

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*

Salinas, L., Landázuri, P., & Ponce, K.

Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura. Ingeniería en Biotecnología.

Septiembre 2014. Sangolquí - Ecuador.

RESUMEN

Como alternativa a la fertilización nitrogenada, 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 silvestre. La bacteria se caracterizó como bacilo Gram negativo, con formación de colonias planas, irregulares y amarillas en medio LGI-P sólido y marrón en PDA, además presentó consistencia con los resultados reportados para esta especie en las pruebas bioquímicas realizadas. *G. diazotrophicus* se propagó 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 sistema radicular; además se observó un aumento en el contenido de nitrógeno en ausencia de fertilización nitrogenada, lo que confirmó la capacidad fijadora de la bacteria.

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

INTRODUCCIÓN

El cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) 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, aminas, 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 (Dibut, 2000; James *et al.*, 2001).

Se ha planteado así, la búsqueda de un microorganismo que habite en el interior del vegetal y que tenga la posibilidad de ser inoculado en cultivos de importancia económica; este es el caso de la bacteria endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus*, 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; Shankaraiah, Gururaj-Hunsigi & Hunsigi, 2001).

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. 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 endófito, listas para su aclimatación en suelo (Gutiérrez, 2006).

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 endófito 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.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de G. diazotrophicus

Se tomaron muestras de raíz, tallo y hoja de plantas de caña de azúcar (*S. officinarum*), que crecen de manera silvestre en la parroquia Mindo, las muestras vegetales se lavaron con agua corriente y detergente, a continuación se enjuagaron con agua destilada estéril. Se realizaron pequeños cortes de cada una de las partes y se

inocularon en medio LGI-P líquido, selectivo para bacterias fijadoras de nitrógeno, para su incubación durante 7 días a 30 °C (Pérez *et al.*, 2003; Döbereiner, Baldani & Baldani, 1995).

Purificación y caracterización de G. diazotrophicus

De los tubos de ensayo que presentaron cambio de coloración del medio a incoloro y la formación de una película amarilla en la parte superior, se tomaron los crecimientos bacterianos y se sembraron en LGI-P sólido para su incubación por 7 días a 30° C; las colonias amarillas, planas y de forma irregular, para su identificación se sembraron en PDA, ya que únicamente las colonias de la especie *G. diazotrophicus*, luego de 7 días de incubación a 30 °C, presentan una coloración marrón como señalan Dibut *et al.* (2005) y Fuentes *et al.* (2001).

Obtenido el crecimiento esperado en PDA se realizó la caracterización morfológico-bioquímica mediante las siguientes pruebas: tinción Gram, motilidad, catalasa, oxidasa, citrato, indol, ácido sulfhídrico (H₂S); asimilación de aminoácidos y azúcares como única fuente de carbono: L-prolina, L-cisteína, D-celobiosa, D-lactosa, D-maltosa, D-manitol y D-xilosa (Dibut *et al.*, 2005; Gamazo *et al.*, 2005).

Propagación de G. diazotrophicus

Las bacterias caracterizadas se sembraron e incubaron, a 30 °C durante 15 días en: LGI-P líquido, caldo V8 y agar nutritivo (Pérez *et al.*, 2003); para la determinación del mejor medio de cultivo para la reproducción bacteriana, en el cual se obtuvo el inóculo para las plantas *in vitro* de caña de azúcar, de aproximadamente 10⁷ UFC·mL⁻¹, densidad celular que se determinó mediante comparación con los patrones de turbidez McFarland (Li & MacRae, 1992).

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

Se realizaron tres lavados, con agua destilada estéril, de las raíces de las plantas

in vitro, se sumergieron en el cultivo bacteriano para luego sembrarlas en medio Murashige & Skoog (MS) al 10 % y 20 %, sin fuente de nitrógeno, vitaminas ni hormonas; cada concentración enriquecida con dos niveles de sacarosa $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; teniendo cuatro tratamientos con cinco repeticiones cada uno, los que contaron con su respectivo grupo testigo, sin inoculación bacteriana. Las plantas permanecieron en incubación durante 15 días (Reis *et al.*, 1999).

Evaluación del mejor tratamiento de colonización bacteriana

Luego del período de incubación se evaluó a cada una de las plantas, por tratamiento, en base a: su estado, determinado por el porcentaje de hojas amarillas y verdes presentes; contaminación y, presencia de la bacteria *G. diazotrophicus*, para lo cual cada una de las partes de las plantas se licuaron en una solución de sacarosa al 10 % y se sembraron en LGI-P sólido, el crecimiento obtenido en este medio se pasó a PDA para la confirmación de la identidad bacteriana.

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.

Aclimatación de plantas de caña de azúcar

Luego del período de incubación *in vitro* se midió la altura y biomasa de cada planta para la comparación con los valores iniciales. Posteriormente se realizaron tres lavados de la raíz con agua destilada estéril y se pasaron las plantas a fibra de coco como único sustrato para la etapa de aclimatación que se planificó para 30 días según lo sugerido por Reis *et al.* (1999).

