^7 UFC·mL⁻¹. Para esto se realizaron los patrones de turbidez McFarland de acuerdo a lo indicado por NCCCLS (1993), siendo específicos para compararlos con el medio de cultivo seleccionado, mediante valores de absorbancia y transmitancia, medidos en el espectrofotómetro Spectroflex 6600 (figura 2.13). Cuando se obtuvo la concentración necesaria, se procedió a la inoculación del cultivo bacteriano en plantas *in vitro* de caña de azúcar (Becton, Dickinson & Company, 2005).



Figura 2.13 A: Medio líquido sin inoculación bacteriana y patrones de turbidez McFarland, para concentraciones de 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC·mL⁻¹. **B:** Espectrofotómetro Spectroflex 6600.

2.5.2.4 Inoculación de *G. diazotrophicus* en plantas *in vitro* de caña de azúcar

Se compraron plantas *in vitro* de caña de azúcar, se extrajeron de su medio de cultivo original y se realizaron tres lavados de la raíz con agua destilada estéril (figura 2.14) (Reis *et al.*, 1999).

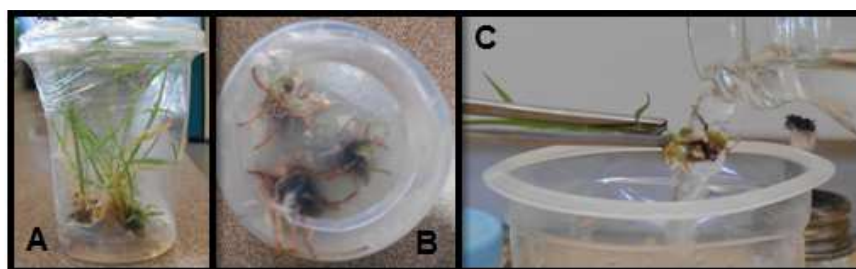


Figura 2.14 **A:** Plantas *in vitro* de caña de azúcar. **B:** Raíces de plantas *in vitro* de caña de azúcar. **C:** Lavado de la raíz con agua destilada estéril.

Posteriormente, la raíz se sumergió en el cultivo bacteriano, que contenía la concentración celular deseada, para luego sembrar las plantas en medio Murashige & Skoog, MS, al 10 % y 20 % (figura 2.15); el medio MS propuesto por Murashige & Skoog (1962), se modificó para eliminar la fuente de nitrógeno, vitaminas y hormonas. Cada una de estas concentraciones estuvo enriquecida con dos niveles de sacarosa, $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Reis *et al.*, 1999).

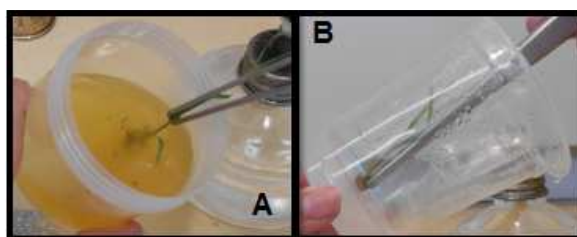


Figura 2.15 **A:** Inmersión de raíz de caña de azúcar *in vitro* en cultivo de *G. diazotrophicus*. **B:** Siembra de planta de caña de azúcar inoculada con *G. diazotrophicus* en medio MS modificado.

De forma paralela, se sometieron, a la misma metodología, plantas que no fueron inoculadas con el cultivo bacteriano, las que actuaron como testigos de los diferentes tratamientos; las plantas fueron mantenidas, de acuerdo a lo sugerido por Reis *et al.* (1999), a 30 °C con una iluminación de 60 μ PPF, por 12 h·día⁻¹, durante 15 días. Se realizaron cinco repeticiones para cada tratamiento y la unidad experimental fue un frasco de cultivo, que contenía una planta (figura 2.16).

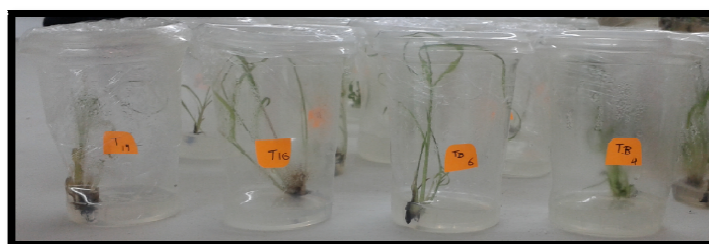


Figura 2.16 Plantas *in vitro* de caña de azúcar testigo e inoculadas con *G. diazotrophicus* en incubación a 30°C con una iluminación de 60 μ PPF.

2.5.2.5 Evaluación del mejor tratamiento de colonización bacteriana en plantas *in vitro* de caña de azúcar

Luego del período de incubación *in vitro* se tomó la planta del medio MS, se la lavó en tres ocasiones con agua destilada estéril y se la separó en raíz, tallo y hoja; cada parte de la planta se licuó en una solución al 10% de sacarosa (figura 2.17) (Dibut *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2001).



Figura 2.17 A: Partes de planta de caña de azúcar, preparadas para ser licuadas, en solución de sacarosa al 10 %. **B:** Licuados obtenidos.

El líquido obtenido fue inoculado por estría simple en medio de cultivo LGI-P sólido (figura 2.18), para su incubación a 30°C durante 7 días. Se realizó también la prueba confirmatoria, de la presencia de *G. diazotrophicus*, en las plantas inoculadas, mediante el cultivo en PDA con la metodología ya descrita (Dibut *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2001).

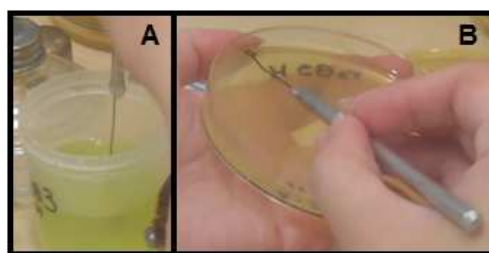


Figura 2.18 A: Obtención de inóculo a partir de hoja licuada de caña de azúcar. **B:** Siembra por estría simple en medio LGI-P sólido.

Para determinar el mejor tratamiento, se consideró:

Estado de la planta: Se evaluó la salud de la planta considerando una escala de color según su aspecto visual. La valoración se muestra en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Escala de valoración para el estado de la planta luego del período de inoculación con *G. diazotrophicus*.

Valoración	Descripción
0	Planta muerta.
1	Planta con hojas amarillas, 100 %.
2	Planta con predominancia de hojas amarillas, 75 %.
3	Planta con predominancia de hojas verdes, 75 %.
4	Planta con hojas verdes, 100 %.

En la figura 2.19 se puede observar imágenes de plantas ejemplo para la escala de valoración.

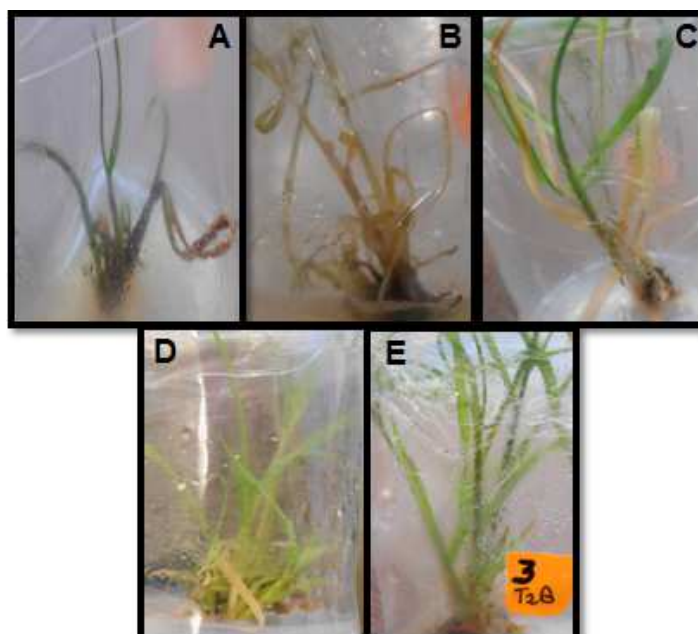


Figura 2.19 Aspecto visual de plantas de caña de azúcar para la evaluación de su estado. **A:** Muerta. **B:** Amarilla. **C:** Con predominancia de hojas amarillas. **D:** Con predominancia de hojas verdes. **E:** Verde.

Contaminación: Se evaluó la presencia de contaminación en las plantas y su medio de cultivo. La escala utilizada se muestra en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Escala de valoración para contaminación en la planta luego del período de inoculación con *G. diazotrophicus*.

Valoración	Descripción
0	Presencia de contaminación.
1	Ausencia de contaminación.

En la figura 2.20 se puede observar imágenes que muestran contaminación y su ausencia para la escala de valoración.



Figura 2.20 Aspecto visual de medio MS con plantas de caña de azúcar para la evaluación de contaminación. **A:** Presencia de contaminación. **B:** Ausencia de contaminación.

Crecimiento bacteriano y su abundancia en medio LGI-P: Luego de la siembra en medio LGI-P sólido de los licuados de las partes de las plantas de caña de azúcar inoculadas con *G. diazotrophicus* e incubadas; se valoró el grado en que las plantas fueron colonizadas de acuerdo a la escala que se muestra en la tabla 2.3 y 2.4.

Tabla 2.3 Escala de valoración para el crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P a partir de partes de planta de caña de azúcar luego del período de inoculación.

Parámetro	Valoración	Descripción
Resultado de crecimiento en LGI-P	0	Crecimiento bacteriano no esperado.
	1	Crecimiento bacteriano esperado con contaminación.
	2	Crecimiento bacteriano esperado puro.

Tabla 2.4 Escala de valoración para la abundancia de crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P a partir de partes de planta de caña de azúcar luego del período de inoculación.

Parámetro	Valoración	Descripción
Abundancia de crecimiento en LGI-P	0	Ausencia de crecimiento.
	1	Crecimiento escaso.
	2	Crecimiento abundante.

En la figura 2.21 se muestra la referencia de las características del crecimiento bacteriano en LGI-P utilizada para su valoración.

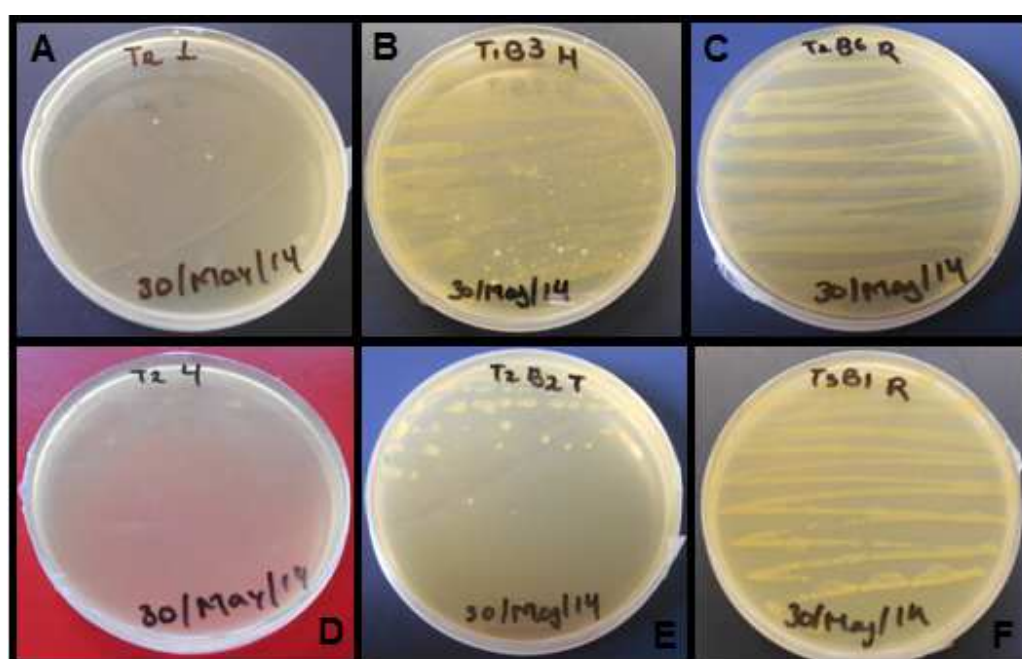


Figura 2.21 Características de crecimiento bacteriano en medio LGI-P luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Crecimiento bacteriano no esperado. **B:** Crecimiento bacteriano esperado con contaminación. **C:** Crecimiento bacteriano esperado puro. **D:** Ausencia de crecimiento. **E:** Crecimiento escaso. **F:** Crecimiento abundante.

Color y homogeneidad del crecimiento bacteriano en medio PDA: Las características de los crecimientos bacterianos obtenidos en medio LGI-P, luego sembrados en medio PDA, se evaluaron de acuerdo a sus características de color y homogeneidad, utilizando la escala de valoración que se muestra en las tablas 2.5 y 2.6.

Tabla 2.5 Escala de valoración para el color de crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio PDA a partir de aislados en medio LGI-P.

Parámetro	Valoración	Descripción
Resultado del color de crecimiento en PDA	0	Crecimiento bacteriano no esperado.
	1	Crecimiento bacteriano marrón claro.
	2	Crecimiento bacteriano marrón.
	3	Crecimiento bacteriano marrón oscuro.

Tabla 2.6 Escala de valoración para la homogeneidad del color de crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio PDA a partir de aislados en medio LGI-P.

Parámetro	Valoración	Descripción
Homogeneidad de color en PDA	1	No homogéneo.
	2	Homogéneo.

En la figura 2.22 se muestra la referencia de las características del crecimiento bacteriano en PDA utilizada para su valoración.

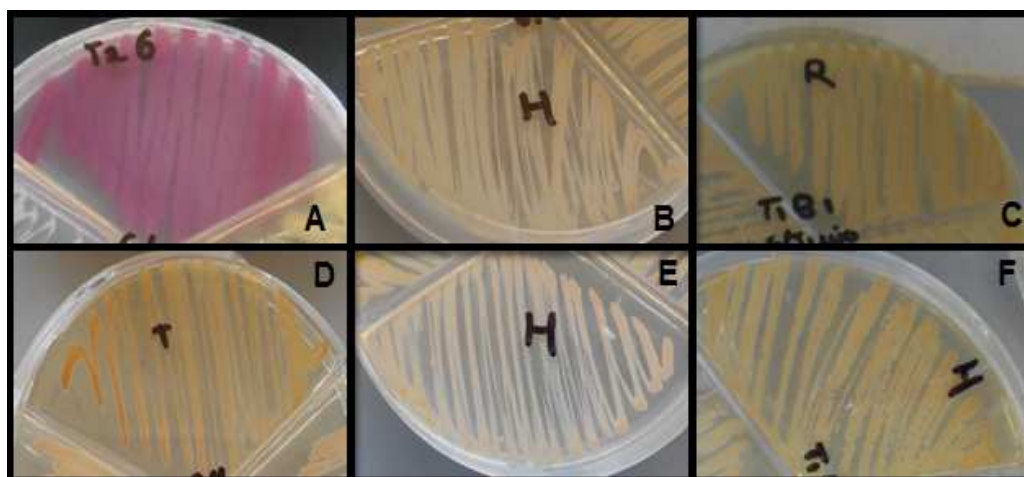


Figura 2.22 Crecimiento bacteriano en medio PDA luego de 15 días de incubación a 30 °C. **A:** Crecimiento bacteriano no esperado. **B:** Crecimiento bacteriano marrón claro. **C:** Crecimiento bacteriano marrón. **D:** Crecimiento bacteriano marrón oscuro. **E:** Coloración no homogénea. **F:** Coloración homogénea.

Seleccionado el mejor tratamiento se realizó nuevamente la inoculación bacteriana en plantas *in vitro* de caña de azúcar con la metodología ya descrita, se trabajó con 18 plantas distribuidas en tres réplicas de seis repeticiones cada una. Previa a la inoculación se midió la altura (desde la base del tallo hasta la última hoja con cuello visible) y biomasa de cada planta para establecer sus condiciones iniciales en el ensayo.

2.5.2.6 Aclimatación de plantas de caña de azúcar inoculadas con *G. diazotrophicus*

Luego de la etapa de incubación, se tomó cada planta de su medio de cultivo, se midió su altura y biomasa para la comparación con los valores iniciales y así conocer el efecto de la bacteria en este período. Pues como lo indican

Muthukumarasamy, Revathi & Loganathan (2002), un período entre 7 y 15 días es el óptimo para evaluar los efectos de la colonización de la bacteria *G. diazotrophicus* en condiciones *in vitro*.

Posteriormente, se realizaron tres lavados de la raíz con agua destilada estéril y se pasaron las plantas a recipientes individuales con fibra de coco como único sustrato (figura 2.23), ya que este les provee de características físicas y químicas necesarias para un crecimiento adecuado en la fase de aclimatación en invernadero, la que se planificó para 30 días de acuerdo a lo sugerido por Reis *et al.* (1999).

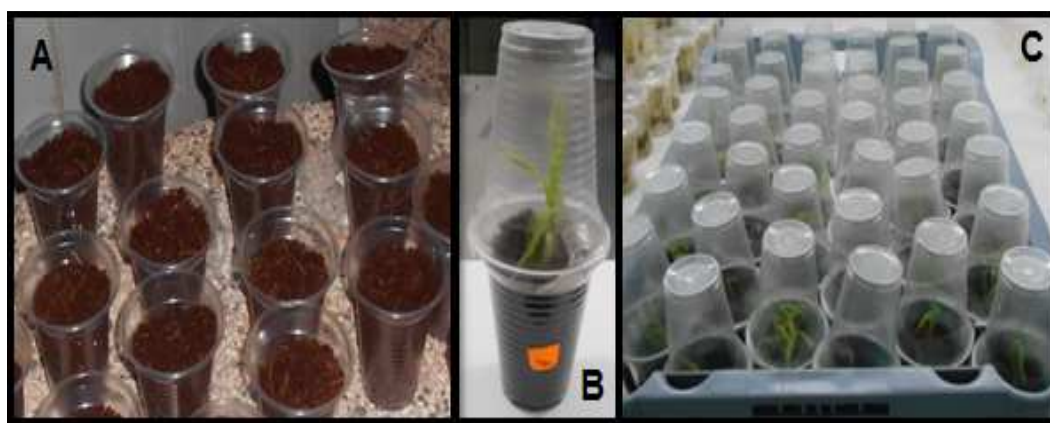


Figura 2.23 A: Fibra de coco en envases plásticos para plantas individuales. **B:** Planta de caña de azúcar en fibra de coco como único sustrato, cubierta totalmente al inicio de la fase de aclimatación para mantener una humedad relativa elevada. **C:** Plantas de caña de azúcar en tratamiento, al inicio de la fase de aclimatación en la sala de incubación.

Durante los nueve primeros días de esta etapa, las plantas permanecieron en la sala de incubación, en este tiempo se realizó el riego del sustrato cada tres días con 5 mL de medio MS líquido con la concentración y aporte de sacarosa del

tratamiento seleccionado con mayor eficiencia para la etapa de colonización bacteriana (figura 2.24) (Castillo, 2004).

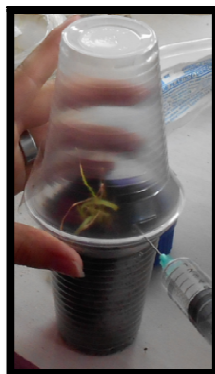


Figura 2.24 Riego de planta de caña de azúcar en fibra de coco con 5 mL de medio líquido MS modificado durante los seis primeros días de la etapa de aclimatación.

En el día 9 de la fase aclimatación, se realizaron agujeros en el recipiente plástico que cubrió las plantas (figura 2.25), para reducir progresivamente la humedad relativa y así volver funcionales a sus estomas y desarrollar adecuadamente su cutícula. Debido a que empezaría a haber pérdida de humedad se incrementó el volumen del riego a 10 mL (Castillo, 2004).



Figura 2.25 Agujeros en la cobertura de planta de caña de azúcar para la reducción de la humedad relativa en la etapa de aclimatación.

A continuación, se procedió a pasar las plantas, ya distribuidas en réplicas, a invernadero, en una zona cubierta con una polisombra del 60 % de oscuridad, la cual se retiró paulatinamente en los días posteriores (figura 2.26) (Castillo, 2004).



Figura 2.26 Plantas de caña de azúcar distribuidas en réplicas en invernadero, a los 9 días del inicio de la etapa de aclimatación.

A los 12 días de iniciada la fase de aclimatación, se retiró la cobertura de las plantas de caña de azúcar, ya que estas al alcanzar una mayor altura y poner en contacto su parte apical con la superficie plástica de la cubierta podrían entrar en proceso de amarillamiento. En esta ocasión se observó que el sustrato tenía la humedad necesaria por lo que no se realizó riego (figura 2.27) (Castillo, 2004).



