



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.



Facultad de Químico-Farmacobiología.

Aislamiento de *Gluconacetobacter* sp. de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) y efecto de la inoculación de *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp. en cebada (*Hordeum vulgare* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.).

Tesis para optar al título:

Químico Farmacobiólogo

Presenta:

Gabriel Morales Pedro

Director de tesis:

Doctor en ciencias con especialidad en microbiología

Juan Manuel Sánchez-Yáñez

Morelia, Mich. septiembre del 2013.



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

Laboratorio de Microbiología Ambiental

Esta investigación fue financiada por el proyecto 2.7 “Aislamiento y selección de microorganismos promotores de crecimiento vegetal de teocintle y leguminosas silvestres” (2013), con el apoyo de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, bajo la dirección del Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez.



“Tesis apoyada por el Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e innovación del Estado de Michoacán” con folio: BT-12-2-572.

CONTENIDO.

1. Resumen.....	VIII
1.1 Summary.....	X
2. Introducción.....	1
3. Antecedentes	2
4. Hipótesis.....	7
5. Objetivos generales.	7
5.1 Objetivo específico.....	7
6. Materiales y métodos	8
6.1 Origen y aislamiento de <i>Gluconacetobacter</i> sp.	8
6.2 Activación de <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i>	9
6.3 Solarización del suelo.....	9
6.4 Preparación del sistema hidropónico de Jarra de Leonard.....	10
6.5 Inoculación de la semilla de cebada y trigo con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y aislado <i>PGM-3</i>	12
6.6 Variables respuesta para analizar el efecto de inoculación de <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y aislado <i>PGM-3</i> en cebada y trigo.	13
6.7 Análisis estadístico de resultados.	13
6.8 Identificación de la BPCV endófito de la caña de azúcar.	13
6.9 Conservación de BPCV	14
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
7.1 Respuesta de la cebada a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> a nivel de plántula.	15
7.2 Respuesta de la cebada a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> a nivel de floración.	18
7.3 Respuesta del trigo a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> a nivel de plántula.....	22
7.4 Respuesta del trigo a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> a nivel de floración.....	25
7.5 Aislamiento e identificación bioquímica del aislado <i>PGM-3</i> de la caña de azúcar.	28
8 CONCLUSIÓN.....	30
9 BIBLIOGRAFÍA.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Preparación del sistema hidropónico de jarra de Leonard.	10
Figura 2. Siembra de las semillas de la cebada y trigo en jarra de Leonard.	12
Figura 3. Respuesta de la cebada a nivel de plántula a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> en su altura de planta.	15
Figura 4. Respuesta de la cebada a nivel de plántula a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> en su longitud radical.	16
Figura 5. Respuesta de la cebada a nivel de plántula a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> en su biomasa.	17
Figura 6. Respuesta de la cebada a nivel de floración a la inoculación con <i>Burkholderia</i> ssp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> en su altura de planta.	19
Figura 7. Respuesta de la cebada a nivel de floración a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> en su longitud radical.	20
Figura 8. Respuesta de la cebada a nivel de floración a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> en su biomasa.	21
Figura 9. Respuesta de la trigo a nivel de plántula a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> en su altura de planta.	22
Figura 10. Respuesta de la trigo a nivel de plántula a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> en su longitud radical.	23
Figura 11. Respuesta del trigo a nivel de plántula a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> en su biomasa.	24
Figura 12. Respuesta del trigo a nivel de floración a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> en su altura de planta.	25
Figura 13. Respuesta del trigo a nivel de floración a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> en su longitud radical.	26
Figura 14. Respuesta del trigo a nivel de floración a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> en biomasa.	27
Figura 15. Morfología colonial de <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> crecido en agar LGI 72h/30°C.	28
Figura 16. Observación microscópica a 100X de <i>Gluconacetobacter</i> sp. <i>PGM-3</i> , bacilo Gram negativo, aislado de caña de azúcar crecida en agar LGI por 72h/30°C.	28

ÍNDICE DE CUADRO.