Durante la aclimatación se realizó el riego de las plantas con medio MS sin fuente de

nitrógeno, vitaminas ni hormonas. 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.

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 adicionalmente longitud de raíz. En la mitad de las plantas de cada réplica se aplicó la metodología ya descrita para confirmar la presencia de la bacteria en cada una de las partes: raíz, tallo y hoja. En las plantas restantes se determinó el contenido total de nitrógeno mediante el método colorimétrico de Nessler (1930).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el medio LGI-P líquido se observó su cambio de coloración a incoloro, además de crecimientos bacterianos en forma de película amarilla en la parte superior, mientras que en LGI-P sólido se identificaron 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, estos crecimientos no son únicos de *G. diazotrophicus*, ya que como lo señalan Fuentes *et al.* (2001), dos especies fijadoras de nitrógeno del mismo género, *G. johannae* y *G. azotocaptans*; presentan idénticas características.

Por esta razón la prueba para distinguir a *G. diazotrophicus* de otras bacterias presentes fue el crecimiento en PDA, pues como reportan Cavalcante & Döbereiner (1988) esta bacteria produce colonias de color marrón, 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). La prueba en PDA fue positiva, luego de 15 días de incubación a 30 °C

(figura 1), para dos crecimientos, uno a partir de tallo y otro a partir de hoja de una de las plantas muestreadas.

En la caracterización morfológico-bioquímica, realizada a los crecimientos positivos en PDA, se obtuvieron los siguientes resultados: bacilos Gram (-), motilidad (+), catalasa (+), oxidasa (-), citrato (+), Indol (+), H₂S (-), L-prolina (-), L-cisteína (-), D-celobiosa (-), D-lactosa (-), D-maltosa (+/-), D-manitol (+/-) y D-xilosa (+/-); los que fueron consistentes con los mostrados por Cavalcante & Döbereiner (1988), Gillis *et al.* (1989), Fuentes *et al.* (2001), Muñoz & Caballero (2001) y Dibut *et al.* (2005), por lo que se pudo caracterizar a la bacteria aislada como *G. diazotrophicus*.

El crecimiento óptimo de *G. diazotrophicus* fue en LGI-P líquido, al presentar mayor turbidez en relación a la obtenida en caldo V8, 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, no existió crecimiento en agar nutriente lo que 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).

En la determinación del mejor tratamiento de colonización bacteriana, 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. En relación a la contaminación, se determinó que tres de los cuatro tratamientos con inoculación bacteriana presentaron un índice 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.

Al evaluar la presencia de la bacteria *G. diazotrophicus* en las plantas *in vitro* inoculadas, esta se pudo aislar 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. El mejor método para colonización bacteriana fue el que utilizó medio MS al 10 % con 2·gL⁻¹ de sacarosa, ya que según Reis *et al.* (1999), condiciones de baja concentración de nutrientes y ausencia de nitrógeno favorecen la formación de la simbiosis entre *G. diazotrophicus* y *S. officinarum*.

En la fase de aclimatación, se obtuvo una supervivencia del 22.22 % con 16.67 % de contaminación para las plantas testigo, frente al 94.44 % de supervivencia y 0 % de contaminación de las plantas inoculadas; debido a la baja supervivencia de las plantas testigo, el ensayo se suspendió a los 19 días de iniciada la aclimatación, tiempo en el cual las plantas inoculadas contaban con más de cinco hojas, signo de finalización de esta fase según Arellano *et al.* (2009), el que se presenta a los 60 o 70 días con una supervivencia del 88 % en condiciones de fertilización completa y nitrógeno adicional mediante aplicación foliar de urea.

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 (figura 2). Estas diferencias se explican porque la bacteria produce giberelinas y ácido indolacético (AIA) auxina natural (Fuentes, Jiménez, Abarca &

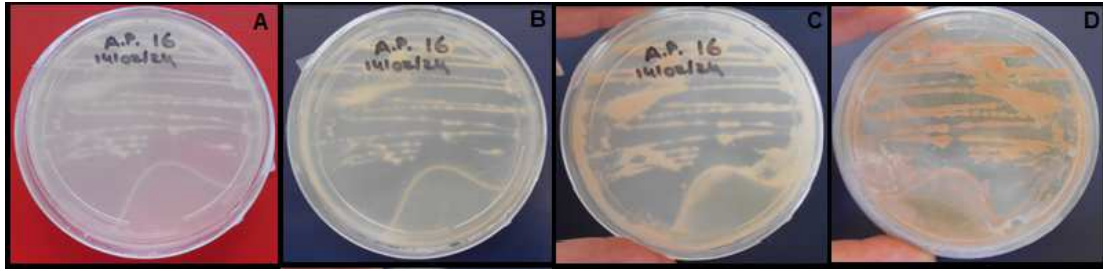


Figura 1. Crecimientos positivos para *G. diazotrophicus* en medio PDA a 30 °C de incubación, se observa una coloración marrón paulatina. A: 8 días, B: 11 días, C: 13 días y D: 15 días.