Figura 2.27 Plantas de caña de azúcar descubiertas a los 12 días del inicio de la fase de aclimatación.

En los días 15 y 17 de la fase de aclimatación, se mantuvo el volumen de riego de las plantas en 10 mL, sin embargo se elevó la concentración del medio MS modificado al 50 % con $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa; para así mejorar la nutrición de las plantas (figura 2.28).



Figura 2.28 Riego de planta de caña de azúcar con 10 mL de medio MS modificado al 50 % con $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa, a los 15 días de iniciada la fase de aclimatación.

En el día 19 se detuvo la fase de aclimatación porque al continuar hasta el día 30, como estaba planificado, existió la posibilidad de no tener parámetros de comparación para las plantas inoculadas con la bacteria *G. diazotrophicus*, ya que la mayoría de plantas testigo se estaban debilitando y muriendo.

2.5.2.7 Evaluación de plantas de caña de azúcar inoculadas con *G. diazotrophicus*

Concluido el período de aclimatación se tomaron las plantas de su sustrato para la medición final de altura, biomasa y longitud de raíz (figura 2.29), y así evaluar el efecto de la bacteria *G. diazotrophicus* en plantas de caña de azúcar

desde su inoculación hasta el final de la aclimatación. Se consideraron dos etapas por separado, la fase *in vitro* y la fase en invernadero.

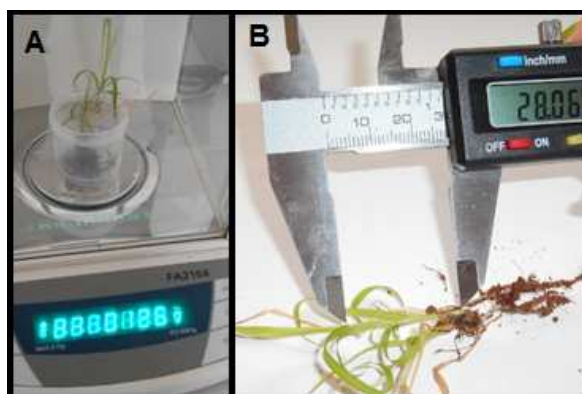


Figura 2.29 Determinación de la altura y biomasa de planta de caña de azúcar luego de la fase de aclimatación. **A:** Medición de biomasa en una balanza analítica. **B:** Medición de altura con un calibrador Vernier.

Las plantas se lavaron con agua corriente y detergente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril; en la mitad de las plantas se aplicó la metodología ya descrita para confirmar la presencia de la bacteria *G. diazotrophicus*, en cada una de sus partes: raíz, tallo y hoja (figura 2.30) (Dibut *et al.*, 2005; Fuentes *et al.*, 2001).



Figura 2.30 Plantas de caña de azúcar, en recipientes plásticos, listas para ser licuadas.

En las plantas restantes, se determinó el contenido total de nitrógeno mediante el método colorimétrico de Nessler desarrollado en 1930; para esto, se realizó una digestión que transformó todas sus formas en sulfato amonio. Se colocó la planta completa en un tubo de ensayo, se agregó H_2SO_4 concentrado, CuSO_4 y K_2SO_4 , se sometió a ebullición en digestor de bloque hasta que se observó que la digestión de la muestra se detuvo (figura 2.31).

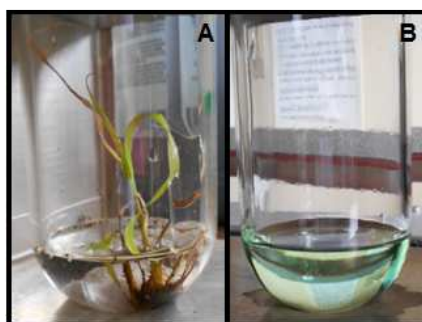


Figura 2.31 A: Planta de caña de azúcar con H_2SO_4 , CuSO_4 y K_2SO_4 . **B:** Solución obtenida luego de su ebullición en digestor de bloque.

A las soluciones obtenidas se las dejó enfriar y se les añadió el reactivo de Nessler, que por desarrollo de coloración amarilla y su lectura en espectrofotómetro a 425 nm, permitió determinar el contenido de nitrógeno (figura 2.32) (INCA, 2010).



Figura 2.32 A: Muestras, en análisis, con el reactivo de Nessler, se observa su coloración amarilla. **B:** Colocación de muestra en el espectrofotómetro.

2.5 Análisis de datos

En la fase de aislamiento y caracterización bacteriana no se realizaron pruebas estadísticas, ya que al no comparar métodos sino únicamente buscar obtener, purificar y caracterizar la bacteria; se observó y consideró crecimiento bacteriano o ausencia de él en los diferentes medios de cultivo utilizados.

En la fase de inoculación bacteriana en plantas *in vitro*, se transformó las características de las plantas y de los crecimientos bacterianos, de cualitativas a cuantitativas mediante la aplicación de escalas de valor; con esta información se aplicó un ANOVA por modelos mixtos y la prueba DGC al 95 % para la determinación del mejor tratamiento de colonización bacteriana.

Finalmente, en las etapas de inoculación bacteriana, con el mejor tratamiento seleccionado, y aclimatación; para los parámetros cualitativos se aplicaron escalas de valor al igual que en la fase anterior, en tanto que para la determinación del efecto de la bacteria en altura, biomasa, desarrollo de sistema radicular y contenido de nitrógeno se trabajó con las medias de los valores obtenidos en aquellos casos que ameritaban la simplificación de datos sin la alteración de los mismos. Se aplicó también ANOVA por modelos mixtos y la prueba DGC al 95 % de confianza.

Los análisis estadísticos se desarrollaron mediante el lenguaje de programación R y paquete informático Infostat versión 2014.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Muestreo de plantas de caña de azúcar

En la parroquia Mindo se seleccionaron 5 plantas, de las cuales se obtuvieron diferentes muestras, como se indica en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Muestras obtenidas de las plantas de caña de azúcar seleccionadas en la parroquia Mindo.

Planta	Muestras Obtenidas
1	Raíz, tallo, hojas.
2	Tallo, hojas.
3	Raíz, tallo, hojas.
4	Tallo.
5	Raíz, tallo, hojas.

De la planta 2, se obtuvieron solo muestras de tallo y hojas ya que no fue posible extraer su raíz del suelo, al igual que para la planta 4, en la que además no se observó presencia de hojas.

3.2 Aislamiento de la bacteria *G. diazotrophicus*

Cada una de las muestras obtenidas se sembró de acuerdo a la metodología propuesta, en medio LGI-P líquido, realizando un número de réplicas que dependió de la disponibilidad de material vegetal, teniendo un total de 32 tubos inoculados; luego del período de incubación se observaron los resultados mostrados en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Resultados de crecimientos bacterianos en medio LGI-P líquido a partir de muestras silvestres de caña de azúcar obtenidas en la parroquia Mindo.

Muestra	Medio de cultivo incoloro	Película superior amarilla	Observaciones
M1R1	++	+	Grumos en la superficie.
M1R2	-	-	-----
M1T1	+	+	Grumos en la superficie.
M1T2	+	-	Burbujas en la superficie.
M1H1	+	-	Burbujas en la superficie.
M1H2	++	+	Grumos en la superficie.
M2T1	++	+	-----
M2T2	++	-	Burbujas en la superficie.
M2T3	++	+	-----
M2H1	++	-	Contaminación fúngica.
M2H2	++	+	-----
M2H3	++	-	Contaminación fúngica.

Medio de cultivo: incoloro (++) , parcialmente incoloro (+) , turbio (-) . Presencia de película amarilla: positiva (+) , negativa (-) .

Tabla 3.2 Continuación.

Muestra	Medio de cultivo incoloro	Película superior amarilla	Observaciones
M3R1	++	-	Contaminación fúngica.
M3R2	++	+	-----
M3T1	++	+	-----
M3T2	+	+	Burbujas en la superficie.
M3H1	++	+	-----
M3H2	+	+	-----
M3H3	+	-	Contaminación fúngica.
M4T1	++	+	-----
M4T2	++	+	-----
M4T3	+	+	Burbujas en la superficie.
M4T4	++	+	-----
M4T5	-	-	Burbujas en la superficie.
M5R1	+	+	-----
M5R2	++	+	-----
M5R3	+	-	Contaminación fúngica.
M5T1	+	-	-----
M5T2	-	+	Contaminación fúngica.
M5H1	+	+	-----
M5H2	-	-	Contaminación fúngica.
M5H3	++	+	-----

Evaluados los crecimientos bacterianos se identificaron 19 tubos como positivos para *G. diazotrophicus*; en 15 de ellos no hubo observaciones, dos presentaron burbujas en la superficie y los tres restantes grumos en la misma zona (figura 3.1).

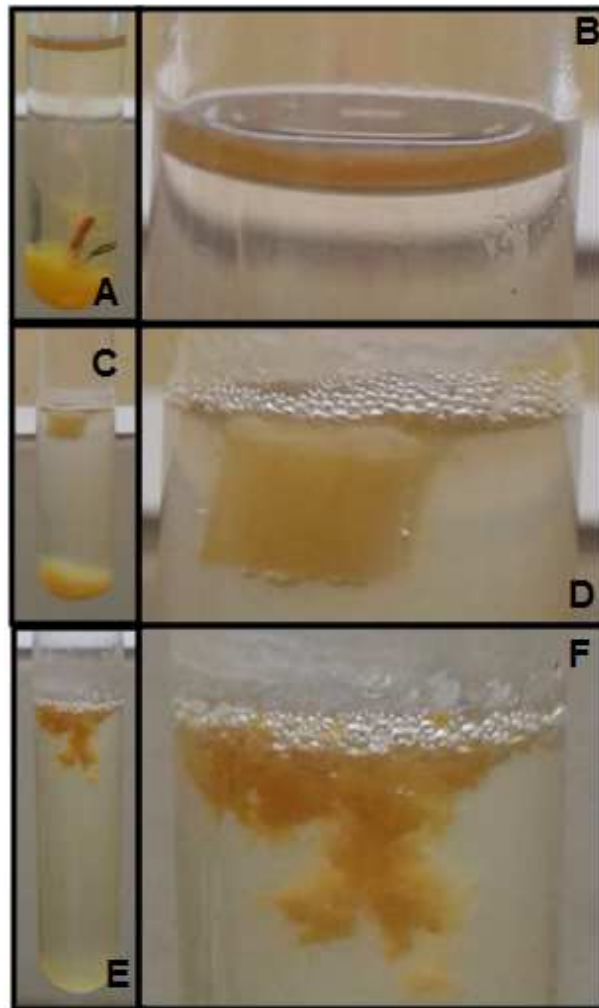


Figura 3.1 Crecimientos positivos para *G. diazotrophicus* a partir de muestras de plantas de caña de azúcar en medio LGI-P líquido luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Muestra M3R2, medio totalmente incoloro. **B:** Muestra M3R2, película superior amarilla. **C:** Muestra M3T2, medio parcialmente incoloro. **D:** Muestra M3T2, burbujas en la parte superior del medio. **E:** Muestra M1T1, medio parcialmente incoloro. **F:** Muestra M1T1, grumos en la parte superior del medio.

En esta fase se descartaron 13 tubos al ser negativos para *G. diazotrophicus*, de los cuales ocho presentaron contaminación fúngica (figura 3.2).

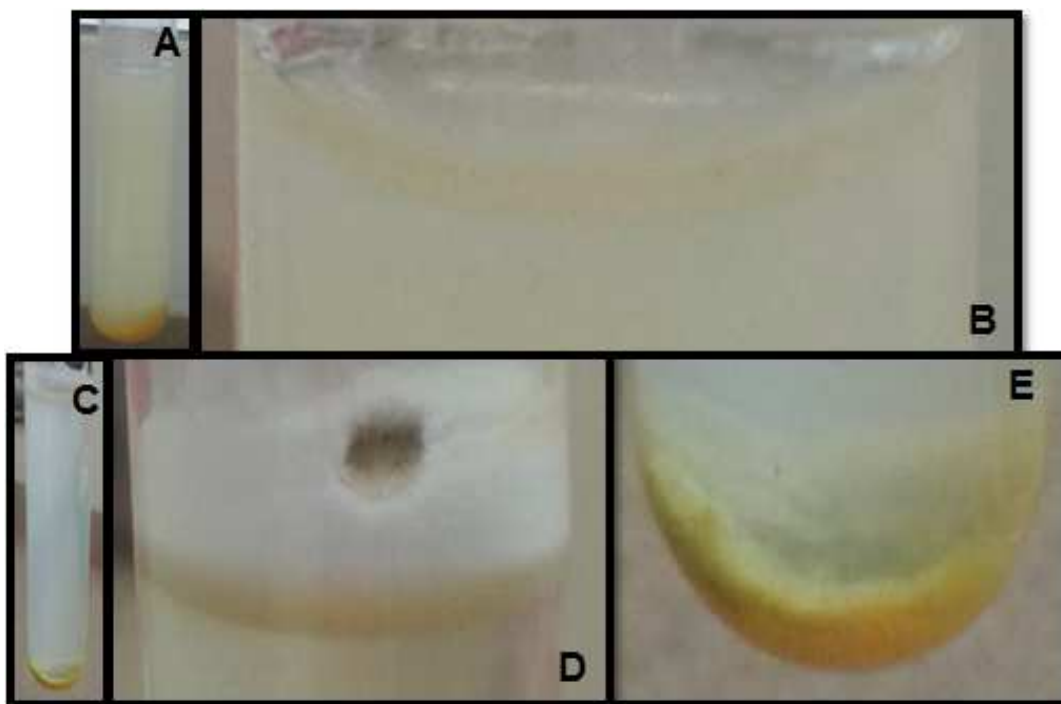


Figura 3.2 Crecimientos negativos para *G. diazotrophicus* a partir de muestras de plantas de caña de azúcar en medio LGI-P líquido luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Muestra M1R2, medio turbio. **B:** Muestra M1R2, película superior blanca. **C:** Muestra M5H2, medio turbio. **D:** Muestra M5H2, contaminación fúngica en la parte superior del medio. **E:** Muestra M5H2, contaminación fúngica en el fondo del medio.

3.3 Purificación y caracterización de la bacteria *G. diazotrophicus*

Los 19 crecimientos bacterianos que resultaron ser positivos para *G. diazotrophicus* se sembraron en medio LGI-P sólido mediante la técnica de agotamiento, con la finalidad de obtener colonias aisladas, en las que se podía reconocer su forma, los resultados del crecimiento bacteriano luego del período de incubación se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 Resultados de crecimientos bacterianos en medio LGI-P sólido, a partir de aislados de plantas de caña de azúcar en medio LGI-P líquido.

Muestra	Medio de cultivo incoloro	Colonias amarillas	Colonias planas irregulares	Observaciones
M1R1	-	-	+	-----
M1T1	-	-	+	-----
M1H2	+	+	+	Contaminación bacteriana.
M2T1	+	-	-	-----
M2T3	+	+	+	Contaminación bacteriana.
M2H2	+	+	+	Contaminación bacteriana.
M3R2	+	+	+	Descartada por contaminación fúngica.
M3T1	+	+	+	Contaminación bacteriana.
M3T2	+	+	+	Contaminación bacteriana.
M3H1	+	+	+	Contaminación bacteriana.
M3H2	-	+	+	Medio de cultivo amarillo.
M4T1	+	+	+	Contaminación bacteriana.
M4T2	+	+	+	Contaminación bacteriana.
M4T3	+	+	+	Contaminación bacteriana.
M4T4	-	+	-	-----
M5R1	+	+	+	Contaminación bacteriana.
M5R2	+	+	+	Zona del medio color azul, contaminación bacteriana.
M5H1	+	+	+	Contaminación bacteriana.
M5H3	+	+	+	Contaminación bacteriana.

Se identificaron 15 cajas Petri que presentaron las características del medio de cultivo, color y forma de las colonias correspondientes a *G. diazotrophicus*, una de ellas se descartó debido a la presencia de contaminación fúngica sin embargo, en las 14 restantes existió contaminación bacteriana (figura 3.3), por lo que fue necesario seleccionar las colonias sospechosas de cada muestra y sembrarlas mediante la técnica de estría simple en medio LGI-P sólido para la obtención de crecimientos puros.

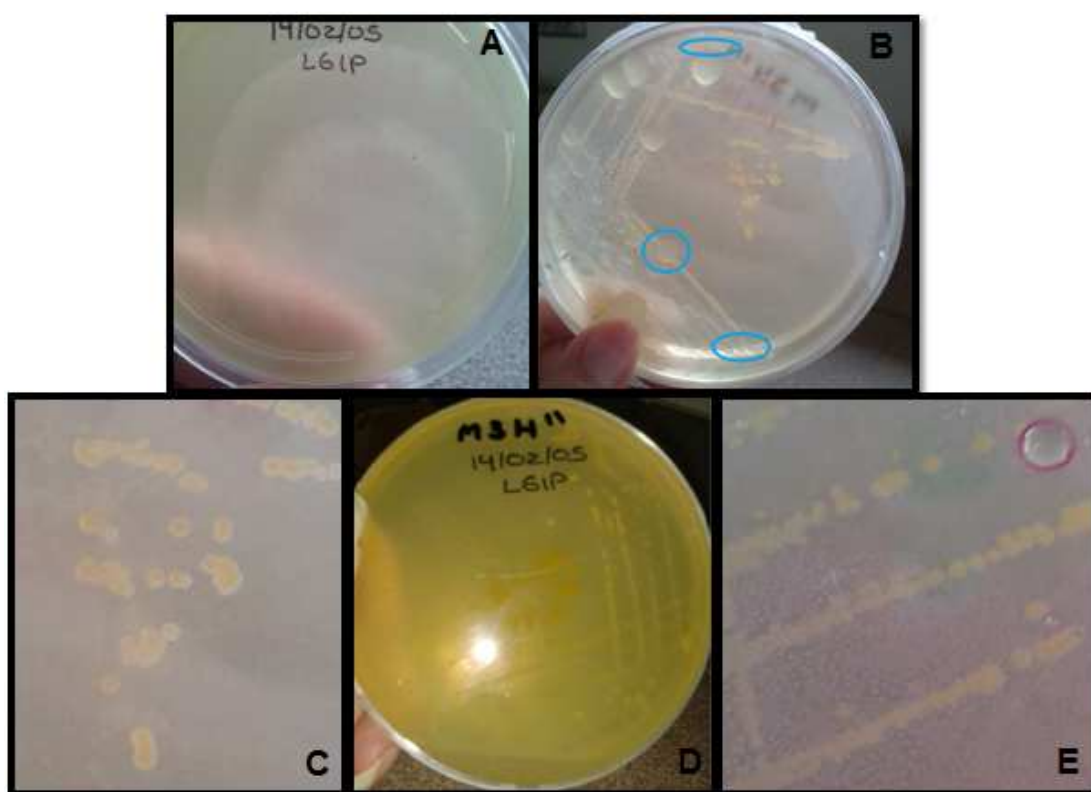


Figura 3.3 Crecimientos positivos para *G. diazotrophicus* en medio LGI-P sólido, luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Muestra M3R2, descartada por contaminación fúngica. **B:** Muestra M5H3, medio incoloro, contaminación bacteriana. **C:** Muestra M5H3, colonias amarillas, planas e irregulares. **D:** Muestra M3H2, el medio no es completamente incoloro debido a su exceso, se distingue crecimiento bacteriano esperado. **E:** Muestra M3H2, colonias amarillas, planas e irregulares.

En esta etapa también se descartaron cuatro muestras que fueron negativas para las características esperadas (figura 3.4).