Cuadro 1. Diseño experimental para analizar la respuesta de la cebada y trigo a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> y aislado <i>PGM-3</i>	11
Cuadro 2. Perfil bioquímico de <i>Gluconacetobacter</i> sp. aislada de caña de azúcar y <i>Gluconacetobacter</i> sp. reportada en la bibliografía.....	29
Cuadro 3. Datos crudos de la respuesta de la cebada a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. y <i>Gluconacetobacter</i> sp. a nivel de plántula.	¡Error! Marcador no definido.
Cuadro 4. Datos crudos de la respuesta de la cebada a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. y <i>Gluconacetobacter</i> sp. a nivel de floración.	¡Error! Marcador no definido.
Cuadro 5. Datos crudos de la respuesta del trigo a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. y <i>Gluconacetobacter</i> sp. a nivel de plántula.	¡Error! Marcador no definido.
Cuadro 6. Datos crudos de la respuesta del trigo a la inoculación con <i>Burkholderia</i> sp. y <i>Gluconacetobacter</i> sp. a nivel de floración.	¡Error! Marcador no definido.

TABLA DE ACRONIMOS

	Acrónimo	Significado
1.	AP	Altura de la planta
2.	BPCV	Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal
4.	CA	Control Absoluto
3.	CR	Control Relativo
4.	FN	Fertilizante Nitrogenado
5.	LR	Longitud Radical
6.	N	Nitrógeno
7.	PCAT	<i>Pseudomona cepacia</i> acida azaleico y tryptamina
8.	PET	Tereftalato de polietileno
9.	PFT	Peso Fresco Total
10.	PSA	Peso Seco Aéreo
11.	PSR	Peso Seco Radical
12.	PST	Peso seco Total
13.	SM	Solución Mineral
14.	SMC	Solución Mineral Completa
15.	SPCV	Sustancias Promotoras del Crecimiento Vegetal

1. Resumen.

La cebada y trigo son gramíneas que contribuyen a la dieta de los seres humanos y diversos animales. Su demanda requiere la aplicación de fertilizante nitrogenado (FN); sin embargo su uso excesivo podría causar pérdidas en la producción. Una alternativa para regular el uso de FN en cebada y trigo es la inoculación de estos granos con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), tales como los géneros endófitos *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp. que al vivir dentro de los tejidos vegetales, aumentan la absorción radical de minerales e inducen la síntesis de fitohormonas que promueven el crecimiento vegetal. La hipótesis de esta investigación fue que el aislamiento de *Gluconacetobacter* sp. de caña de azúcar y su inoculación junto con *Burkholderia* sp., mostrarían beneficios en el crecimiento de la cebada y trigo a dosis reducida de FN. El objetivo de este trabajo fue aislar *Gluconacetobacter* sp. de caña de azúcar y analizar su efecto de inoculación con *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp. en cebada y trigo. Las variables respuestas medidas fueron la fenología: altura de la planta, longitud radical y biomasa: peso fresco y seco de parte aérea y radical a nivel fisiológico de plántula y floración. Los resultados indicaron que la cebada tuvo una respuesta positiva a la inoculación con *Burkholderia* sp. con un peso seco total (PST) de 0.63g y una altura de plata (AP) 43.38 cm ambos valores estadísticamente diferentes significativos al PST de 0.57g y 38.02 de AP cm de la misma gramínea usada como control relativo (CR) alimentado con solución mineral completa (SMC). En la floración la cebada tratada con *Burkholderia* sp. alcanzo 3.41g de PST y 56.22 cm de AP estos valores fueron estadísticamente diferentes significativos a 1.42g de PST y 50.7 cm de AP de la misma gramínea usado como CR. Mientras que la cebada inoculada con *Gluconacetobacter* sp. y la coinoculada alcanzo 2.7g de PST valor estadísticamente diferente significativo a 1.42g de PST de su mismo cereal usado como