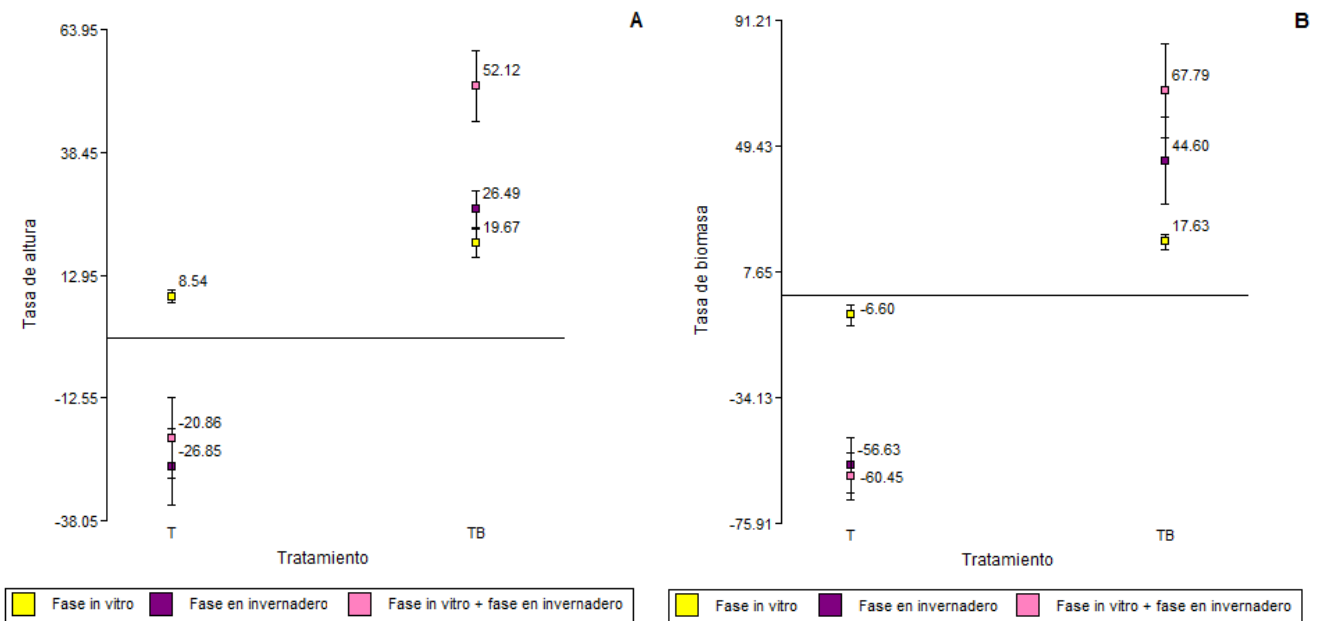


Figura 2. Tasas de crecimiento de plantas de caña de azúcar desde la inoculación hasta el final de la fase de aclimatación, según tratamiento (T: plantas testigo, TB: plantas inoculadas con *G. diazotrophicus*). **A:** Tasa de altura. **B:** Tasa de biomasa.

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 la etapa final de la investigación se encontró una diferencia notable en el desarrollo del sistema radicular entre las plantas inoculadas y las testigo; por lo que 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.

Finalmente, en relación al contenido de nitrógeno, Sevilla et al. (2001) reportan que plantas de caña de azúcar inoculadas con *G. diazotrophicus*, este 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.

CONCLUSIONES

La bacteria *Gluconacetobacter 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 Mindo.

La inoculación de *G. diazotrophicus* en plantas de caña de azúcar promovió su crecimiento en altura, biomasa, sistema radicular y contenido de nitrógeno.

BIBLIOGRAFÍA

- 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). *Biocología Vegetal* Vol. 9, No. 4: 235 – 238, ISSN 2074-8647.
- Bastian, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R. & Bottini, R. (1998). Production of indol-3-acetic acid and gibberellins A1 y A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Reg.* 247-11.
- Cavalcante, V. & Döbereiner, J. (1988). A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with Sugarcane, *Plant and Soil*, vol. 108, pp. 23-31.
- Döbereiner, J., Baldani, V. & Baldani, J. (1995). Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília: 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.
- 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. Micobiol.* Vol 5, p. 43-49.
- 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.
- Gamazo, C., López, I. & Díaz, R. (2005). Manual práctico de Microbiología. Masson S.A. Barcelona-España. Tercera edición.
- 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.
- 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.
- Li, R-P. & MacRae, I. (1992). Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. *Soil Biol. Biochem.* 24, 413-419.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Quintero, R. (1995). Fertilización y nutrición. CENICAÑA. El cultivo de la caña en la zona azucarera de Colombia, Cali. P.153-177.
- Rayle, D. & Cleland. R. (1992). The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99, 1271-1274.
- 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.
- 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*.
- 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-agents under grader levels of nitrogen

for yield and quality of jaggery. Cooperative Sugar, vol. 33, no. 1, p. 39-43.

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.