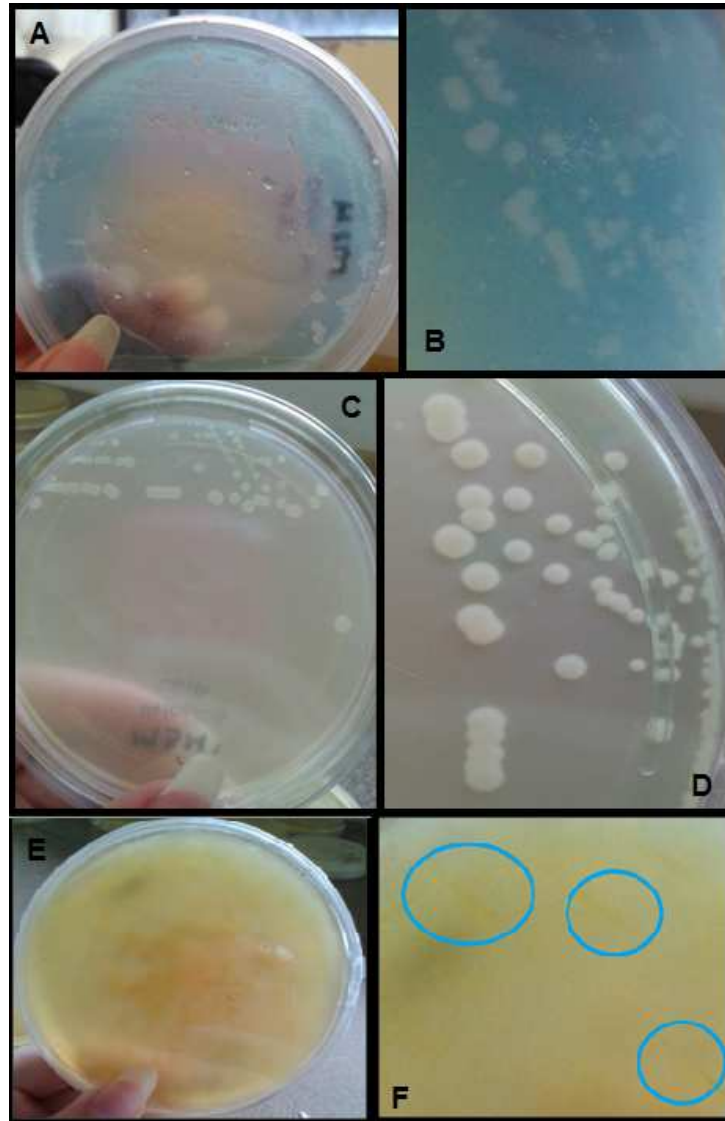


Figura 3.4 Crecimientos negativos para *G. diazotrophicus* en medio LGI-P sólido, luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Muestra M1R1, medio de cultivo color azul. **B:** Muestra M1R1, colonias rosadas, planas e irregulares. **C:** Muestra M2T1, medio de cultivo incoloro. **D:** Muestra M2T1, colonias blancas, planas y redondas. **E:** Muestra M4T4, medio de cultivo amarillo. **F:** Muestra M4T4, colonias amarillas, planas y circulares.

Los resultados obtenidos de las muestras bacterianas sospechosas para *G. diazotrophicus* sembradas por estría simple, luego del período de incubación, se muestran en la tabla 3.4.

Tabla 3.4 Resultados de crecimientos bacterianos, a partir de colonias positivas para *G. diazotrophicus*, sembradas por estría simple en medio LGI-P sólido.

Muestra	Medio de cultivo incoloro	Estría amarilla	Observaciones
M1H2	-	-	Medio de cultivo azul, bacteria roja.
M2T3	+	+	-----
M2H2	+	+	-----
M3T1	+	+	-----
M3T2	+	+	Bacteria de aspecto líquido.
M3H1	-	-	Presencia de tres colonias amarillas.
M3H2	+	+	-----
M4T1	+	+	-----
M4T2	-	+	Medio de cultivo amarillo.
M4T3	+	+	Bacteria de aspecto líquido.
M5R1	+	+	Contaminación fúngica en el estriado.
M5R2	+	+	Bacteria de aspecto líquido.
M5H1	+	+	-----
M5H3	+	+	-----

Se identificaron 11 cajas Petri que presentaron respuesta positiva para *G. diazotrophicus*, en cuanto a color del medio y crecimiento bacteriano, en tres de ellas se destacó un crecimiento de aspecto líquido y en otra caja se observó contaminación fúngica a lo largo de todo el estriado, razón por la cual se la descartó (figura 3.5).

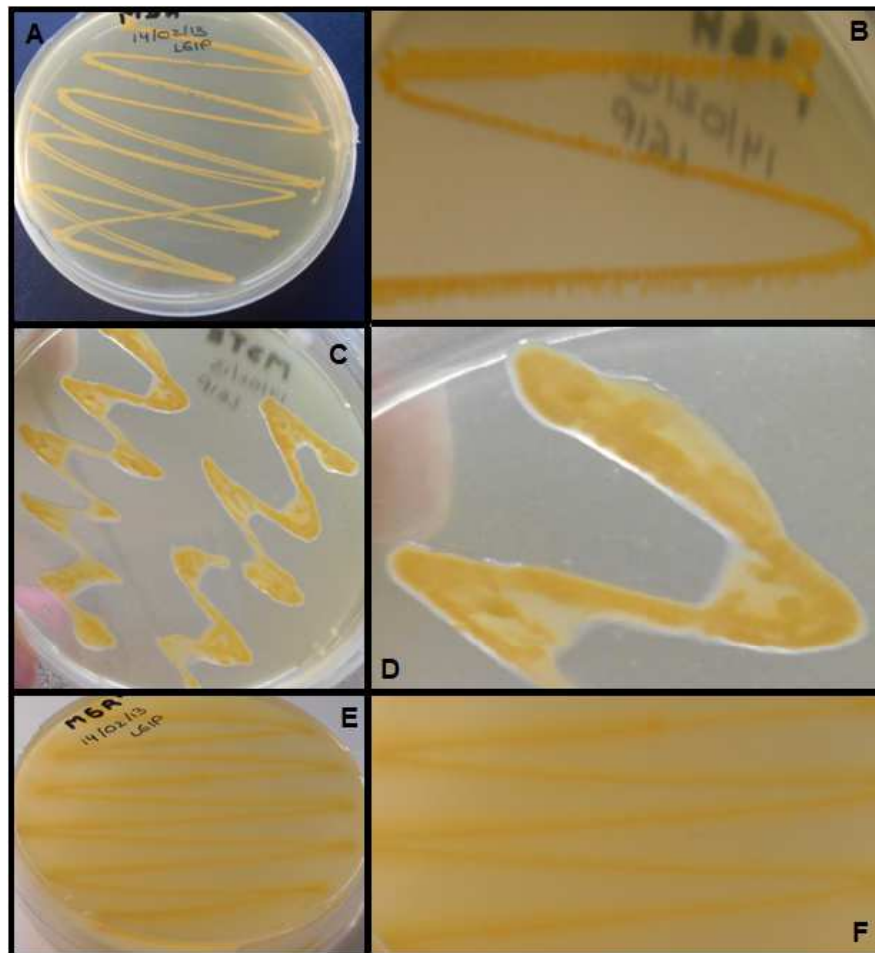


Figura 3.5 Crecimientos positivos para *G. diazotrophicus* en medio LGI-P sólido, luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Muestra M3T1, medio de cultivo incoloro. **B:** Muestra M3T1, crecimiento amarillo. **C:** Muestra M4T3, medio de cultivo incoloro. **D:** Muestra M4T3, crecimiento amarillo de aspecto líquido. **E:** Muestra M5R1, medio de cultivo incoloro. **F:** Muestra M5R1, contaminación fúngica a lo largo del estriado amarillo.

Se descartaron además tres cajas por no corresponder al crecimiento esperado para *G. diazotrophicus* (figura 3.6).

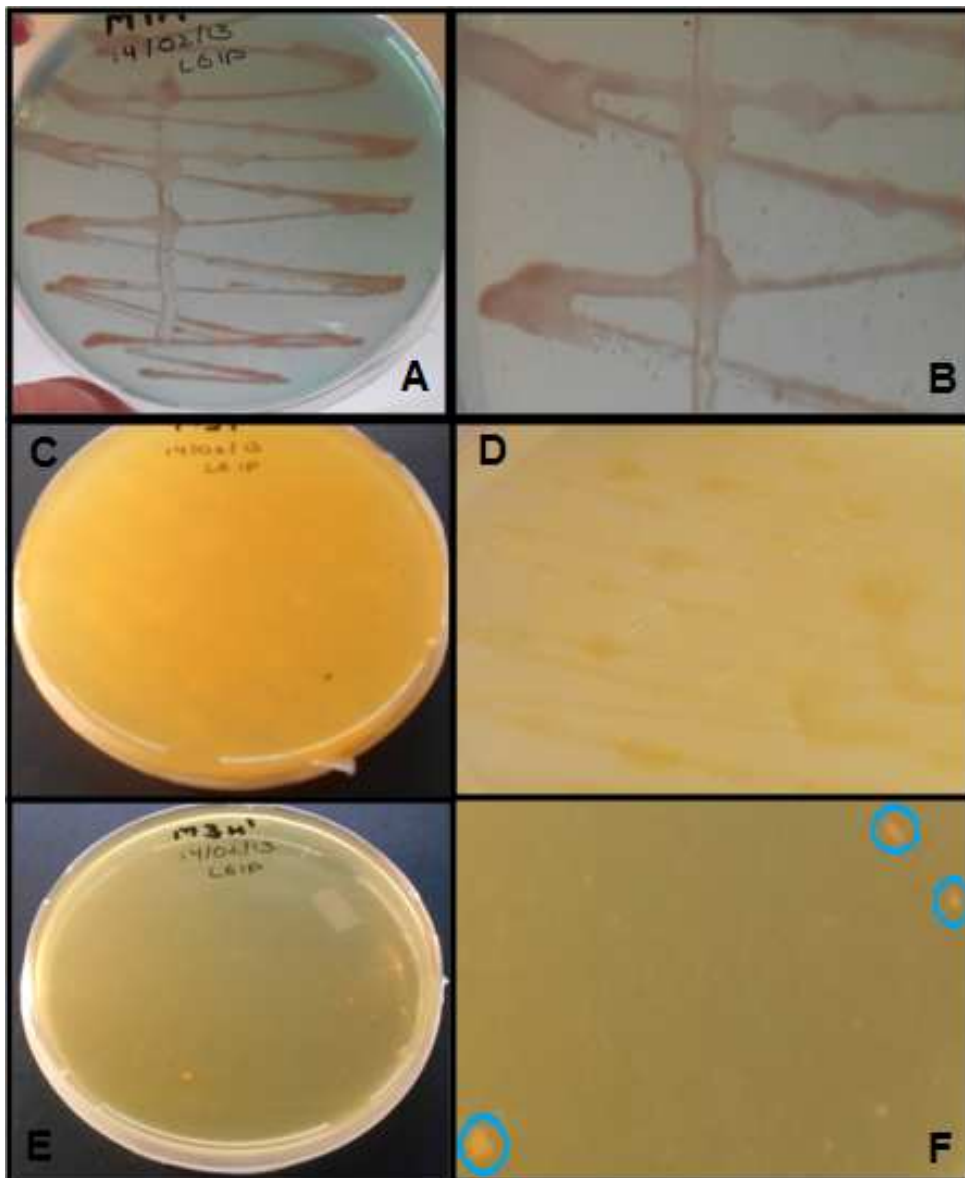


Figura 3.6 Crecimientos negativos para *G. diazotrophicus* en medio LGI-P sólido, luego de 7 días de incubación a 30 °C. **A:** Muestra M1H2, medio de cultivo azul. **B:** Muestra M1H2, crecimiento rojo. **C:** Muestra M4T2, medio de cultivo amarillo. **D:** Muestra M4T2, crecimiento amarillo. **E:** Muestra M3H1, medio de cultivo amarillo. **F:** Muestra M3H1, crecimiento de tres colonias amarillas.

Con los diez crecimientos sospechosos para *G. diazotrophicus*, se realizó la caracterización bioquímica, empezando por la prueba de crecimiento en medio PDA, que es concluyente para confirmar la presencia de esta especie de bacteria. Las restantes pruebas así como la caracterización morfológica se realizaron únicamente con las bacterias positivas en la prueba descrita.

La prueba en PDA se realizó mediante sembrado por estría simple, los resultados obtenidos luego del período de incubación se muestran en la tabla 3.5

Tabla 3.5 Resultados de crecimientos bacterianos, a partir de colonias positivas para *G. diazotrophicus*, sembrado por estría simple en medio PDA.

Muestra	Crecimiento bacteriano color marrón
M2T3	-
M2H2	-
M3T1	+
M3T2	-
M3H2	+
M4T1	-
M4T3	-
M5R2	-
M5H1	-
M5H3	-

De las diez muestras sembradas en PDA, únicamente dos presentaron resultado positivo para *G. diazotrophicus*, representado por un crecimiento color

marrón, conseguido paulatinamente luego de 15 días de incubación a 30 °C (figura 3.7).

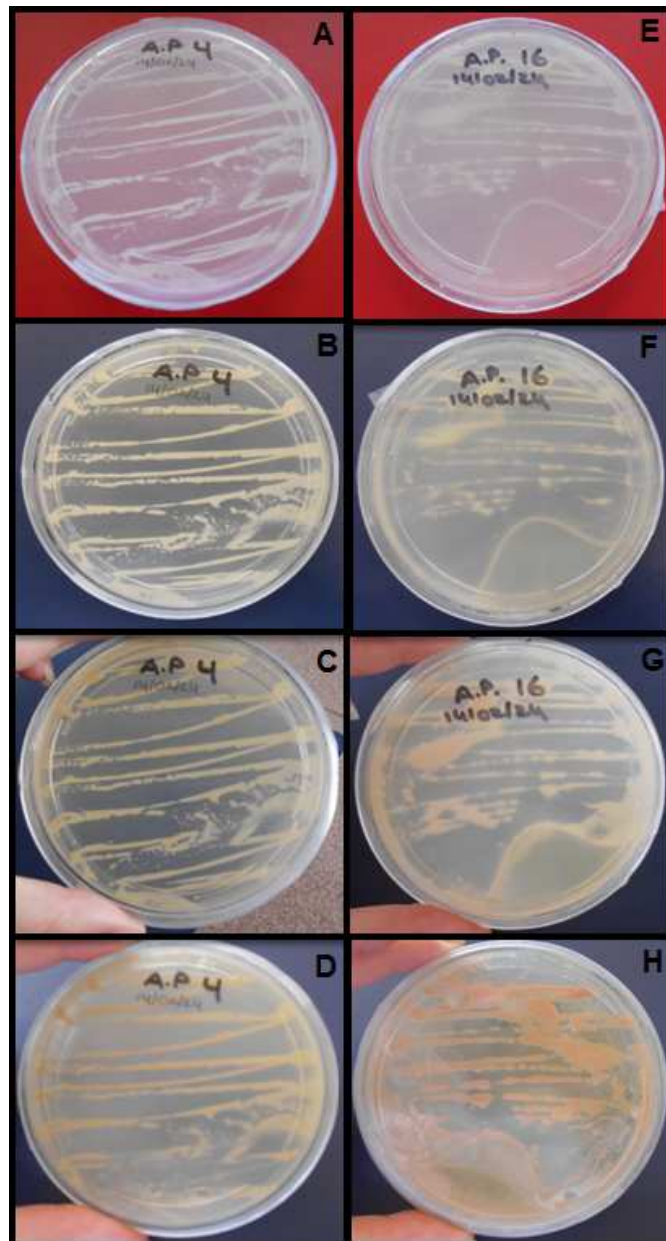


Figura 3.7 Crecimientos positivos para *G. diazotrophicus* en medio PDA a los 8, 11, 13 y 15 días de incubación a 30 °C de incubación (de arriba hacia abajo), se observa una coloración marrón paulatina. **A, B, C y D:** Muestra M3H2. **E, F, G y H:** Muestra M3T1.

Los ocho crecimientos bacterianos restantes se descartaron al haber respondido como negativos para *G. diazotrophicus*, ya que durante todo el período de incubación permanecieron de color blanco (figura 3.8).

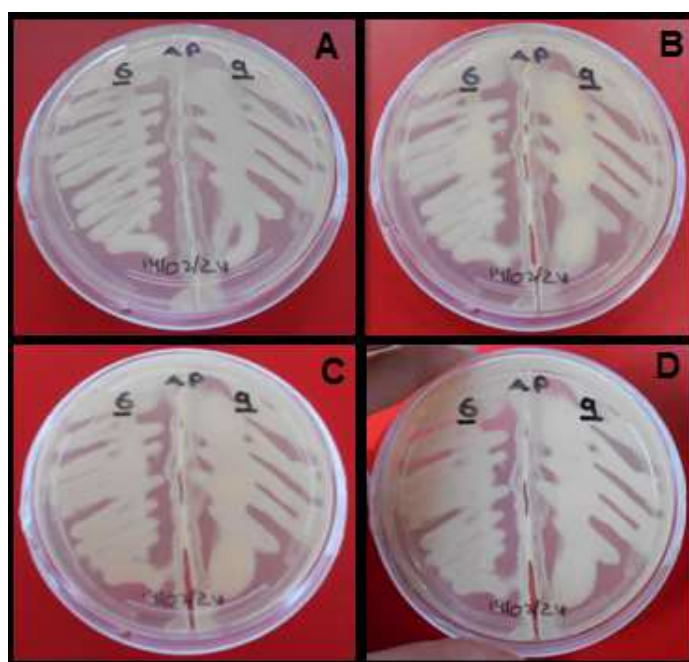


Figura 3.8 Crecimientos negativos para *G. diazotrophicus* en medio PDA a partir de las muestras M4T3 y M5R2 (izquierda y derecha de la caja respectivamente), se observa una coloración blanca durante todo el período de incubación a 30 °C. **A:** 8 días de incubación. **B:** 11 días de incubación. **C:** 13 días de incubación. **D:** 15 días de incubación.

Con los crecimientos bacterianos de las muestras M3T1 y M3H2, se realizó la caracterización morfológica y bioquímica; para esto se los sembró en medio LGI-P sólido y se utilizó el primer crecimiento observado durante la incubación, que fue a las 72 horas.

Las primeras pruebas realizadas fueron tinción Gram, catalasa y oxidasa; en las cuales se identificó que, en cuanto a morfología, las bacterias analizadas

presentaron forma de bacilos Gram negativos, al teñirse de color rosado; mientras que, bioquímicamente, reaccionaron de forma positiva para la prueba catalasa debido a la formación inmediata de burbujas, y de forma negativa para la prueba oxidasa, al no existir cambio de coloración a azul-violeta (figura 3.9).

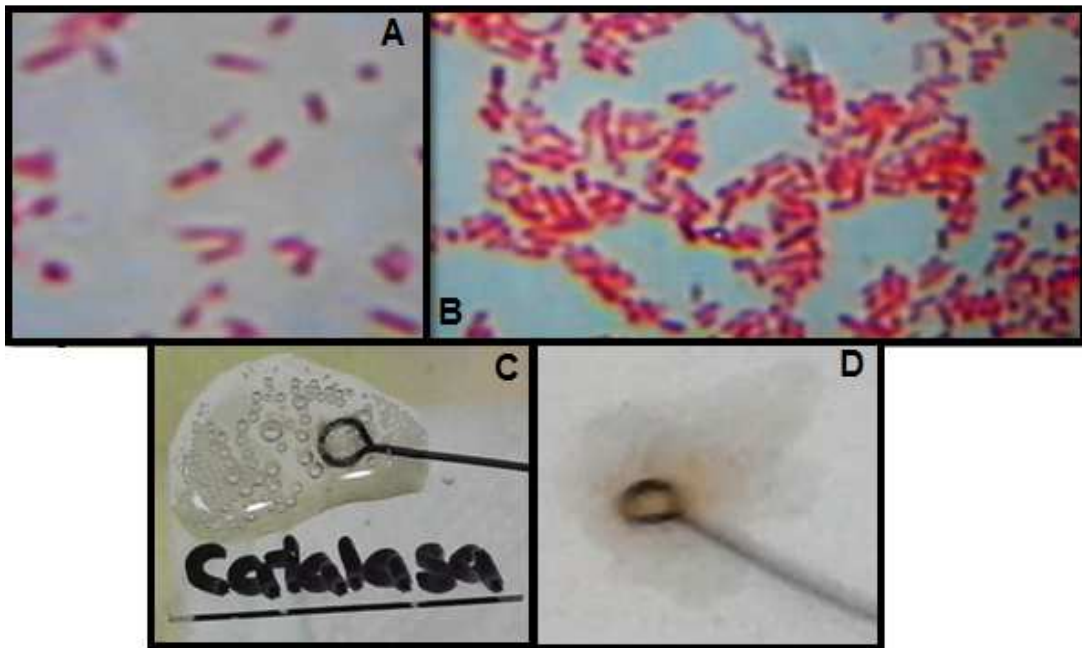


Figura 3.9 Pruebas morfológico-bioquímicas de bacterias sospechosas para *G. diazotrophicus*, a partir de un cultivo de 72 horas de incubación a 30 ° C. **A y B:** Fotografías en microscopio (objetivo de 100x), se observan bacilos Gram negativos debido a su coloración rosada. **C:** Reacción positiva para catalasa debido a la formación inmediata de burbujas. **D:** Reacción negativa para oxidasa al no existir cambio de coloración a azul-violeta.

Las siguientes pruebas morfológico-bioquímicas en las que se observaron resultados fueron las de motilidad, utilización de citrato, producción de indol a partir de triptófano, y producción de ácido sulfhídrico; las que se monitorearon diariamente debido al lento desarrollo de las bacterias a prueba, identificándose resultados, a las 96 horas de incubación a 30 °C.