CR; en contraste la cebada coinoculada tuvo 57.15 cm de AP estadísticamente superior significativo a 50.7 cm de AP del mismo cereal usado como CR. El trigo a nivel de plántula respondió positivamente a la inoculación con *Burkholderia* sp. de 43.60 cm de AP y 0.61g de PST ambos valores estadísticamente diferentes significativos a los 39.75 cm de AP y 0.53g de PST del mismo cereal usado como CR. El trigo coinoculado tuvo 46 cm de AP valor estadísticamente superior significativo a 39.75 cm de AP del homologo usado como CR. El trigo a nivel de floración respondió positivamente al tratamiento con *Burkholderia* sp., alcanzo 75.56 cm de AP valor estadísticamente diferente significativo a 47.77 cm de AP del homologo usado como CR. La biomasa del trigo coinoculado fue de 4.23g de PST valor estadísticamente superior significativo a 1.13g de PST del mismo cereal usado como CR. Se concluye que la inoculación de cebada y trigo con *Burkholderia* sp y *Gluconacetobacter* sp son una buena opción para su producción a dosis reducida de FN.

Palabras clave: xilema, colonización, rizosfera, sinergismo, biofertilizante.

1.1 Summary

Barley and wheat are grasses that they contribute to the diet of humans and various animals. Your demand requires the application of nitrogen fertilizer (NF); However their overuse could cause losses in production. An alternative to regulate the use of NF in barley and wheat is the inoculation of these beads with plant growth promoting bacteria (PGPB), such as endophytes genera *Burkholderia* sp. and *Gluconacetobacter* sp. to live with in plant tissues, increase the radical absorption of minerals and induce the synthesis of phytohormones that promote plant growth. The hypothesis of this research was that the isolation of *Gluconacetobacter* sp. sugar cane and its inoculation with *Burkholderia* sp., show benefits on the growth of barley and wheat at reduced doses of NF. The objective of this study was to isolate *Gluconacetobacter* sp. sugar cane and analyze its effect of inoculation with *Burkholderia* sp. and *Gluconacetobacter* sp. on barley and wheat. The variables measured responses were Phenology: the plant height, root length and biomass: fresh and dry weight of aerial and radical party at the physiological level of seedling and flowering. The results showed that the barley had a positive response to inoculation with *Burkholderia* sp. with a total dry weight (TDW) of 0.63 g and plant height (PH) 43.38 cm both significant statistically different values to the TDW of 0.57 g and 38.02 cm PH of grass used as a relative control (RC) fed with complete mineral solution (CMS). In bloom barley treated with *Burkholderia* sp. reached 3.41 g of TDW and 56.22 cm PH these values were statistically different significant to 1.42 g of TDW and 50.7 cm of PH of the grass used as RC. While the barley inoculated with *Gluconacetobacter* sp. and the coinoculated reached 2.7 g of TDW significant statistically different value to 1.42 g of TDW from your same cereal used as RC; In contrast coinoculated barley had 57,15 cm of PH significant

statistically superior to 50.7 cm of PH in the same cereal used as RC. Wheat level seedling responded positively to the inoculation with *Burkholderia* sp. from 43.60 cm of PH and 0.61 g of TDW both significant statistically different values to the 39.75 cm of PH and 0.53 g of TDW of the same cereal used as RC. Coinoculated wheat was 46 cm of PH significant statistically superior value to 39.75 cm of PH of the analogue used as RC. Wheat level bloom responded positively to treatment with *Burkholderia* sp., reached 75.56 cm PH significant statistically different value to 47.77 cm of PH of the analogue used as RC. The biomass of coinoculated wheat was 4.23 g of TDW statistically significant higher value to 1.13 g of TDW of the same cereal used as RC. It is concluded that the inoculation of barley and wheat with *Burkholderia* sp. and *Gluconacetobacter* sp. are a good choice for your production at reduced doses of FN.

Key words: xylem, colonization, rhizosphere, synergism and biofertilizers.