Las bacterias respondieron de forma positiva para: citrato, mediante el cambio de coloración del medio citrato de Simmons de verde a azul en la zona del pico de flauta; indol, al formar una anillo de color rojo al añadir reactivo de Kovac's al crecimiento bacteriano en medio SIM; y motilidad, al presentarse turbidez o crecimiento alrededor de la línea de siembra, confirmando así la presencia de flagelos en su estructura. Por otro lado se identificó respuesta negativa para producción de ácido sulfhídrico, ya que el medio de cultivo SIM permaneció de color ámbar (figura 3.10).

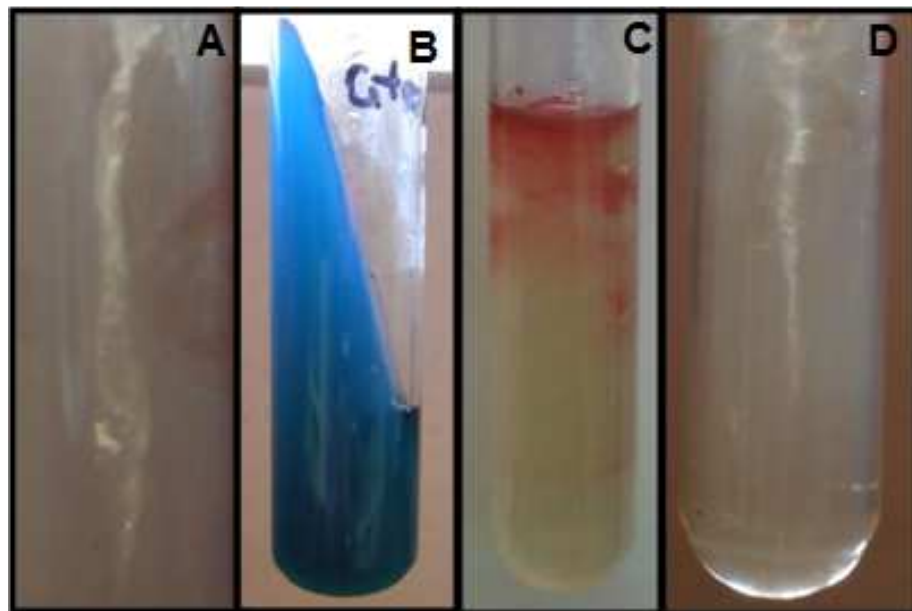


Figura 3.10 Pruebas morfológico-bioquímicas de bacterias sospechosas para *G. diazotrophicus*, luego de 96 horas de incubación a 30 ° C. **A:** Prueba de motilidad positiva en medio SIM, se observa crecimiento bacteriano alrededor de la línea de siembra. **B:** Prueba de citrato positiva, cambio de coloración del medio citrato de Simmons de verde a azul. **C:** Prueba positiva para indol en medio SIM, formación de anillo rojo al adicionar el reactivo de Kovac's. **D:** Prueba negativa para ácido sulfhídrico, permanencia del color ámbar del medio SIM.

Finalmente, para las pruebas bioquímicas de utilización de aminoácidos: L-prolina y L-cisteína; y, azúcares: D-celobiosa, D-lactosa, D-maltosa, D-manitol y D-xilosa; como única fuente de carbono, sustituidas en el medio LGI-P original (con sacarosa); los resultados se evaluaron luego de 7 días de incubación a 30 °C, tiempo en el que se observó desarrollo en este medio, considerado como control positivo.

Las bacterias sospechosas para *G. diazotrophicus* crecieron en el medio con D-manitol, presentaron crecimiento escaso con D-maltosa y D-xilosa, mientras que no crecieron en los medios con L-prolina, L-cisteína, D-celobiosa ni D-lactosa (figura 3.11).

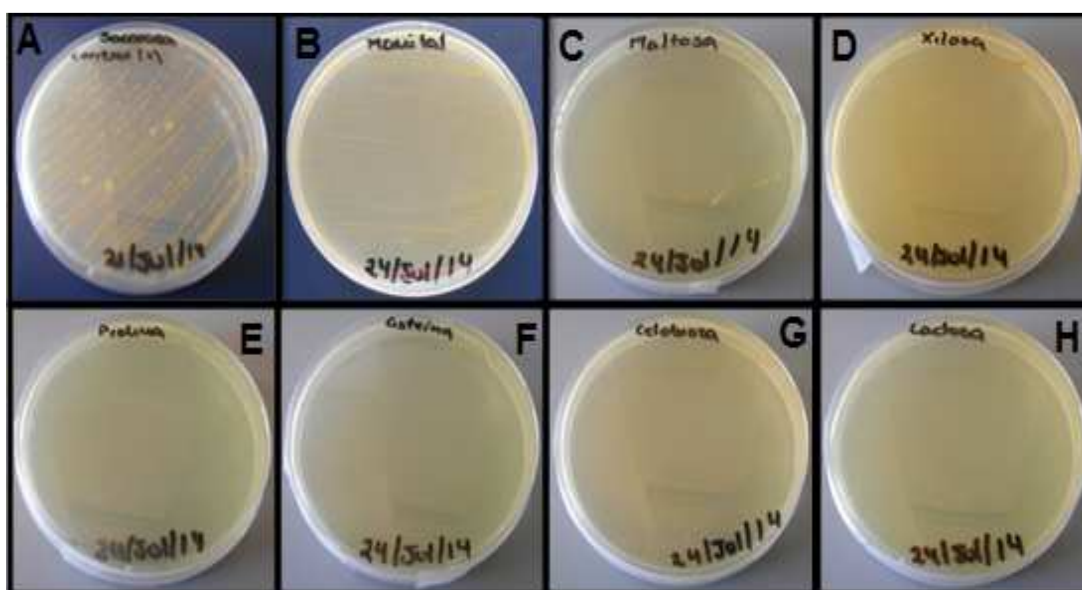


Figura 3.11 Pruebas bioquímicas sobre utilización de fuentes de carbono en medio LGI-P de bacterias sospechosas para *G. diazotrophicus*, luego de siete días de incubación a 30 °C. **A:** Control positivo, sacarosa. **B:** D-manitol, se observa crecimiento. **C:** D-maltosa, crecimiento escaso. **D:** D-xilosa, crecimiento escaso. **E:** L-prolina, sin crecimiento. **F:** L-cisteína, sin crecimiento. **G:** D-celobiosa, sin crecimiento. **H:** D-lactosa, sin crecimiento.

El resumen de los resultados obtenidos en las pruebas morfológico-bioquímicas se muestra en la tabla 3.6.

Tabla 3.6 Resultados obtenidos en las pruebas morfológico-bioquímicas realizadas a las bacterias aisladas a partir de las muestras M3T1 y M3H2.

PRUEBA	M3T1	M3H2
Tinción Gram	Gram (-)	Gram (-)
Morfología celular	Bacilo	Bacilo
Motilidad	+	+
Catalasa	+	+
Oxidasa	-	-
Utilización de citrato	+	+
Producción de indol	+	+
Producción de ácido sulfhídrico	-	-
Asimilación de aminoácidos como única fuente de carbono		
L-prolina	-	-
L-cisteína	-	-
Asimilación de azúcares como única fuente de carbono		
D-celobiosa	-	-
D-lactosa	-	-
D-maltosa	+/-	+/-
D-manitol	+	+
D-xilosa	+/-	+/-

Crecimiento: bueno (+), escaso (+/-), ausente (-).

Para todas las pruebas se obtuvo el resultado esperado, por lo que los crecimientos bacterianos aislados de las muestras M3T1 y M3H2 se caracterizaron positivamente como *G. diazotrophicus*.

3.4 Propagación de la bacteria *G. diazotrophicus*

Una vez comprobada la identidad de las bacterias aisladas de las muestras M3T1 y M3H2, y por provenir de la misma planta, se unificaron los dos crecimientos bacterianos con el objetivo de determinar el mejor medio de cultivo para la fase de propagación, los medios probados fueron: caldo v8, agar nutriente y medio LGI-P líquido.

En el caldo V8 luego de 7 días de incubación se observó una ligera turbidez, de lo que se pudo inferir un escaso crecimiento bacteriano, que al ser evaluado nuevamente al día 15 no presentó cambios (figura 3.12).



Figura 3.12 Crecimiento de *G. diazotrophicus* en caldo V8 luego de 15 días de incubación a 30 °C (derecha) junto al tubo control, sin inoculación bacteriana (izquierda).

En medio agar nutritivo luego de 7 días de incubación a 30 °C, no se observó crecimiento bacteriano, condición que se mantuvo hasta su segunda evaluación en el día 15 (figura 3.13).

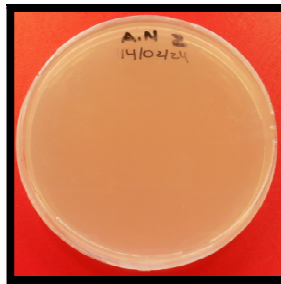


Figura 3.13 Ausencia de crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio agar nutritivo luego de 15 días de incubación a 30 °C.

En medio líquido LGI-P luego de 7 días de incubación se observó la formación característica de la película amarilla en la parte superior y cambio de coloración del medio a incoloro; en el día 15 de incubación se mantuvo la película superior amarilla y se apreció un precipitado del mismo color además de turbidez en el medio, debido a un crecimiento bacteriano abundante (figura 3.14).



Figura 3.14 Crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P líquido luego de 15 días de incubación a 30 °C (izquierda) junto el tubo control, sin inoculación bacteriana (derecha).

De acuerdo a los resultados presentados se determinó como mejor medio de cultivo para la multiplicación de *G. diazotrophicus* al LGI-P líquido, en el que se realizó la reproducción bacteriana, para la inoculación en plantas de caña de azúcar *in vitro*, hasta alcanzar una concentración celular de $1.7 \cdot 10^7$ UFC·mL⁻¹ de acuerdo a los patrones de turbidez McFarland realizados; el período de incubación fue de 15 días.

3.5 Inoculación de *G. diazotrophicus* en plantas *in vitro* de caña de azúcar

Durante la fase de inoculación se obtuvieron 40 plantas, distribuidas en ocho tratamientos según: inoculación bacteriana (con y sin bacteria), concentración de medio MS modificado (10 % y 20 %) y niveles de sacarosa (2 g·L⁻¹ y 4 g·L⁻¹); las características de los tratamientos, así como sus códigos de identificación se muestran en la tabla 3.7.

Tabla 3.7 Características de los tratamientos de inoculación de *G. diazotrophicus* a plantas *in vitro* de caña de azúcar.

Tratamiento	Concentración de MS modificado	Nivel de sacarosa	Inoculación bacteriana
T1	10 %	2 g·L ⁻¹	Sin bacteria
T1B	10 %	2 g·L ⁻¹	Con bacteria
T2	10 %	4 g·L ⁻¹	Sin bacteria
T2B	10 %	4 g·L ⁻¹	Con bacteria
T3	20 %	2 g·L ⁻¹	Sin bacteria
T3B	20 %	2 g·L ⁻¹	Con bacteria
T4	20 %	4 g·L ⁻¹	Sin bacteria
T4B	20 %	4 g·L ⁻¹	Con bacteria

Las plantas pertenecientes a los tratamientos T1, T2, T3 y T4, que no fueron inoculadas con bacteria, se denominaron plantas testigo.

3.6 Evaluación del mejor tratamiento de colonización bacteriana en plantas *in vitro* de caña de azúcar

Finalizado el período de incubación se analizaron los parámetros establecidos para determinar el mejor tratamiento de colonización bacteriana.

3.6.1 Estado de la planta

Se evaluó la salud de las plantas, mediante la escala de verdor establecida en la tabla 2.1. Una vez asignados los valores correspondientes a cada una, se obtuvieron las medias de los tratamientos que indican el estado de las plantas (tabla 3.8), siendo 4 el valor óptimo.

Tabla 3.8 Medias de los valores de verdor según tratamiento.

Tratamiento	Medias
T4B*	3.29
T2B	3.14
T4	3.14
T1B	3.14
T3B	2.86
T2	2.43
T1	2.14
T3	2.00

Una planta con estado óptimo de salud tiene un valor en la escala de verdor de 4.
*B: inoculación bacteriana.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ANOVA (anexo B1) con un valor $F_{7, 48} = 4.43$; $p = 0.0007$ menor que 0.05 (95 % de confianza), se procedió a buscar las diferencias existentes entre los tratamientos mediante la prueba DGC, con la que se identificaron dos grupos estadísticamente distintos de acuerdo a las medias y dispersiones obtenidas. Grupo A: T4B, T2B, T4, T1B y T3B; grupo B: T2, T1 y T3 (figura 3.15).

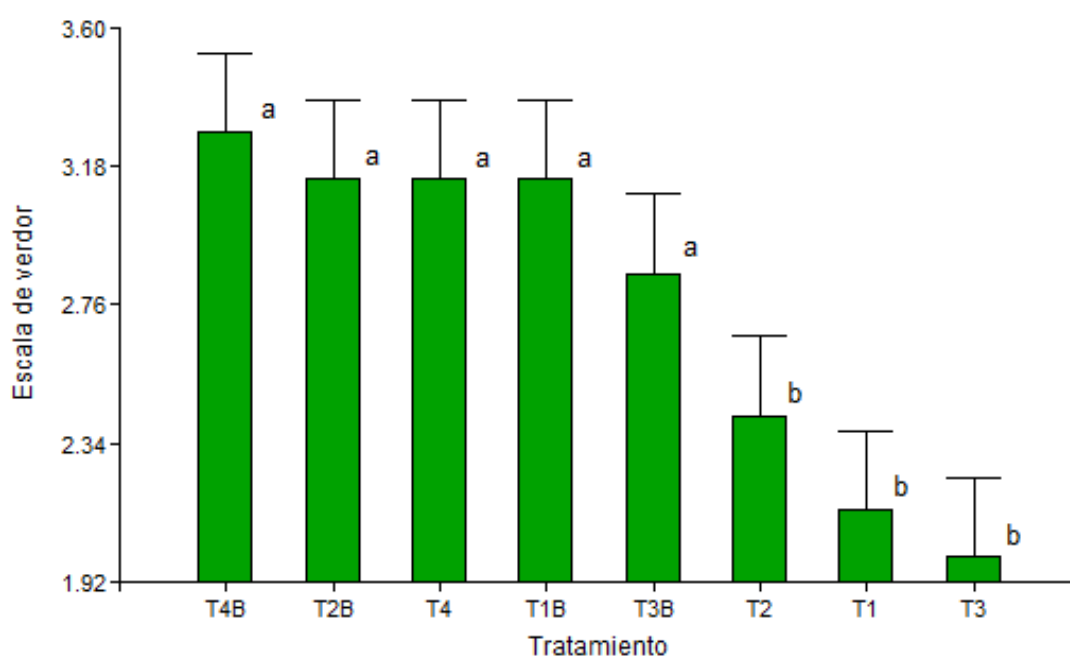


Figura 3.15 Clasificación de los tratamientos según el estado de la planta por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.

3.6.2 Contaminación

Se evaluó la presencia de contaminación, causada por hongos o bacterias, en las plantas y sus medios de cultivo mediante la escala establecida en la tabla 2.2. Una vez asignados estos valores para cada una de las plantas, se calcularon los porcentajes de contaminación para cada tratamiento; considerando como aceptables aquellos que en los que la presencia de contaminación fue

menor o igual al 30 %, que correspondieron a los tratamientos T1B, T2B y T3B (figura 3.16).

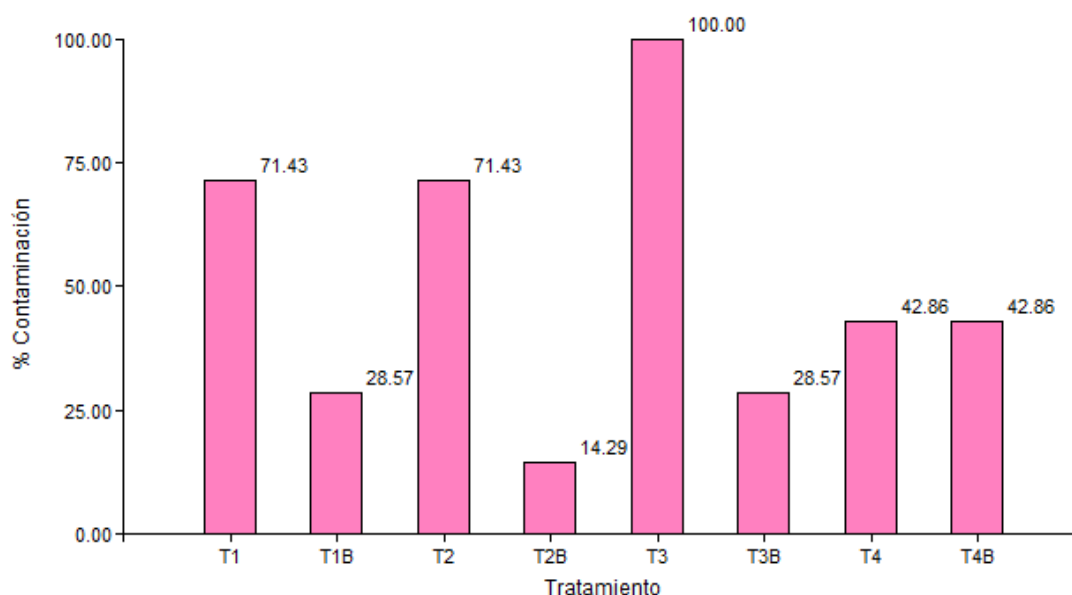


Figura 3.16 Porcentajes de contaminación según tratamiento aplicado, se puede apreciar que los tratamientos con bacteria tienen porcentajes menores de contaminación.

Los siguientes aspectos a considerar para la determinación del mejor tratamiento de colonización bacteriana correspondieron a la confirmación de la presencia de la bacteria *G. diazotrophicus* en cada una de las partes (raíz, tallo y hoja) de las plantas inoculadas, para lo cual estas se licuaron y sembraron en medio LGI-P sólido.

3.6.3 Crecimiento bacteriano y su abundancia en medio LGI-P

Los crecimientos obtenidos en medio LGI-P luego del período de incubación, se evaluaron en base a la escala de valoración de la tabla 2.3, en la que se consideró que debido a la presencia de contaminación en algunas de las

plantas y su medio de cultivo, podrían existir hongos o bacterias diferentes a *G. diazotrophicus* en los cultivos realizados. Una vez asignados estos valores, se obtuvieron las medias de los crecimientos bacterianos de cada parte de las plantas según el tratamiento aplicado (tabla 3.9), siendo 2 el valor óptimo que indica la presencia de crecimiento puro de *G. diazotrophicus*. En la tabla no se muestran los tratamientos con plantas testigo (T1, T2, T3 y T4), ya que en las siembras realizadas en medio LGI-P no se obtuvo crecimiento de *G. diazotrophicus*, por lo que todos sus valores fueron 0.

Tabla 3.9 Medias de los valores de crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P sólido según tratamiento.

Tratamiento	Parte de la planta	Media
T1B	Raíz	2.00
	Tallo	2.00
	Hoja	1.60
T2B	Raíz	2.00
	Tallo	1.80
	Hoja	1.80
T3B	Raíz	2.00
	Tallo	2.00
	Hoja	1.80
T4B	Raíz	1.00
	Tallo	1.80
	Hoja	1.20

Al haber obtenido crecimiento de *G. diazotrophicus* a partir de todas las partes de las plantas de los cuatro tratamientos aplicados, fue necesario determinar si existió diferencia estadística entre ellos, por lo que se aplicó ANOVA para cada una de las partes: raíz, tallo y hoja.

En el ANOVA para los niveles de crecimientos bacterianos a partir de raíz, tallo y hoja, de forma independiente (anexo B2), se obtuvieron los siguientes valores F; $F_{7, 32} = 3.13 \cdot 10^{32}$, $F_{7, 32} = 103.71$ y $F_{7, 32} = 34.03$; todos con $p < 0.0001$, inferior a 0.05 (95 % de confianza), al realizar la prueba DGC, se obtuvieron para los crecimientos a partir de raíz tres grupos (figura 3.17); a partir de tallo dos grupos (figura 3.18) y a partir de hoja tres grupos (figura 3.19).

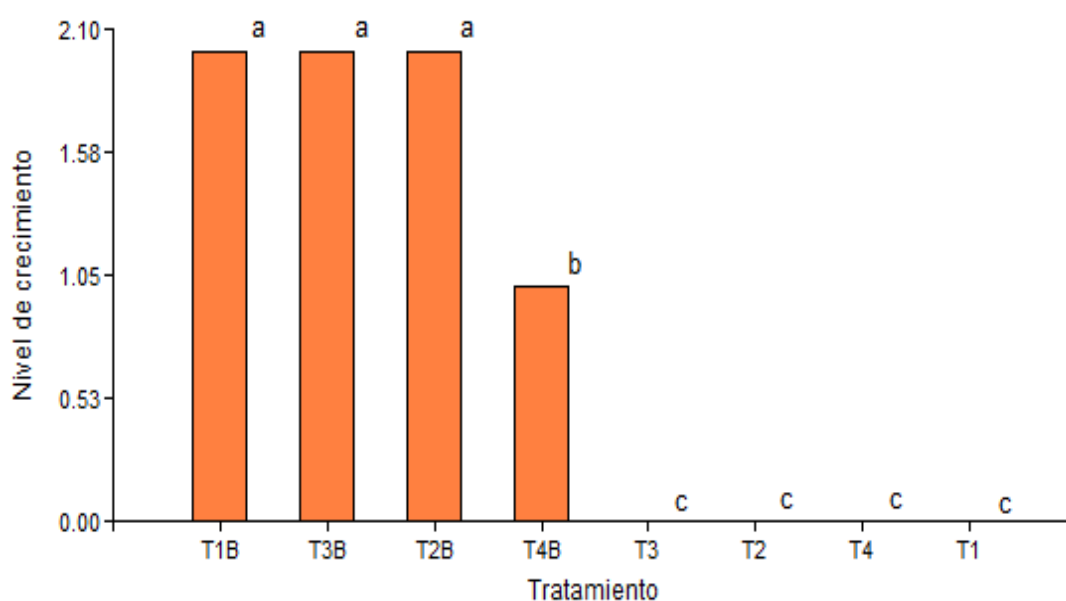


Figura 3.17 Clasificación de los tratamientos según crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P, a partir de raíz, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.

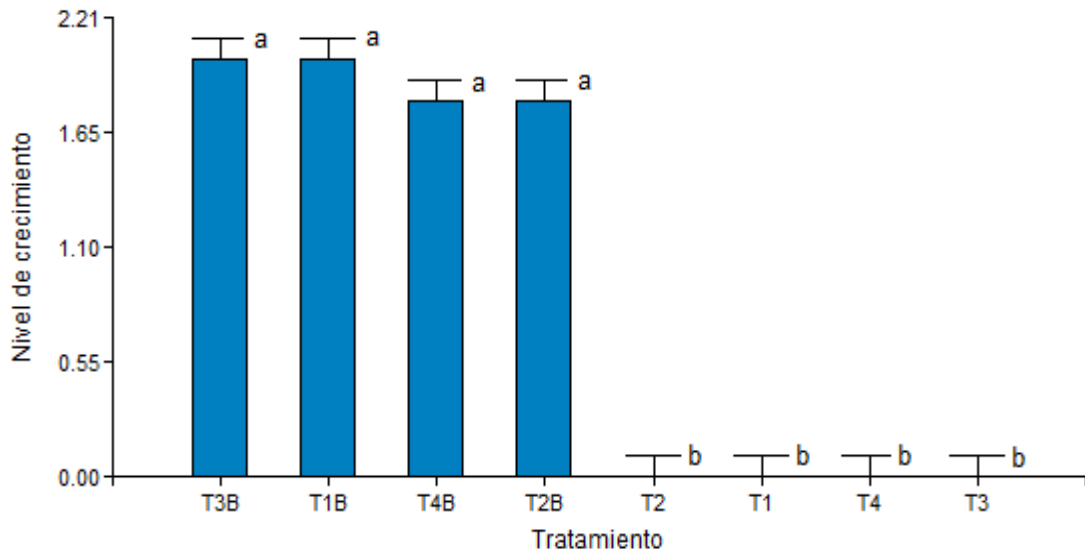


Figura 3.18 Clasificación de los tratamientos según crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P, a partir de tallo, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.

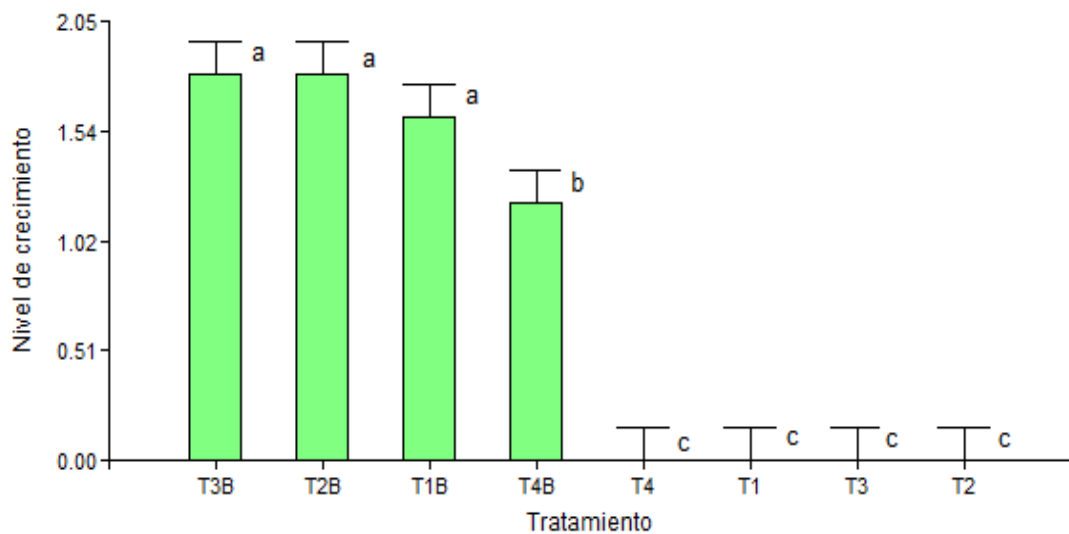


Figura 3.19 Clasificación de los tratamientos según crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P, a partir de hoja, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.

Determinado el nivel de crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P, también se evaluó la abundancia presentada en base a la escala de valoración de la tabla 2.4, una vez asignados estos valores, se obtuvieron las medias de los crecimientos bacterianos de cada parte de las plantas según el tratamiento aplicado (tabla 3.10), siendo 2 el valor óptimo que indica crecimiento bacteriano abundante. En la tabla no se muestran los tratamientos con plantas testigo (T1, T2, T3 y T4), ya que en las siembras realizadas en medio LGI-P no se obtuvo crecimiento de *G. diazotrophicus*, por lo que todos sus valores fueron 0.

Tabla 3.10 Medias de los valores de abundancia de crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P sólido según tratamiento.

Tratamiento	Parte de la planta	Media
T1B	Raíz	1.60
	Tallo	1.40
	Hoja	1.80
T2B	Raíz	2.00
	Tallo	1.00
	Hoja	1.40
T3B	Raíz	2.00
	Tallo	1.20
	Hoja	1.20
T4B	Raíz	1.60
	Tallo	1.40
	Hoja	1.00

Al igual que para el nivel de crecimiento bacteriano, la abundancia también se analizó de acuerdo a la parte de la planta según el tratamiento aplicado.

En el ANOVA para la abundancia de crecimientos bacterianos a partir de raíz, tallo y hoja, de manera independiente (anexo B3), se obtuvieron los siguientes valores F; $F_{7, 32} = 63.24$, $F_{7, 32} = 23.11$ y $F_{7, 32} = 32.61$ respectivamente; todos con $p < 0.0001$, inferior a 0.05 (95 % de confianza), al realizar la prueba DGC, se obtuvieron para los crecimientos a partir de raíz tres grupos (figura 3.20); a partir de tallo dos grupos (figura 3.21) y a partir de hoja tres grupos (figura 3.22).

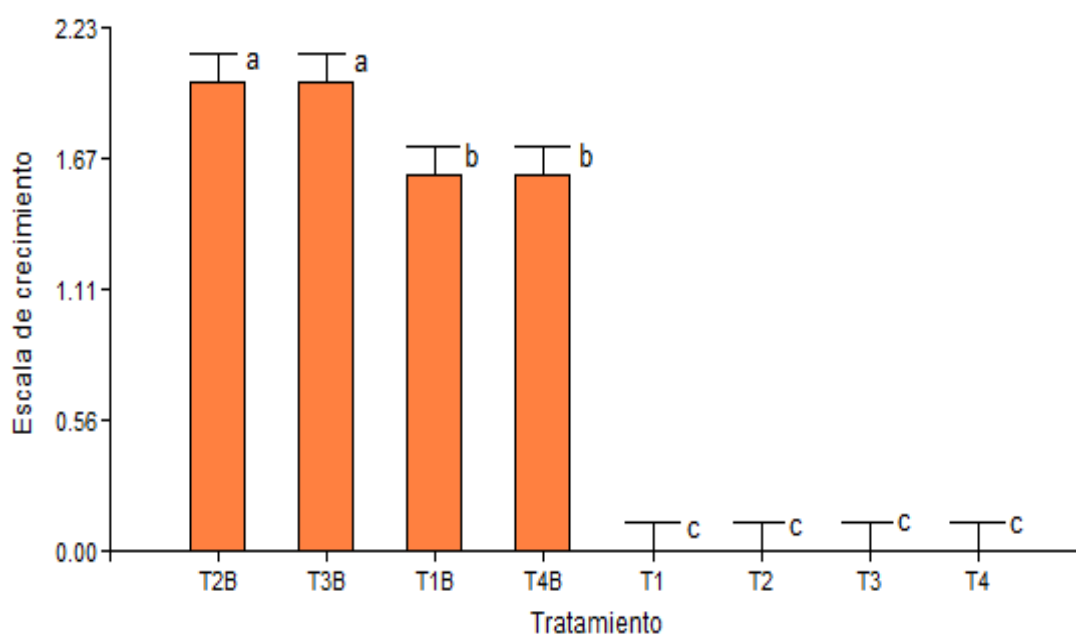


Figura 3.20 Clasificación de los tratamientos según abundancia de crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P, a partir de raíz, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.

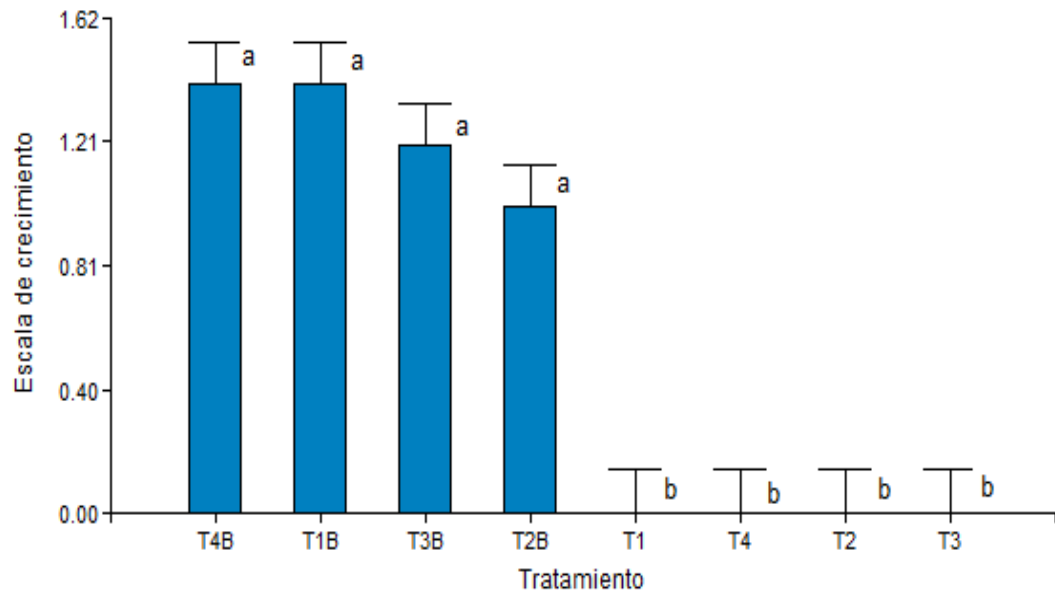


Figura 3.21 Clasificación de los tratamientos según abundancia de crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P, a partir de tallo, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.

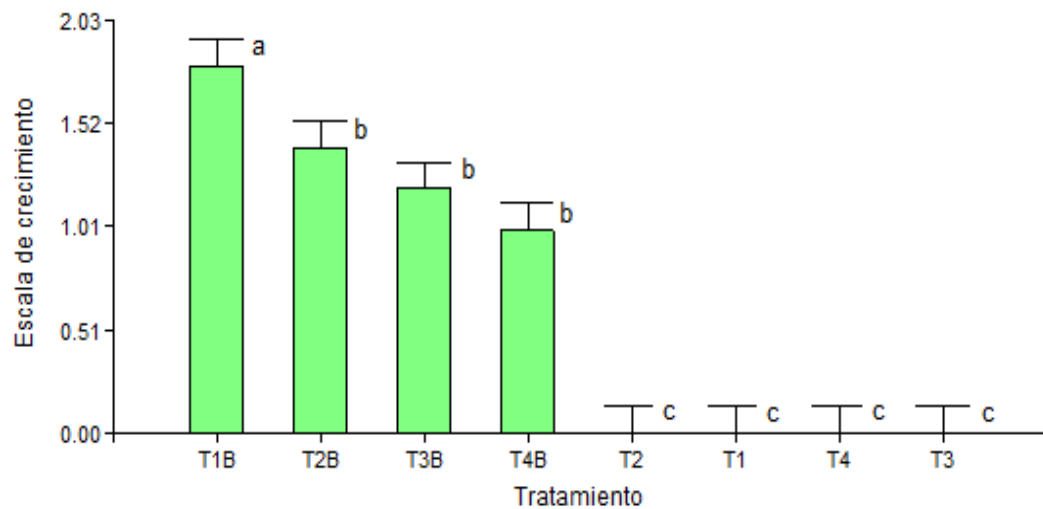


Figura 3.22 Clasificación de los tratamientos según abundancia de crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P, a partir de hoja, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.

3.6.4 Color y homogeneidad del crecimiento bacteriano en medio PDA

Al observar crecimiento distinto al de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P, para confirmar la identidad de las bacterias fue necesario sembrarlas en medio PDA. Los crecimientos luego de 15 días de incubación, se evaluaron según la escala de valoración de la tabla 2.5, la que consideró tonalidad del color marrón de *G. diazotrophicus*, como signo de la velocidad de su desarrollo. Asignados estos valores, se obtuvieron las medias de los crecimientos bacterianos de cada parte de las plantas según el tratamiento aplicado (tabla 3.11), siendo 3 el valor óptimo que indica la presencia de crecimiento color marrón oscuro.

Tabla 3.11 Medias de los valores de color del crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio PDA según tratamiento.

Tratamiento	Parte de la planta	Media
T1B	Raíz	1.60
	Tallo	1.60
	Hoja	1.60
T2B	Raíz	1.20
	Tallo	1.40
	Hoja	1.20
T3B	Raíz	1.80
	Tallo	1.60
	Hoja	1.80
T4B	Raíz	1.60
	Tallo	1.60
	Hoja	2.00

En la tabla anterior no se muestran los tratamientos con plantas testigo (T1, T2, T3 y T4), ya que en las siembras realizadas en medio PDA no se obtuvo crecimiento de *G. diazotrophicus*, por lo que todos sus valores fueron 0. Sin embargo, para los tratamientos restantes fue necesario determinar la existencia de diferencia estadística entre ellos, por lo que se aplicó ANOVA para cada una de las partes: raíz, tallo y hoja.

En el ANOVA para los niveles de color de los crecimientos bacterianos a partir de raíz, tallo y hoja, de forma independiente (anexo B4), se obtuvieron los siguientes valores F; $F_{7, 32} = 19.03$, $F_{7, 32} = 16.25$ y $F_{7, 32} = 12.26$ respectivamente; todos con $p < 0.0001$, inferior a 0.05 (95 % de confianza), al realizar la prueba DGC, se obtuvieron dos grupos para los crecimientos obtenidos tanto a partir de raíz (figura 3.23), como de tallo (figura 3.24) y hoja (figura 3.25).

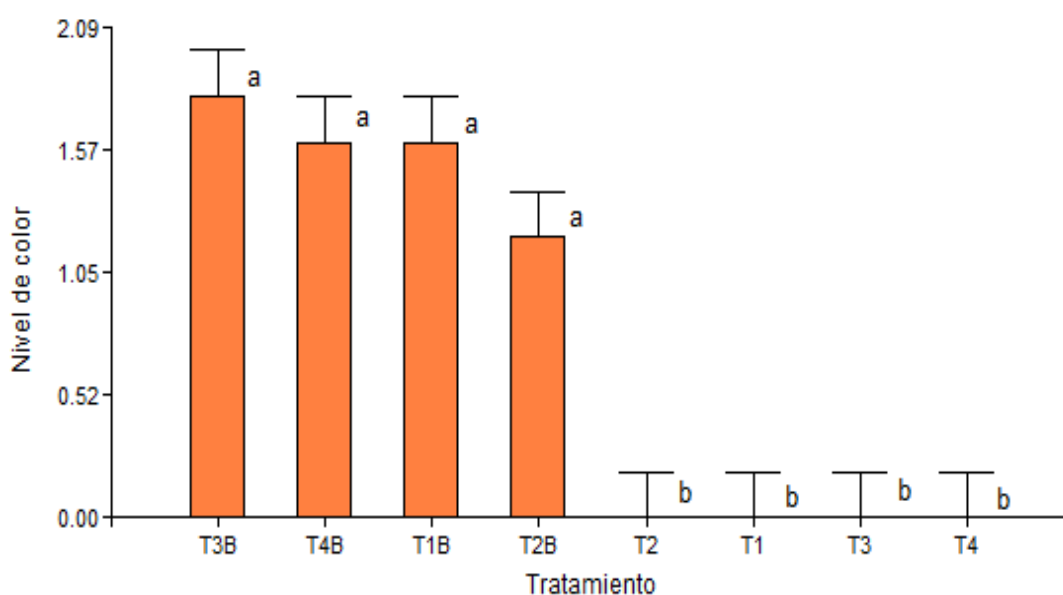


Figura 3.23 Clasificación de los tratamientos según el nivel de color del crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio PDA, a partir de raíz, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.

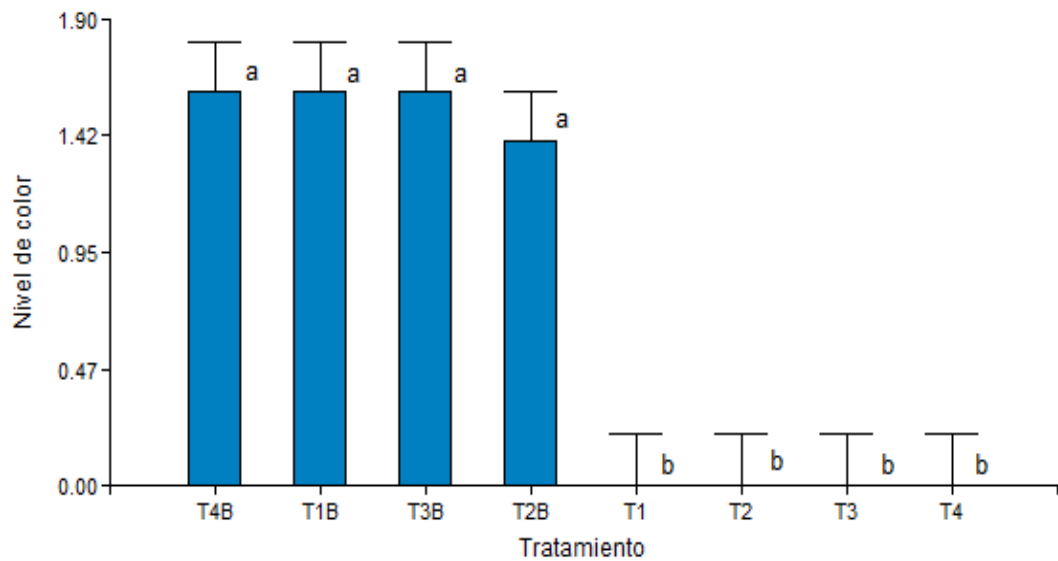


Figura 3.24 Clasificación de los tratamientos según el nivel de color del crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio PDA, a partir de tallo, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.