2. Introducción

Las gramíneas son herbáceas y la cuarta familia con mayor riqueza de especies luego de las orquídeas y las leguminosas. El consumo representa un porcentaje elevado en la alimentación de los países en vías de desarrollo; como la cebada y trigo. En México los estados productores de cebada son: Hidalgo, Tlaxcala y Puebla (Contreras-López., *et al* 2008). Mientras que la producción anual de trigo es de 700,000 ha, donde los principales estados son: Sonora, Baja California, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Tlaxcala, Sinaloa, Hidalgo y Puebla (Villaseñor y Espitia, 2000). Pero en los últimos años se ha observado que esa producción ha disminuido debido a un factor: el agotamiento de la fertilidad del suelo agrícola (Contreras-López., *et al* 2008); consecuencia de la aplicación en exceso de fertilizante nitrogenado (FN) que provoca su empobrecimiento, además de un alto gasto económico y contaminación ambiental (Palafox-Caballero *et al.*, 2005).

El aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) endófitas y su ulterior inoculación en cebada y trigo, es una alternativa para la reducción de altas dosis de FN y asegurar un crecimiento vegetal benéfico.

En producción de cebada y trigo es necesaria la optimización del FN, para ello una opción de regularlo es la inoculación de sus semillas con BPCV endófitas que al colonizar el interior, les ayuda a su crecimiento (James, 2000), esta es una ventaja importante a la competencia por minerales esenciales en la rizosfera debido a la diversidad y aumento de microorganismos en esta área, mientras que en los endófitos tienen mayor disponibilidad de nutrientes en el interior y mínima competencia con otros tipos relacionados como sucede en el ambiente natural (James, 2000).

Uno de esos géneros endófitas es *Burkholderia* sp. que coloniza la zona radical, ejerce un efecto positivo en gramíneas, al ser atraído por los exudados radicales de la cebada y el trigo de los: carbohidratos, ácidos orgánicos (Chelius *et al.*, 2000), los que utiliza como fuente de Carbono (C) y energía, que los transforman en sustancias promotoras del crecimiento vegetal (SPCV) (Sánchez-Yáñez *et al.*, 2006), y en consecuencia induce la proliferación de raíz y aumenta la absorción del FN a dosis reducidas de lo recomendado para estos cultivos vegetales (Riggs *et al.*, 2001).

Otro género de BPCV es *Gluconacetobacter* sp. tiene potencial en la agronomía en caña de azúcar (Youssef *et al.*, 2004) por lo que está demostrado que su inoculación en gramíneas (Sevilla *et al.*, 2001) tiene un efecto positivo en su crecimiento mediado por SCPV (Muñoz-Rojas *et al.*, 2005). Por ser endófito tiene ventaja sobre los géneros de BPCV que solo viven en el exterior de la raíces vegetales, además de la protección de condiciones adversas del ambiente, lo que facilita su acción benéfica en la planta (Muñoz-Rojas *et al.*, 2003).

3. Antecedentes

En la agricultura la falta de regulación en la aplicación de FN al suelo, causa un problema, con pérdida de su fertilidad, eleva el costo de los insumos involucrados y provoca la contaminación del ambiente; existe una opción para regular y optimizar el empleo del FN como: las BPCV endófitas que hacen posible el crecimiento de cebada y el trigo.

El género *Burkholderia* pertenecía al género *Pseudomonas*, por análisis de ADN ribosomal 16S se separó y se establece un nuevo género llamado *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.*, 1992), que ahora incluye especies como *Burkholderia cepacia*, *B. vietnamiensis*, *B. ambifaria*, *B. andropoginis*, *B. anthina*, *B. caledonica*, *B. caribensis*, *B. caryophylli*, *B.*

cenocepacia, *B. fungorum*, *B. mallei*, *B. multivorans*, *B. pseudomallei*, *B. pickettii*, *B. thailandensis*, *B. solanacearum*, *B. stabilis*, *B. xenovorans* y *B. glumae*.

Por otro lado en la literatura no existe información sobre la inoculación de la cebada con *Burkholderia* sp.; mientras que este endófito si existe en otras gramíneas de importancia económica.