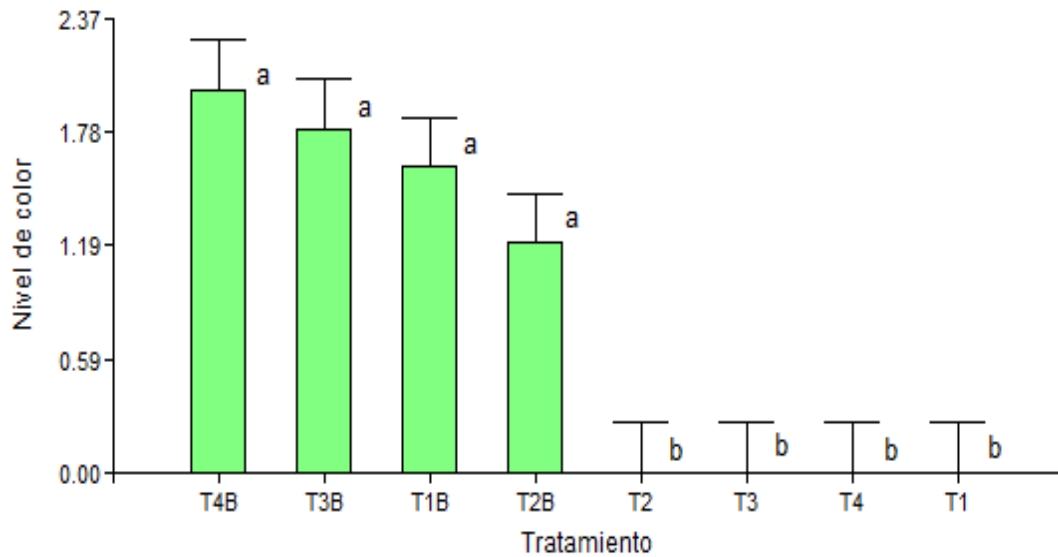


Figura 3.25 Clasificación de los tratamientos según el nivel de color del crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio PDA, a partir de hoja, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.

Determinada la velocidad de desarrollo de *G. diazotrophicus* en medio PDA, según la tonalidad del crecimiento, también se evaluó la homogeneidad de color, la que mide similitud en el crecimiento de las bacterias observadas. Los valores se asignaron de acuerdo a la tabla 2.6, a continuación se obtuvieron las medias de los crecimientos bacterianos de cada parte de las plantas según el tratamiento aplicado (tabla 3.12), siendo 2 el valor óptimo que indica crecimiento bacteriano de color homogéneo. En la tabla no se muestran los tratamientos con plantas testigo (T1, T2, T3 y T4), ya que en PDA no se obtuvo crecimiento de *G. diazotrophicus*, por lo que todos sus valores fueron 0.

Tabla 3.12 Medias de los valores de homogeneidad de color del crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio PDA según tratamiento.

Tratamiento	Parte de la planta	Media
T1B	Raíz	1.80
	Tallo	1.80
	Hoja	2.00
T2B	Raíz	1.60
	Tallo	1.60
	Hoja	1.80
T3B	Raíz	1.80
	Tallo	1.80
	Hoja	1.60
T4B	Raíz	1.40
	Tallo	1.40
	Hoja	1.60

Al igual que para la tonalidad de color del crecimiento bacteriano, la homogeneidad se analizó de acuerdo a la parte de la planta según el tratamiento aplicado.

En el ANOVA para la homogeneidad de color de los crecimientos bacterianos a partir de raíz, tallo y hoja, de manera independiente (anexo B5), se obtuvieron los siguientes valores F; $F_{7, 32} = 31.74$, $F_{7, 32} = 31.74$ y $F_{7, 32} = 44.54$ respectivamente; todos con $p < 0.0001$, inferior a 0.05 (95 % de confianza), al realizar la prueba DGC, se obtuvieron dos grupos para los crecimientos tanto a partir de raíz (figura 3.26), como de tallo (figura 3.27) y hoja (figura 3.28).

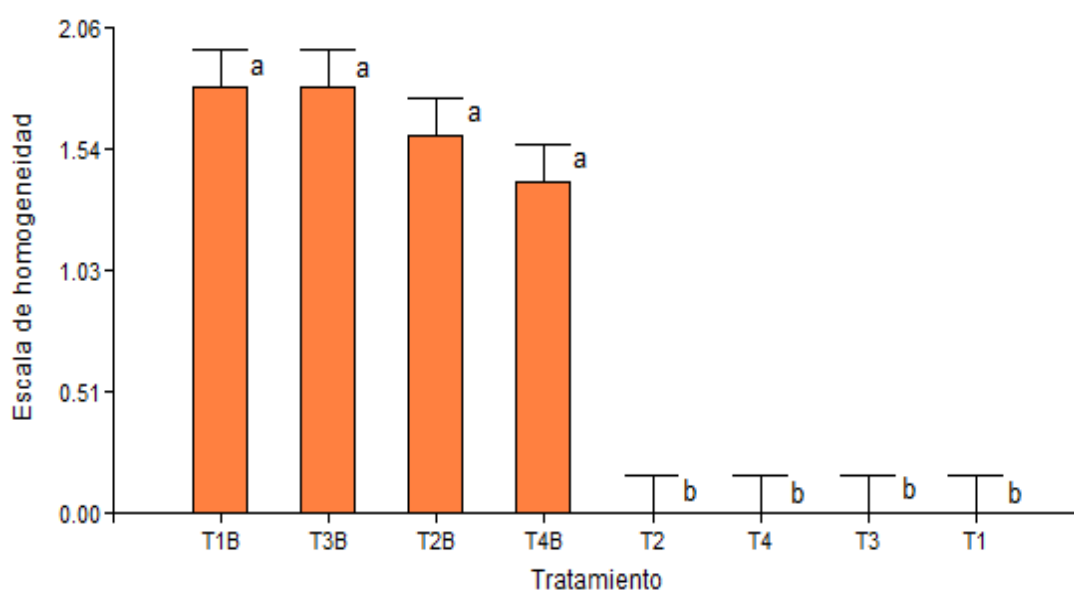


Figura 3.26 Clasificación de los tratamientos según homogeneidad de color del crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio PDA, a partir de raíz, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.

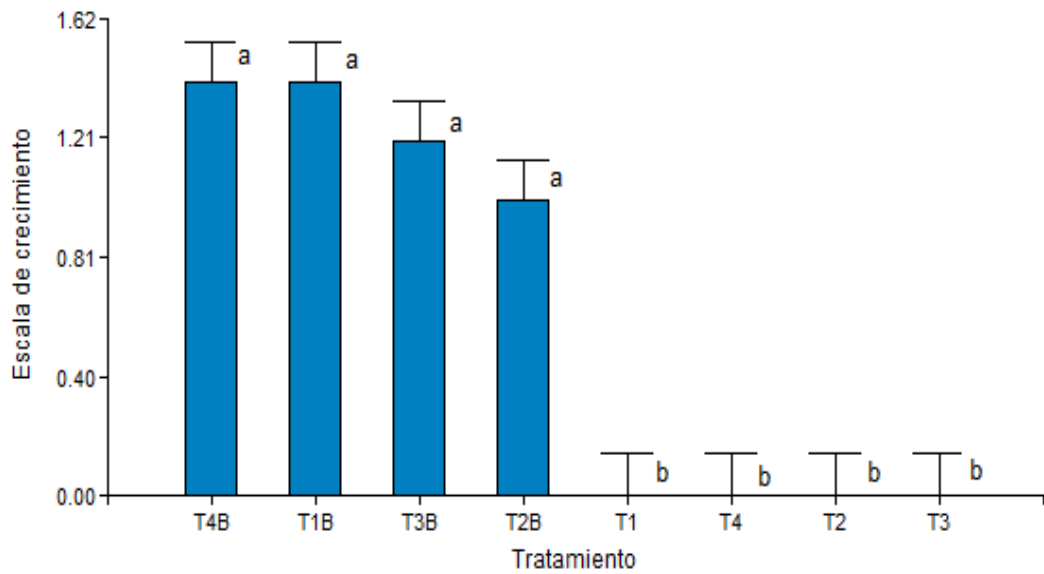


Figura 3.27 Clasificación de los tratamientos según homogeneidad de color del crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio PDA, a partir de tallo, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.

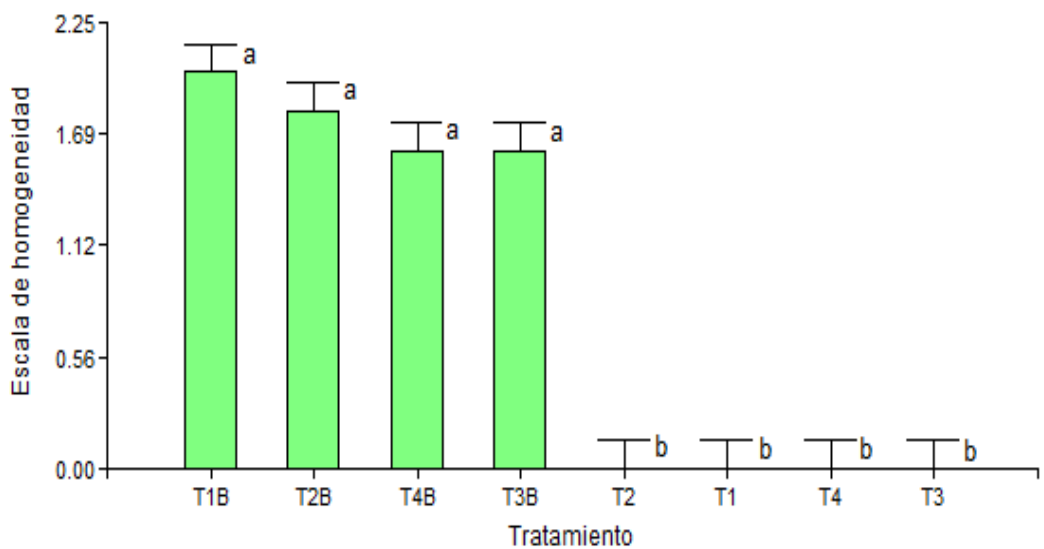


Figura 3.28 Clasificación de los tratamientos según homogeneidad de color del crecimiento de *G. diazotrophicus* en medio PDA, a partir de hoja, por ANOVA y prueba DGC, tratamientos con la misma letra no presentan diferencia estadística.

Finalizada la evaluación de los tratamientos, en base a los resultados de las pruebas estadísticas se estableció como el mejor al T1B, pues de manera global tuvo un comportamiento superior frente a los otros.

Con el tratamiento T1B se realizó la inoculación bacteriana en 18 plantas distribuidas en tres réplicas de seis repeticiones cada una. Previa a la inoculación se midieron altura y biomasa de cada planta, para establecer sus condiciones iniciales en el ensayo. Una cantidad igual de plantas sin inocular se utilizó como grupo testigo.

3.7 Aclimatación de plantas de caña de azúcar inoculadas con *G. diazotrophicus*

Finalizado el período de incubación de las plantas inoculadas (TB) y su grupo testigo (T), se procedió a medir su altura y biomasa como datos finales del período *in vitro*, e iniciales de la fase de aclimatación.

Durante el período de aclimatación, se monitoreó el estado de las plantas detectando su posible contaminación o muerte, para la evaluación de supervivencia de las plantas en las tres réplicas establecidas (tabla 3.13).

Tabla 3.13 Porcentajes de contaminación y supervivencia de plantas de caña de azúcar luego del período de aclimatación.

Tratamiento	Contaminación	Supervivencia
T	16.67 %	22.22 %
TB	0.00 %	94.44 %

Las diferencias en el estado de las plantas se pueden apreciar en la figura 3.29 y de forma más detallada en el anexo C.

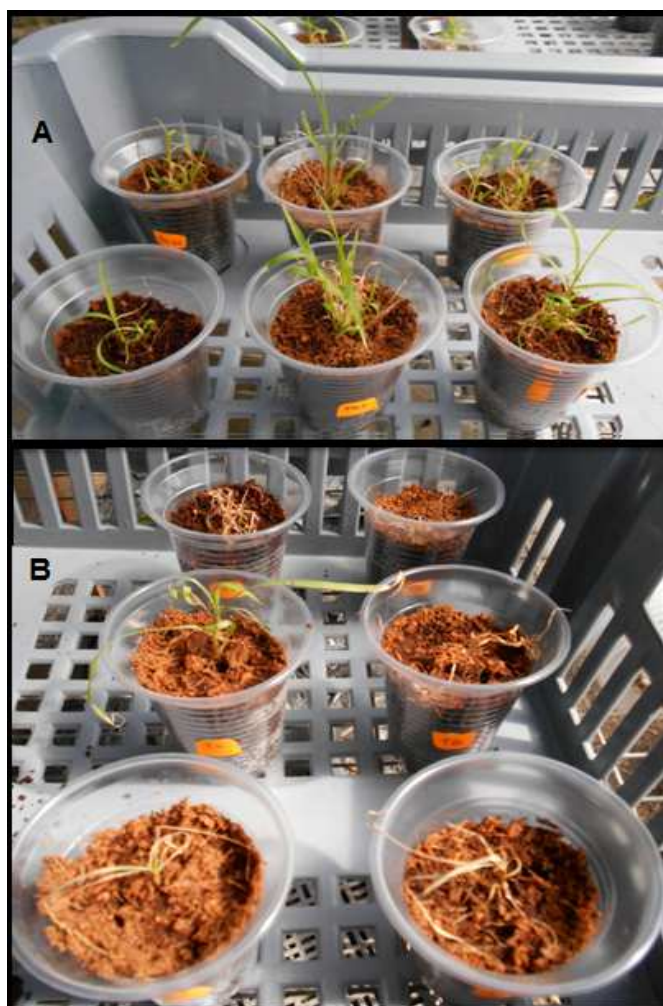


Figura 3.29 Plantas de caña de azúcar a los 19 días de iniciada la fase de aclimatación. **A:** Plantas inoculadas con la bacteria *G. diazotrophicus*, las seis viven. **B:** Plantas testigo, solo una de las seis vive.

Debido al bajo porcentaje de supervivencia de las plantas testigo, el ensayo se suspendió a los 19 días de iniciada la fase de aclimatación, pues si se perdían más testigos no se hubiese podido comparar el efecto de la bacteria *G. diazotrophicus* en el contenido de nitrógeno de las plantas.

3.8 Evaluación de plantas de caña de azúcar inoculadas con *G. diazotrophicus*

Los efectos de la inoculación de la bacteria *G. diazotrophicus*, en las plantas de caña de azúcar, que se evaluaron fueron altura, biomasa y contenido de nitrógeno; adicionalmente se evaluó la relación entre las longitudes de raíz y tallos, de cada una de las plantas, al final de la etapa de aclimatación, pues se encontró un importante crecimiento de raíces en las plantas inoculadas (TB). Para la evaluación de altura y biomasa, se consideraron dos fases, una *in vitro* y otra en invernadero, con puntos de control al inicio y final de cada una (figura 2.30).

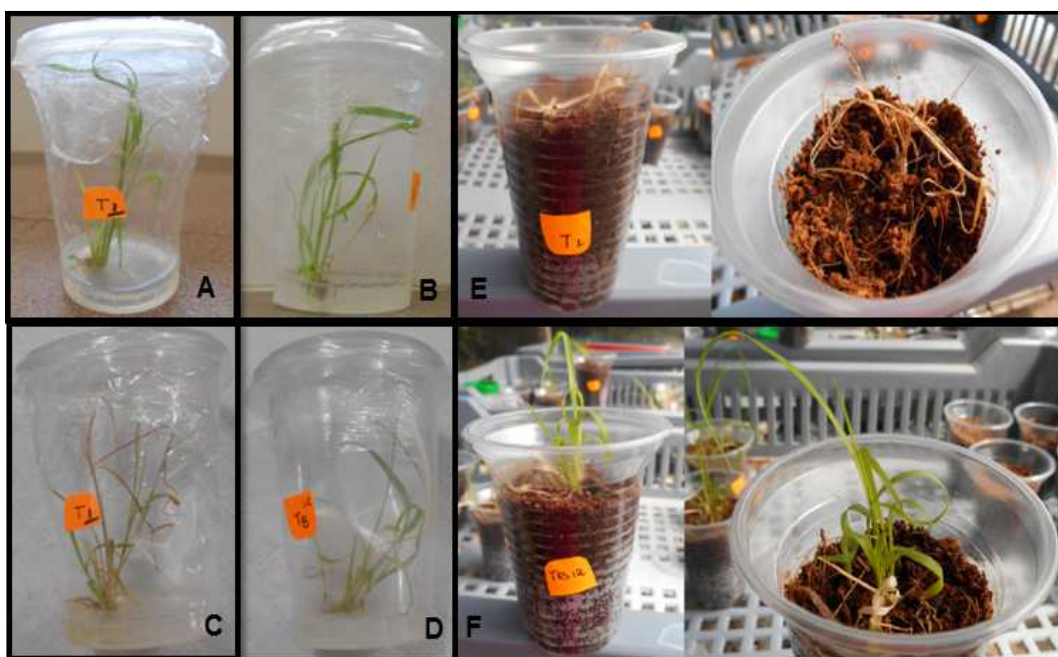


Figura 3.30 Plantas de caña de azúcar, inoculada con la bacteria *G. diazotrophicus* (TB) y planta testigo (T) en diferentes etapas del ensayo, desde el día 0 hasta el día 34. **A:** Planta T al inicio de la fase de incubación. **B:** Planta TB al inicio de la fase de incubación. **C:** Planta T al final de la fase de incubación e inicio de la fase de aclimatación. **D:** Planta TB al final de la fase de incubación e inicio de la aclimatación. **E:** Planta T al final de la fase aclimatación. **F:** Planta TB al final de la fase aclimatación.

3.8.1 Evaluación del efecto en la altura

Para la evaluación del efecto de la inoculación de la bacteria *G. diazotrophicus* en la altura de las plantas; se utilizó una tasa porcentual de crecimiento por fases, adicionalmente se comparó el crecimiento global desde la inoculación de la bacteria hasta el final de la etapa de aclimatación. Por la presencia de varios tallos en algunas de las plantas, esta tasa se calculó en base al promedio de la altura de todos los observados.

Durante la fase *in vitro* las plantas inoculadas (TB) tuvieron una tasa media de crecimiento de 19.67 %, mientras que para las plantas testigo (T), la media fue de 8.54 %; en el ANOVA realizado (anexo B6), se encontró diferencia estadística entre los tratamientos, con un valor $F_{1,34} = 11.13$, $p = 0.0021$, inferior a 0.05 (95 % de confianza); en la figura 3.31 se puede observar claramente la diferencia existente.

Para la fase en invernadero, la tasa media de crecimiento de las plantas inoculadas (TB) fue de 26.49 %, mientras que para las plantas testigo (T), la media fue de -26.85 % (figura 3.31), este valor negativo indica disminución de altura, que se debió a que varias plantas testigo murieron durante esta fase. El ANOVA realizado (anexo B6) mostró diferencia estadística entre los tratamientos, con un valor $F_{1,34} = 36.19$, $p < 0.0001$, inferior a 0.05 (95 % de confianza).

El efecto global de la inoculación de la bacteria *G. diazotrophicus*, en las plantas de caña de azúcar, se estableció mediante la tasa de crecimiento desde la inoculación hasta el final de la fase de aclimatación en invernadero, donde se obtuvo una tasa media de crecimiento de 52.12 % para las plantas inoculadas (TB) y una media de -20.86 % para las plantas testigo (T) (figura 3.31). El ANOVA realizado (anexo B6) identificó diferencia estadística entre los dos tratamientos, con un valor $F_{1,34} = 41.89$, $p < 0.0001$, inferior a 0.05 (95 % de confianza).

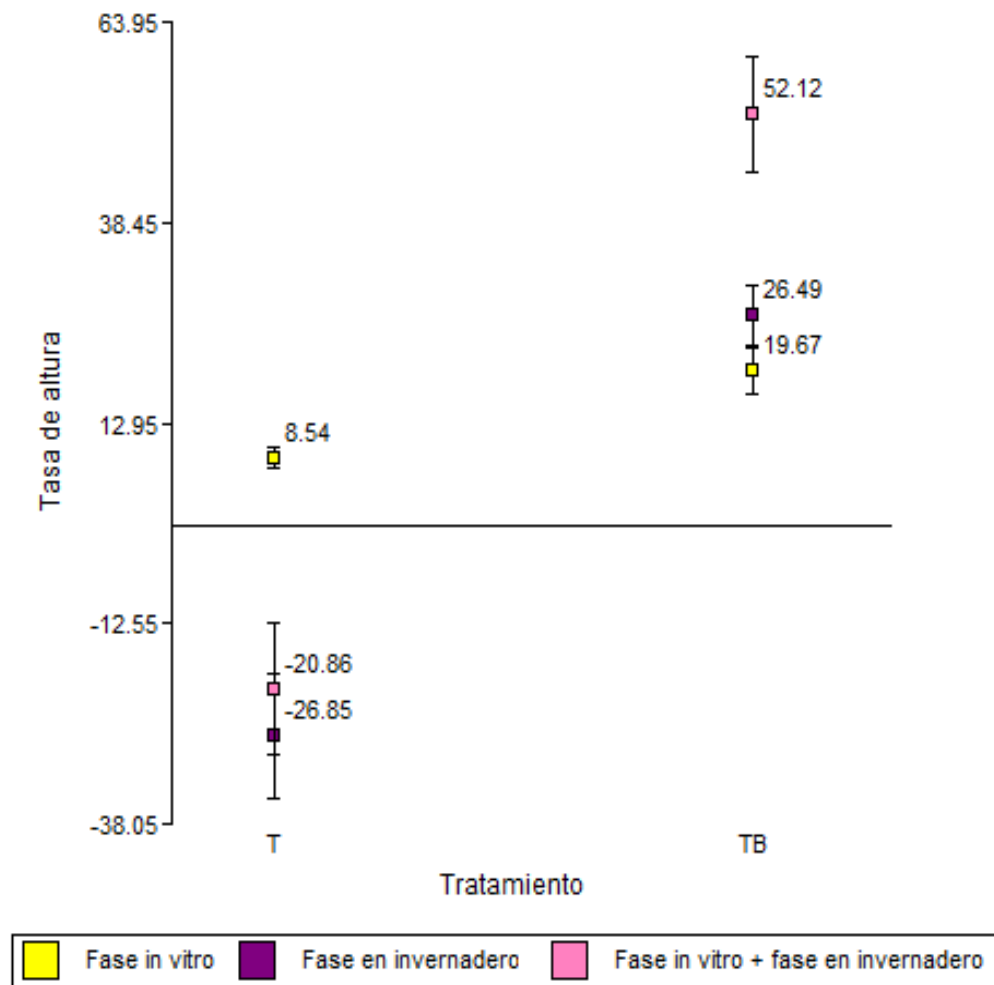


Figura 3.31 Tasas de crecimiento en altura de tallos de plantas de caña de azúcar inoculadas con la bacteria *G. diazotrophicus*, según tratamiento.

Al analizar los resultados entre las réplicas establecidas dentro de cada tratamiento, no se encontraron diferencias estadísticas entre ellas, como se muestra en el anexo D.

3.8.2 Evaluación del efecto en la biomasa

Con el fin de evaluar el efecto en la biomasa de las plantas; se utilizó una tasa porcentual de crecimiento por fases, al igual que para el efecto en la altura se comparó también el crecimiento global desde la inoculación de la bacteria hasta el final de la etapa de aclimatación.

Durante la fase *in vitro* las plantas inoculadas (TB) tuvieron una tasa media de crecimiento de 17.63 %, mientras que para las plantas testigo (T), la media fue de -6.60 % (figura 3.32), este valor negativo indica reducción de biomasa. En el ANOVA realizado (anexo B7), se encontró diferencia estadística entre los tratamientos, con un valor $F_{1, 34} = 32.35$, $p < 0.0001$, inferior a 0.05 (95 % de confianza).

Para la fase en invernadero las plantas inoculadas (TB) tuvieron una tasa media de crecimiento de 44.60 %, mientras que para las plantas testigo (T), la media fue de -56.63 % (figura 3.32). El ANOVA realizado (anexo B7) identificó diferencia estadística entre los tratamientos, con un valor $F_{1, 34} = 35.63$, $p < 0.0001$, inferior a 0.05 (95 % de confianza).

El efecto global de la inoculación de la bacteria *G. diazotrophicus*, en las plantas de caña de azúcar, se estableció mediante la tasa de crecimiento desde la inoculación hasta el final de la fase de aclimatación en invernadero, donde se obtuvo una tasa media de crecimiento de 67.79 % para las plantas inoculadas (TB) y una media de -60.45 % para las plantas testigo (T), (figura 3.32). El ANOVA realizado (anexo B7) identificó diferencia estadística entre los dos tratamientos, con un valor $F_{1, 34} = 52.67$, $p < 0.0001$, inferior a 0.05 (95 % de confianza).

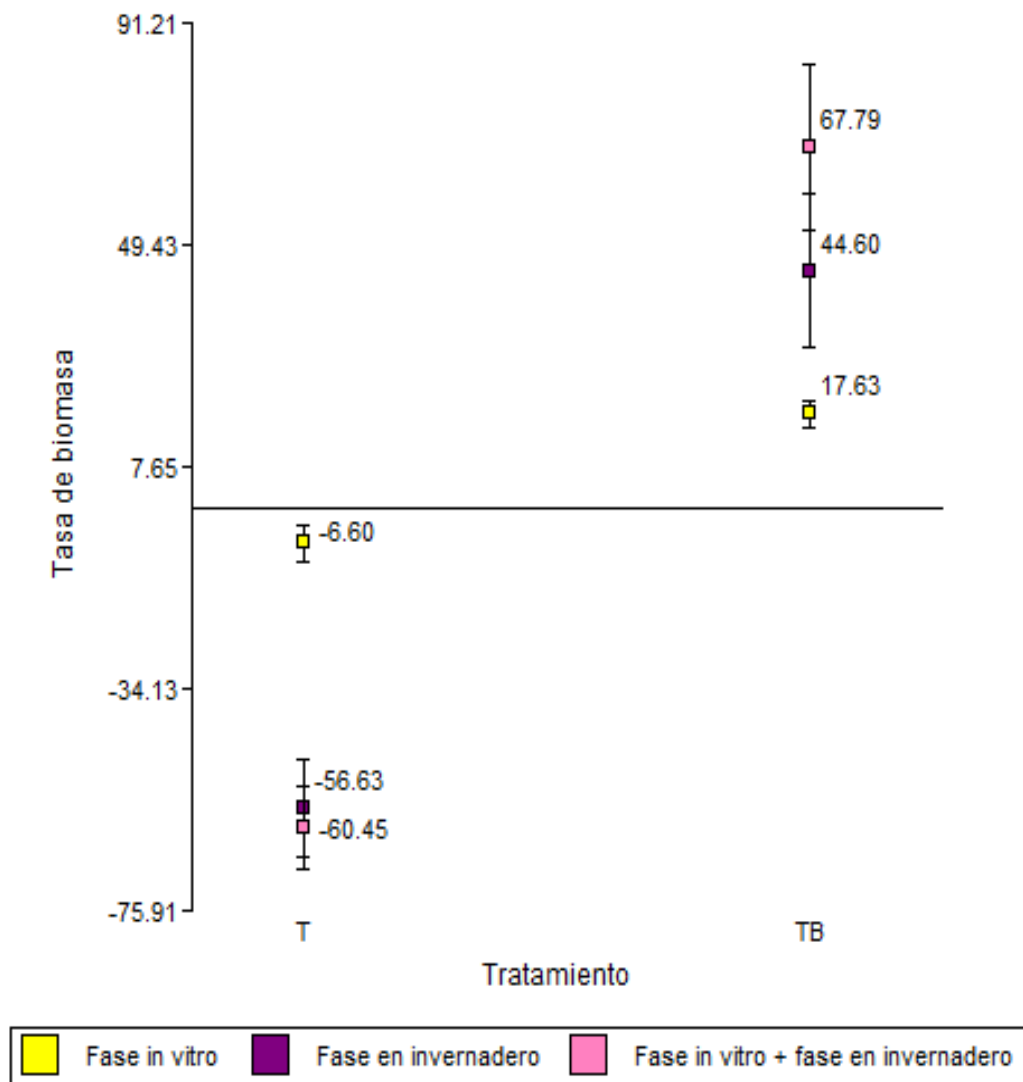


Figura 3.32 Tasas de crecimiento en biomasa para plantas de caña de azúcar inoculadas con la bacteria *G. diazotrophicus*, según tratamiento.

Al analizar los resultados entre las réplicas establecidas dentro de cada tratamiento, no se encontraron diferencias estadísticas entre ellas, como se muestra en el anexo E.

3.8.3 Evaluación del efecto en el desarrollo de raíz

Al finalizar la fase de aclimatación se determinó la relación entre la longitud de la raíz más profunda y la longitud promedio de los tallos, donde se obtuvo un valor medio de 1.49 para las plantas inoculadas (TB) y de 0.44 para las plantas testigo (T) (figura 3.33); el ANOVA realizado (anexo B8) mostró diferencia estadística entre los dos tratamientos, con un valor $F_{1, 34} = 28.43$, $p < 0.0001$, inferior a 0.05 (95 % de confianza).

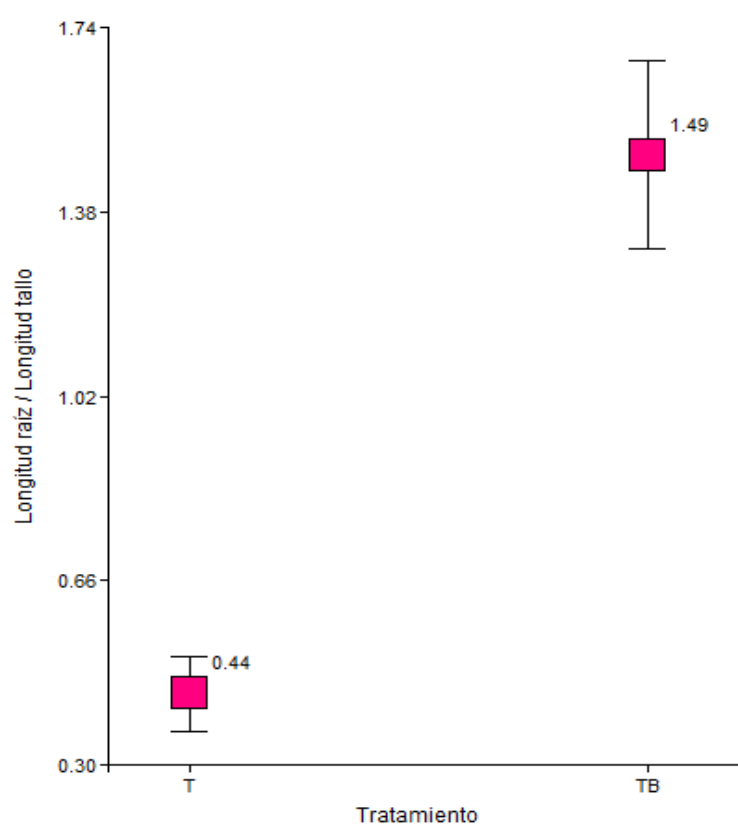


Figura 3.33 Relaciones entre longitud de raíz y longitud promedio de tallos para plantas de caña de azúcar, luego de la fase de aclimatación en invernadero, según tratamiento.

En el anexo F se evidencia la diferencia en el desarrollo del sistema radicular entre las plantas inoculadas y las plantas testigo.

3.8.3 Confirmación de la presencia de la bacteria *G. diazotrophicus*

Con el fin de confirmar la presencia de *G. diazotrophicus* se destinaron plantas para aislarla nuevamente, para lo cual se realizó la siembra en medio LGI-P y con el crecimiento obtenido, la prueba confirmatoria en medio PDA. Como resultado, la bacteria se obtuvo a partir de raíz, tallo y hoja de todas las muestras de las plantas inoculadas (TB), mientras que en las plantas testigo (T), no se encontró crecimiento de *G. diazotrophicus* (figura 3.34).

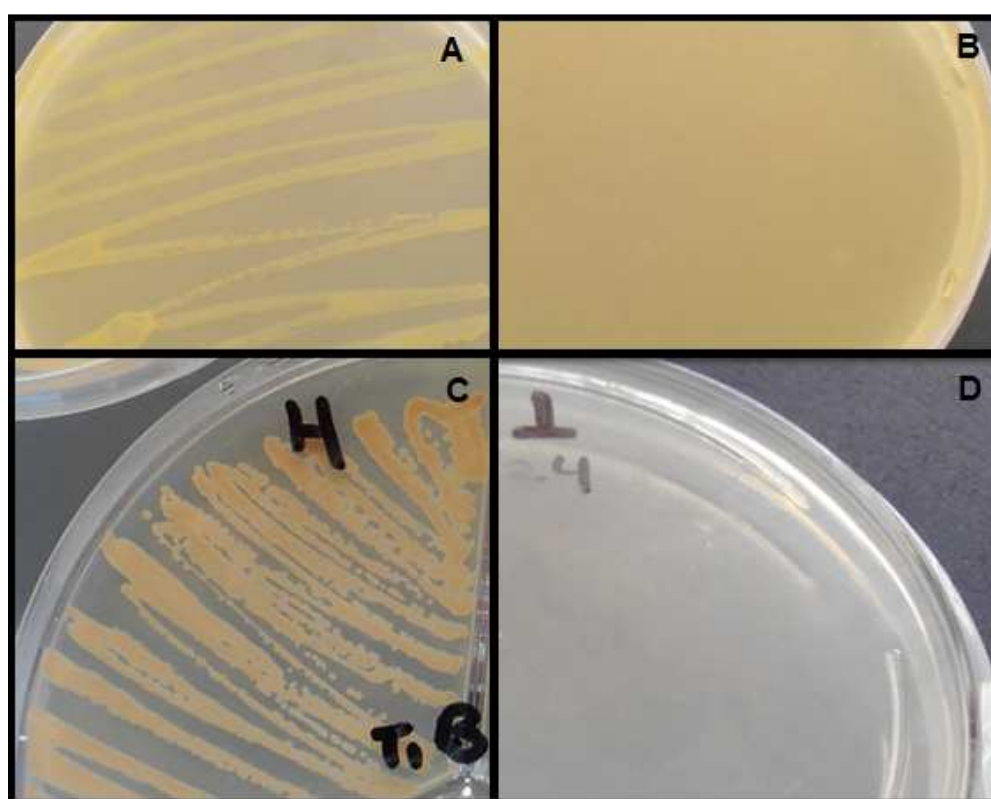


Figura 3.34 Resultados de siembra en medios LGI-P y PDA a partir de plantas inoculadas (TB) y testigo (T) de caña de azúcar luego del período de aclimatación.

A: Crecimiento bacteriano amarillo, característico de *G. diazotrophicus* en medio LGI-P, a partir de planta TB. **B:** Medio de cultivo LGI-P, sin crecimiento, a partir de planta T. **C:** Crecimiento bacteriano marrón, característico de *G. diazotrophicus* en medio PDA, a partir de planta TB. **D:** Medio de cultivo PDA, sin crecimiento, a partir de planta T.

3.8.4 Evaluación del efecto en el contenido de nitrógeno

Con la curva de calibración determinada para el método de Nessler (anexo G), se obtuvo el porcentaje de nitrógeno de cada una de las plantas de caña de azúcar designadas en esta evaluación, cuyas medias fueron 0.65 % para las inoculadas (TB) y 0.28 % para las testigo (T) (figura 3.35). El ANOVA realizado mostró (anexo B9) diferencia estadística entre los dos tratamientos, con un valor $F_{1, 15} = 5.93$, $p = 0.0279$, inferior a 0.05 (95 % de confianza).

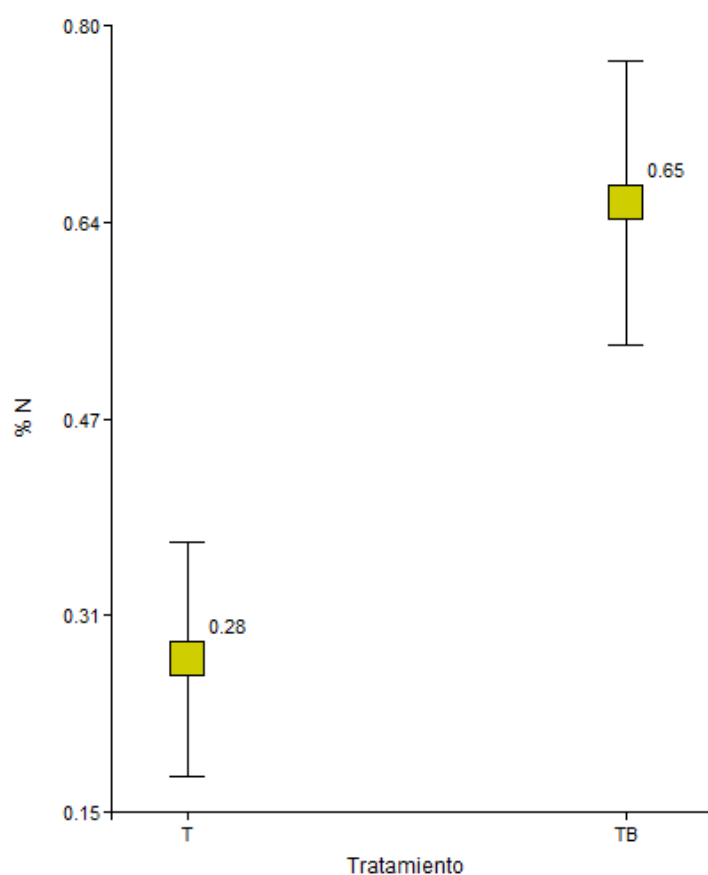


Figura 3.35 Porcentajes de nitrógeno para plantas de caña de azúcar, luego de la fase de aclimatación en invernadero, según tratamiento.

En el anexo H se compara a una planta inoculada con la bacteria *G. diazotrophicus* versus una planta testigo a lo largo de todo el ensayo.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Muestreo de plantas de caña de azúcar

Las plantas silvestres de caña de azúcar se obtuvieron en la zona de Mindo, que posee una gran biodiversidad y áreas con poco impacto de la actividad agrícola, lo que favoreció el crecimiento de *G. diazotrophicus*, pues como lo mencionan Muthukumarasamy *et al.* (2002), la fertilización nitrogenada inhibe la reproducción de la bacteria pudiendo eliminar poblaciones existentes.

4.2 Aislamiento de la bacteria *G. diazotrophicus*

Los crecimientos bacterianos en forma de película amarilla en la parte superior del medio LGI-P líquido y el cambio de este a incoloro, a partir de cortes de plantas de caña de azúcar; no son únicos de *G. diazotrophicus*, ya que como señalan Fuentes *et al.* (2001), dos especies fijadoras de nitrógeno del mismo género, *G. johannae* y *G. azotocaptans*; presentan idénticas características de crecimiento.

4.3 Purificación y caracterización de la bacteria *G. diazotrophicus*

En la presente investigación en el medio LGI-P sólido, se obtuvieron colonias amarillas planas de forma irregular, consistente con lo encontrado en los estudios realizados por Fuentes *et al.* (2001), Muñoz & Caballero (2001) y Dibut *et al.* (2005); sin embargo Pérez *et al.* (2003) indica que la forma de las colonias es redondeada.

Por la variedad de crecimientos encontrados, la prueba para distinguir a *G. diazotrophicus* de otras bacterias presentes, fue el crecimiento en PDA, pues como reportan Cavalcante & Döbereiner (1988) produce colonias de color marrón

oscuro; posteriormente, Fuentes *et al.* (2001) demostraron que la coloración permite diferenciarla de otras especies del mismo género; hallazgo confirmado por Muñoz & Caballero (2001), Loiret *et al.* (2004) y Dibut *et al.* (2005).

El comportamiento de las pruebas bioquímicas y morfológicas, fue consistente con el mostrado por *G. diazotrophicus* en los estudios realizados por Cavalcante & Döbereiner (1988), Gillis *et al.* (1989), Fuentes *et al.* (2001), Muñoz & Caballero (2001) y Dibut *et al.* (2005).

G. diazotrophicus pudo ser aislada a partir de cortes de tallo y hoja de la misma planta muestreada, resultados que son coherentes con los expuestos por Cavalcante & Döbereiner (1988), Dibut *et al.* (2005); y, Rojas, Manzano & Heydrich (2012). Además, se presume que en el aislamiento obtenido a partir de la raíz de esta planta también pudo existir la bacteria, ya que se encontraron colonias con características esperadas; sin embargo no se continuó caracterizándola debido a la presencia de contaminación fúngica en el cultivo.

4.4 Propagación de la bacteria *G. diazotrophicus*

El crecimiento óptimo de *G. diazotrophicus* fue en LGI-P líquido, contrario a lo obtenido por Pérez *et al.* (2003), donde el mejor crecimiento se produjo en caldo V8 para las bacterias del género *Gluconacetobacter*. Por otro lado, la ausencia de crecimiento en agar nutriente es consistente con lo explicado por Loiret *et al.* (2004), que demostraron que la presencia de aminoácidos bloquea el crecimiento de *G. diazotrophicus*, debido a la inhibición del complejo enzimático nitrogenasa encargado de la fijación biológica de nitrógeno (Stephan *et al.*, 1991).