En el trigo se reporta su respuesta positiva a la inoculación con *Pseudomonas*, en el caso de caña de azúcar se reporta que se inocula con *Gluconacetobacter* sp., al igual que con *Herbaspirillum seropedicae* y con *Azospirillum brasilense* (Reis *et al.*, 1990; Döbereiner *et al.*, 1993), en género bacteriano que ayudan a su crecimiento a dosis regulada de FN.

Plana *et al.*, 1999, evaluaron la respuesta del trigo (*Triticum aestivum* L.) a la inoculación individual con *Burkholderia cepacia* y *Azospirillum brasilense*. Con un diseño experimental de 4 tratamientos: trigo tratado con FN a dosis recomendada: 110 Kg de N/ha en forma de urea usado como control relativo (CR), trigo inoculado con *B. cepacia* + 45 kg de N/ha, trigo con *A. brasilense* + 45 kg de N/ha y el irrigado con agua usado como control absoluto (CA). Los resultados mostraron que el trigo respondió positivamente a la inoculación con *Azospirillum* sp con un rendimiento de 2.37 t.ha⁻¹, en tanto que con *B. cepacia* alcanzó 2 t.ha⁻¹, ambos valores estadísticamente diferentes significativos a 1.85 t.ha⁻¹ de su homólogo usado como CR.

García-González *et al.*, 2005. Determinaron la respuesta positiva del trigo a la inoculación con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii* a dosis reducida a 50% de FN. Con un diseño experimental con 6 tratamientos y 4 repeticiones cada uno: a) trigo sin inocular y 160 kg de NH₄NO₃/ha, en forma de urea usado como control relativo; b) trigo con *A. lipoferum* y 50% de FN como urea c) trigo con *A. brasilense* y 50% de FN como urea; d)

trigo con la mezcla de las dos especies de *Azospirillum* y 50% de FN como urea; e) trigo con *Az. beijerinckii* con 50% de FN como urea y f) trigo sin inocular usado como control absoluto. Los resultados mostraron que el trigo inoculado con *Azospirillum* spp. alcanzo 10 cm de AP; 8.8g de PF y 7.6g de PS a los 30 días posterior a la siembra, valores estadísticamente diferentes y significativos a: los 7.8 cm de AP; 5.5g de PF y 5g de PS de su homologo usado con CR.

García-Reyna *et al.*, 2005 evaluaron la respuesta del maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con *Burkholderia* sp. a dosis FN reducidas al 50%. Con un diseño experimental donde: gramínea inoculada con *Burkholderia* sp. y con su homólogo sin inocular usado como CR, con 5 repeticiones. Los resultados mostraron que la gramínea con *Burkholderia* sp. alcanzó una altura de 47%, con un número mayor de hojas en un 25%, así como un aumento del grosor del tallo en un 15%, comparado con el 35 % en altura, con el 20 % en el número de hojas, y el 15% en el grosor del tallo de su homologo sin inocular usado como CR, con la dosis del FN recomendado.

Plata-Guzmán *et al.*, 2006, analizaron el aislamiento de teocintle e inoculación de *Burkholderia* sp. en maíz. Con un diseño experimental: maíz con *Burkholderia* sp., maíz sin inocular usado como CA, y maíz sin inocular con urea al 100% usado como CR. Los resultados indicaron un efecto positivo de la inoculación con *Burkholderia* sp. en el maíz, que incremento su peso seco de raíz en 40% y 30% en el peso seco aéreo, ambos valores estadísticos diferentes significativos comparados con su homólogo usado como CR.

Mora y Toro en un trabajo publicado en el 2007 evaluaron la respuesta del maíz inoculado con *Burkholderia* sp. endófito, a nivel de campo. Bajo un diseño experimental en donde la gramínea se inoculo con *Burkholderia* sp. y el mismo cereal sin inocular empleado como

CR con 5 repeticiones. Los resultados mostraron que: el maíz tratado con *Burkholderia* sp. incremento en un 47% su peso seco de su raíz y en un 57% en la extensión del tallo, comparados con su homólogo usado como CR, con un 35% de peso seco radical y un 50% en su extensión del tallo, ambos valores fueron estadísticamente diferentes, a favor de la inoculación de maíz con *Burkholderia* sp.