4.5 Evaluación del mejor tratamiento de colonización bacteriana en plantas *in vitro* de caña de azúcar

Los resultados de estado de las plantas reflejaron que los tratamientos con menor concentración de nutrientes y sin inoculación bacteriana se ubicaron en el grupo con menores medias en la escala de verdor evaluada, la que se constituyó en un método simple para determinar el estado general de salud de la planta y en particular una posible deficiencia de nitrógeno, pues como señala Quintero (1995), esta se manifiesta por el amarillamiento progresivo de las hojas desde su punta hasta alcanzar el tallo; pudiendo incluso llegar a secarse.

Luego del período de incubación *in vitro*, se determinó que tres de los cuatro tratamientos con inoculación bacteriana presentaron un índice de contaminación menor al 30 %, valor que es suficiente en ensayos con plantas *in vitro* de acuerdo a López *et al.* (2011) para determinar que un tratamiento es viable.

Finalizada la etapa de incubación *in vitro*, se pudo aislar la bacteria *G. diazotrophicus* a partir de raíz, tallo y hoja de todas las plantas inoculadas en los cuatro tratamientos; lo que concuerda con otras investigaciones (Reis *et al.*, 1999; Muthukumarasamy *et al.*, 2002) que afirman que el tiempo suficiente para lograr una adecuada colonización bacteriana de la planta está entre 7 y 15 días.

La inoculación bacteriana en plantas *in vitro* de caña de azúcar se dio en condiciones de baja concentración de nutrientes y ausencia de nitrógeno pues, según lo encontrado por Reis *et al.* (1999) estas condiciones favorecen la formación de la simbiosis entre *G. diazotrophicus* y *Saccharum officinarum*.

4.6 Aclimatación de plantas de caña de azúcar inoculadas con *G. diazotrophicus*

Los procesos normales de aclimatación de la caña de azúcar duran de 28 a 50 días (Cortegaza, 2013) ó de 60 a 70 días (Arellano *et al.*, 2009); en los cuales cada planta, con un solo tallo, debe llegar a tener al menos cinco hojas o 20 cm de altura; además de requerir fertilización completa, y a partir de la segunda semana cantidades extra de nitrógeno, como aplicación foliar de urea. En contraste, el período de aclimatación de la presente investigación duró 19 días, en los que las plantas no recibieron nitrógeno y se llegó a aplicar únicamente el 50 % de los otros nutrientes, teniendo como resultado la muerte de la mayoría de las testigos y el desarrollo de más de cinco hojas en las plantas inoculadas.

Las plantas inoculadas con la bacteria *G. diazotrophicus*, luego del período de aclimatación, presentaron un índice de supervivencia mayor que el aceptado por Arellano *et al.* (2009), que señalan que en el Ecuador se mantiene aproximadamente en el 88 %.

4.7 Evaluación de plantas de caña de azúcar inoculadas con *G. diazotrophicus*

Al igual que en el estudio de Sevilla, Burris, Gunapala & Kennedy (2001), corroborado por Muñoz & Caballero (2001); en condiciones de restricción de nitrógeno, en esta investigación se encontraron diferencias significativas en la tasa de aumento de altura y biomasa de plantas de caña de azúcar, entre el tratamiento con inoculación de *G. diazotrophicus* y el testigo. Estas diferencias se explican porque la bacteria produce giberelinas y ácido indolacético (AIA) auxina natural (Fuentes, Jiménez, Abarca & Caballero, 1993; Jiménez *et al.*, 1997; Bastian *et al.*, 1998; Rojas, Rodríguez, Trujillo & Heydrich, 2009); fitohormonas que inducen la elongación celular como lo indican Rayle & Cleland (1992).

En los estudios consultados no se reportan resultados para el crecimiento de raíz en plantas de caña de azúcar inoculadas con la bacteria *G. diazotrophicus*, sin embargo en la etapa final de la investigación se encontró una diferencia notable en el desarrollo del sistema radicular entre las plantas inoculadas y las testigo. Es por eso que debido a que las plantas en ensayo se encontraban en fase juvenil, se las comparó con plantas jóvenes de pino de un estudio planteado por Pineda, Cetina, Vera, Cervantes & Khalil (2004), en el que se encontró que la relación entre la longitud de raíz y tallo está entre 0.72 y 0.94 frente a los valores obtenidos en este ensayo de 0.44 de las plantas testigo y 1.49 de las inoculadas; esto se puede explicar debido al efecto de la auxina (AIA) que según Torriente (2010), estimula la formación y elongación de raíces así como la proliferación de pelos radicales.

Sevilla *et al.* (2001) reportan que el contenido de nitrógeno en plantas de caña de azúcar inoculadas con la bacteria *G. diazotrophicus*, es significativamente mayor que el de plantas testigo no inoculadas o inoculadas con bacterias mutantes (sin el gen que permite la fijación de nitrógeno); al igual que en el presente estudio, donde se encontró que las plantas inoculadas presentaron un contenido de nitrógeno de 0.65 %, mayor que el de las testigo, 0.28 %, siendo incluso superior al reportado por Sierra (1981) de 0.59 % para caña de azúcar en estado de madurez.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. La bacteria *G. diazotrophicus* fue aislada y purificada por primera vez en el Ecuador a partir de cortes de tallo y hoja de caña de azúcar que crece de manera silvestre en la parroquia de Mindo.
2. El mejor medio de cultivo para la propagación de la bacteria *G. diazotrophicus* fue el LGI-P líquido.
3. La caracterización morfológica y bioquímica determinó que la bacteria aislada corresponde a *G. diazotrophicus*.
4. El mejor método de inoculación de la bacteria *G. diazotrophicus* en plantas *in vitro* de caña de azúcar, para la obtención de plantas con un mayor interés comercial, fue el T1B que utilizó medio MS al 10% con $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa.
5. *G. diazotrophicus* fue aislada nuevamente de plantas *in vitro* de caña de azúcar inoculadas, a partir de raíz, tallo y hoja en todos los tratamientos: T1B, T2B, T3B y T4B, con lo que se determinó y confirmó que las plantas fueron colonizadas completamente por la bacteria.
6. La bacteria *G. diazotrophicus* produjo una supervivencia del 94.44 % en plantas aclimatadas dentro de invernadero, frente al 22.22 % de las plantas testigo, en condiciones limitadas de nutrientes (la décima parte), lo que demostró la simbiosis planta-bacteria establecida.

7. Las plantas de caña de azúcar inoculadas con la bacteria *G. diazotrophicus* durante la fase *in vitro* presentaron una variación, en altura de 19.67 % y en biomasa de 17.63 %, frente a la de las testigo de 8.54 % y -6.60 % respectivamente, lo que demostró que la bacteria estimula el crecimiento de la planta.
8. El efecto benéfico de *G. diazotrophicus* sobre las plantas de caña de azúcar continuó durante la fase de aclimatación en invernadero, como lo demostraron las variaciones en altura de 26.49 % y biomasa de 44.60 %, para las inoculadas, mientras para las testigo fueron de -26.85 % y -56.63 % respectivamente.
9. Las plantas inoculadas con *G. diazotrophicus*, una vez aclimatadas, tuvieron un contenido de nitrógeno del 0.65 %, que al ser comparado con el 0.28 % encontrado en las plantas testigo, mostró la capacidad fijadora de nitrógeno de la bacteria, ya que en el sustrato y el riego no se aportó este nutriente.
10. La inoculación de la bacteria *G. diazotrophicus* en plantas de caña de azúcar favoreció el desarrollo del sistema radicular durante la fase de aclimatación en invernadero, lo que permitió a la planta mayor absorción de nutrientes.

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

1. Buscar aislar la bacteria en especies silvestres de caña de azúcar de otras zonas geográficas del Ecuador, aumentando así el patrimonio genético del país.
2. Realizar una caracterización molecular de la bacteria *G. diazotrophicus* ecuatoriana para su clasificación filogenética.
3. Realizar pruebas con la bacteria *G. diazotrophicus* sobre su capacidad como controlador biológico.
4. Inocular la bacteria *G. diazotrophicus* en medio MS modificado al 10 % con $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa, al iniciar la fase de enraizamiento *in vitro*, como alternativa al uso de hormonas inductoras de la formación de raíces.
5. Probar la inoculación de la bacteria *G. diazotrophicus*, por inmersión de la raíz sin necesidad de podarla, en diferentes especies vegetales de interés comercial y alimenticio para contribuir al desarrollo del agro y a la soberanía alimentaria.
6. Realizar ensayos de campo con plantas de caña de azúcar inoculadas con la bacteria *G. diazotrophicus* para determinar sus efectos en los rendimientos del cultivo.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, N. (2010). Ficha Técnica del cultivo de Caña de Azúcar. Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación, México.

Allen, R. (2006). Evapotranspiración del cultivo. Guías para la determinación de los requerimientos de agua de los cultivos por organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Estudio FAO riego y drenaje 56, Roma, 323 p.

Anitha, K. & Thangaraju, M. (2010). Growth promotion of rice seedlings by *Gluconacetobacter diazotrophicus* under *in vitro* conditions. Journal of cell & plants sciences 1 (1):6-12.

Arellano, A., Korneva, S., Fischer, F., Cabanilla, L., Tola, N., Ochoa, A., Ramos M. & Pincay, A. (2009). Micropropagación de caña de azúcar en Ecuador. Centro de investigación y desarrollo, Unión nacional de cañicultores del Ecuador (UNCE). Biotecnología Vegetal Vol. 9, No. 4: 235 – 238, ISSN 2074-8647.

Barba, A., Luna, B. & Romero, J. (2001). Micropropagación de plantas. México, Editorial Trillas, S.A. de C.V. 107 p.

Bastian, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R. & Bottini, R. (1998). Production of indol-3-acetic acid and gibberellins A_1 y A_3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. Plant Growth Reg. 247-11.

Becton, Dickinson & Company. (2005). Patrón de turbidez BBL preparado. McFarland turbidity standard No. 0.5.

Cavalcante, V. & Döbereiner, J. (1988). A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with Sugarcane, Plant and Soil, vol. 108, pp. 23-31.

Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas.

CINCAE (Centro de Investigación de la Caña de Azúcar del Ecuador). (2013). Caña de azúcar: cultivo para la sostenibilidad. Extraído el 7 de enero, 2014, de <http://goo.gl/hSkOLR>

Cortegaza, L. (2013). Guía para la micropropagación *in vitro* de caña de azúcar. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.

Cruz, N. (2004). Micropropagación clonal *in vitro* de árboles seleccionados de *Tectona grandis* L. (Teca).

Daderot. (2007). Plant Tissue Culture Lab - Atlanta Botanical garden. Licencia Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0. Extraído el 27 de Julio, 2014, de <http://goo.gl/fpgOkY>

Di Renzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo C. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Döbereiner, J., Baldani, V. & Baldani, J. (1995). Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasilia: EMBRAPA-SPI: Itaguai, R.J. EMBRAPA-CNPAB, 60p.

Dibut, B. (2000). Obtención de un bioestimulador del crecimiento y el rendimiento vegetal para el beneficio de la cebolla (*Allium cepa* L.). INCA, 104 p.

Dibut, B., Ortega, M., Martínez, R., Fey, L. & Ríos, Y. (2005). Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para

Cuba. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Cultivos tropicales, vol. 26, núm. 2, pp. 5-10.

Domínguez, A. (1989). Abonado de hortalizas aprovechadas por sus frutos. Madrid: Ministerio de la agricultura, pesca y alimentación. 16p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). (1988). La caña de azúcar como pienso. Memorias de una consulta de expertos de la FAO, Santo Domingo, RD., 1986. 319 p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). (2013) El Salvador confirmará la prohibición del uso de agroquímicos, AGRONoticias América Latina y el Caribe.

FDA (Food and drugs administration, USA). (1998). Bacteriological Analytical Manual. Extraído el 19 de junio, 2014, de <http://goo.gl/LcFKFP>

Fuentes, L., Jiménez, T., Abarca, I. & Caballero, J. (1993). *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. Plant and Soil 154: 145-150.

Fuentes, L., Bustillos, R., Tapia, A., Jiménez, T., Wang, E., Martínez, E. & Caballero J. (2001). Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. Nov, and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. Nov, associated with coffee plants. Int. J. Sys. Evol. Microbiol. Vol 5, p. 43-49.

Gamazo, C., López, I. & Díaz, R. (2005). Manual práctico de Microbiología. Masson S.A. Barcelona-España. Tercera edición.

Gaviria, J. (2010). Evaluación de diferentes metodologías para el aislamiento de la bacteria endófito *Gluconacetobacter spp.* a partir de cultivos de caña de azúcar provenientes del municipio de Supía (Caldas). Universidad Católica de Manizales.

Gillis, M., Kersters, B., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R., Stephan, M., Teixeira, K., Döbereiner, J. & De ley, J. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. Nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. International journal of systematic bacteriology, p. 361-364.

González, O. (1999). Interacciones de *Gluconacetobacter diazotrophicus* y cepas de bacterias endófitas de la caña de azúcar. La Habana: Universidad .Facultad de Biología. P. 29, 30.

Gutiérrez, F. (2006). Estado de conocimiento de especies invasoras. Propuesta de lineamientos para el control de los impactos. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, D.C. - Colombia. 156 p.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. & Kloepper, J. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal Microbiology*. 43:895-914.

INCA (Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas). (2010). Manual de técnicas analíticas de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos.

INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos). (2012). Encuesta de superficie y producción agropecuaria continua 2012. Extraído el 24 de agosto, 2013, de <http://goo.gl/4AFHiu>

James, K., Olivares, L., Oliveira, L., de dos Reis, B., Silva da, G. & Reis de Oliveira, M. (2001). Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Exp. Botany*, vol. 52, no. 357, p. 747-760.

Jiménez, T., Fuentes, L., Tapia, A., Mascarua, M., Martínez, E. & Caballero, J. (1997). *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and

isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63 (9): 3676-83.

Kropff, M. (1997). Intensive sugar cane production. Proceedings of sugar symposium. CAB International Wallingford UK.

Li, R-P. & MacRae, I. (1992). Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. *Soil Biol. Biochem.* 24, 413-419.

Linneo, C. (1753). *Species Plantarum* 1: 54. Extraído el 16 de marzo, 2014, de <http://goo.gl/sMfhYI>

Loiret, F., Ortega, E., Kleiner, D., Ortega-Rodés, P., Rodés, R. & Dong Z. (2004). A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. From sugarcane. *Journal of applied Microbiology.* 97, 504-511.

López, P., Iracheta, L., Castellanos, M., Méndez, I., Aguirre, J., Gutiérrez, A., Ojeda, M. & Pérez B. (2011). Variación en la tolerancia a desinfectantes de genotipos élite de *Coffea* spp. cultivados *in vitro*. *Revista mexicana de Ciencias Agrícolas.* Vol. 2. Núm. 5. P. 645-657.

Mayz, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Laboratorio de Rizobiología, Campus Juanico, Maturín, Estado Monagas.

Muñoz, J. (2004). La micropropagación de caña de azúcar y sus implicaciones. España, EEZ-CSIC. 20 p.

Muñoz, J., & Caballero, J. (2001). *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito. Programa de ecología molecular y microbiana, Centro de investigación sobre fijación de nitrógeno. UNAM, México, pp. 157-176.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473-479.

Muthukumarasamy, R., Revathi, G. & Vadivelu, M. (2000). Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal of red-rot of Sugarcane. *Current Science*, vol. 78, pp. 1063-1065.

Muthukumarasamy, R., Revathi, G. & Loganathan P. (2002). Effect of inorganic N on the population, *in vitro* colonization and morphology of *Acetobacter*

diazotrophicus (syn. *Gluconacetobacter diazotrophicus*). Plant and soil. 243: 91-102.

NCBI (National center for Biotechnology information). Straininfo .Extraído el 5 de agosto, de 2014, de <http://goo.gl/1o4xgR>

NCCCLS (Natural Committee for Clinical Laboratory Standards. (1993). Performance standards for antimicrobial disk. Susceptibility Test. Approved standard M2-A5,13 (24).

Paulino, C., Kessler, A., Ochoa M. & De michelis, A. (2013). Compuestos bioactivos en frutas pequeñas de la Patagonia argentina: efecto del solvente de extracción en su determinación cuantitativa. Universidad Nacional del Comahue-Argentina.

Pérez, O., Ovalle, W., Rodas, A., López, E. & Hernández, F. (2003). Bacterias fijadoras de nitrógeno en caña de azúcar. Métodos para multiplicación e inoculación y comportamiento de variedades promisorias en campo. Centro Guatemalteco de investigación y capacitación de la caña de azúcar. Instituto de Ciencia y tecnología agrícolas.

Pineda, T., Cetina, V., Vera, J., Cervantes, C. & Khalil A. (2004). El trasplante contenedor-contenedor (1+1) y contenedor-raíz desnuda (p+1) en la producción de la plantas de *Pinus greggii Engelm.* INIFAP.

Piñón, D., Casas, M., Blanch, M., Fontaniella, B., Blanco, Y. & Vicente, C. (2002). *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane endosymbiont, produces bacteriocins against *Xanthomonas albilineans*, a sugarcane pathogen, Research in Microbiology, vol. 153, pp. 345-351.

Quintero, R. (1995). Fertilización y nutrición. CENICAÑA. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia, Cali. P.153-177.

Quintero, R. (1997). Fertilización Nitrogenada en Caña de Azúcar. Cali, Colombia. CENICAÑA. 15 p.

Ramírez, M. (2008). Cultivos para la producción sostenible de biocombustible: una alternativa para la generación de empleos e ingresos. Caña de azúcar. Servicio Holandés de Cooperación al Desarrollo SNV, módulo V. 16 p.

Rayle, D. & Cleland. R. (1992). The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. Plant Physiol. 99, 1271-1274.

Reckmann, O. (2011). Fibra de coco, un sustrato con grandes ventajas. Red agrícola.

Reis, V., Olivares, F., Martínez, A., Reis, F., Baldani, J. & Döbereiner J. (1999). Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. Plant and Soil 206: 205-211.

Roca, W. & Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.

Rojas, M., Manzano, J., & Heydrich, M. (2012). Aislamiento e identificación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* a partir de variedades de caña de azúcar cultivadas en Cuba. Revista Cubana de Ciencias Biológicas. Vol. 1, N° 1. Pp. 29-33.

Rojas, M., Rodríguez, A., Trujillo, I. & Heydrich, M. (2009). Relación de la fijación de nitrógeno y la producción de auxinas en cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* procedentes de diferentes cultivos. Universidad Nacional de Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología.

Romero, E., Olea, I., Scandaliaris, J., Alonso, J., Digonzelli, P., Tonatto, J. & Leggio Neme, M. (2004). Recomendaciones para la fertilización de la caña de azúcar. Gacetilla agroindustrial de la EEAOC, 61.

Sevilla, M., Burris, R., Gunapala, N. & Kennedy C. (2001). Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif-mutant strains. The American Phytopathological Society. MPMI Vol. 14, No. 3, pp. 358-366.

Shankaraiah, N., Gururaj-Hunsigi, L. & Hunsigi, G. (2001). Field evaluation of some promising associative nitrogen fixing bio-aguts under grader levels of nitrogen for yield and quality of jaggery. Cooperative Sugar, vol. 33, no. 1, p. 39-43.

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2014). Jugo de caña, origen del azúcar. Extraído el 19 de julio, 2014, de <http://goo.gl/DqfBXP>

Sierra, P. (1981). Valor nutritivo y utilización de la caña de azúcar y sus productos en la alimentación animal. Industrialización de la caña. Instituto Colombiano Agropecuario, Medellín.

Stephan, M., M. Oliviera, M., Teixeira, K., Martínez-Drets, G. & Döbereiner, J. (1991). Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. FEMS Microbiol. Lett. 77:67-72.

Tisdale, S. & Nelson, W. (1966). Soil fertility and fertilizers. MacMillan, Nueva York. 694 p.

Torriente, D. (2010). Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. Perspectivas de su uso en cuba. Cultivos Tropicales, vol. 31, no. 1, p. 19-26.

Ureta, A. & Nordlund, S. (2002). Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a Putative FeSII Protein. J. Bacteriol. 184(20):5805-5809.

USDA (United States Department of Agriculture) Natural Resources Conservation Service (2014). Classification for kingdom Plantae down to species *Saccharum officinarum* L. Extraído el 18 de junio, 2014, de <http://goo.gl/dFeOae>

Verma, C., Ladha, K. & Tripathi, K. (2001). Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J Biotechnol.* 91:127–41.

Wood, T. (1992). Nitrogen and Sucarcane. *South African Sugar Journal*, V. 76. N° 9. P: 289-290.

Yamada, Y., Hoshino, K. & Ishikawa, T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61:1244-1251.

Zúñiga, A. (2012). Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) variedad CP 73-1547. Departamento de ciencia y producción agropecuaria. Escuela agrícola panamericana, El Zamorano.