Muthukumarasamy *et al.*, 2007 aislaron e identificaron bacterias diazotróficas del arroz (*Oryza sativa* L) y su posterior inoculación. Con un diseño experimental, aislamiento de suelo rizosféricas, raíz y vástago; identificación por pruebas bioquímicas y 16s rDNA; inoculación de arroz con bacterias diazotróficas y arroz sin inocular usado como CR. Los resultados mostraron el aislamiento; *A. amazonense*, *Herbaspirillum* sp., *Burkholderia* sp., *G. diazotrophicus*, *Pseudomonas* sp. y *B. vietnamiensis*; el arroz respondió positivamente a la inoculación con *Burkholderia* sp. que causo un PST de 6g y *G. diazotrophicus* con un PST de 6.3g estadísticamente superiores y significativos a 4.9g del PST del homologo usado como CR.

Naiman *et al.*, 2009, evaluaron el efecto de la inoculación de *A. brasilense* y *P. fluorescens* en trigo. Con un diseño experimental de 3 tratamientos: trigo control (sin inocular), trigo con *A. brasilense* y trigo inoculado con *P. fluorescens*. Los resultados mostraron que el trigo con *A. brasilense* tuvo 9500 Kg ha⁻¹ de PSA y 60000 Kg ha⁻¹ de PSR, mientras que el trigo con *P. fluorescens* alcanzo 9250 Kg ha⁻¹ PSA y 45000 Kg ha⁻¹ de PSR, valores estadísticos significativos a los 7900 Kg ha⁻¹ de PSA y los 30000 Kg ha⁻¹ PSR de su homologo usado como CA.

Rosas *et al.*, 2009, evaluaron la eficacia de la inoculación con *Pseudomona aurantiaca* en trigo y maíz en campo. Con un diseño experimental: 1) semilla inoculada con *P. aurantiaca* en el suelo sin fertilizar, 2) semillas con *P. aurantiaca* en el suelo con 40 kg ha⁻¹ de urea-30 kg ha⁻¹ de fosfato diamónico, 3. semilla no inoculada en el suelo con 40 kg ha⁻¹ de urea-30 kg ha⁻¹ de fosfato diamónico usado como CR, 4. semilla sin inocular en el suelo no fertilizado usado como CA. Los resultados mostraron que el trigo tratado con *P. aurantiaca* en el suelo fertilizado tuvo 262 g de PSA y 156 mg de PSR valores estadísticos superiores a los 228 g de PSA y los 146 mg de PSR de su homologo usado como CR.

Piccinin *et al.*, 2013, evaluaron la eficacia de la inoculación de trigo con *Azospirillum brasilense*. El experimento se realizó con 18 tratamientos que consistieron en la aplicación o ausencia de inoculación de la semilla con *A. brasilense* en 2 forma: líquida y turba, con tres dosis de fertilizante nitrogenado: 0, 50 y 100 kg ha⁻¹ de N y dos dosis de biorregulador: 0 y 250 mL ha⁻¹. Los resultados mostraron que *A. brasilense*, a dosis de FN al 50% alcanzo un rendimiento de trigo de 2522,8 kg ha⁻¹ valor estadístico diferente significativo a 2435,5 kg ha⁻¹ de rendimiento de su homologo usado como CR con el FN al 100%.

4. Hipótesis.

El aislamiento de *Gluconacetobacter* sp. y su coinoculación con *Burkholderia* sp. en plantas de cebada y trigo muestran beneficios en el crecimiento a dosis reducida de FN.

5. Objetivos generales.

Aislar una cepa de *Gluconacetobacter* sp. de caña de azúcar y analizar su efecto con la coinoculación de *Burkholderia* sp. en plantas de cebada y trigo.

5.1 Objetivo específico.

- a) Evaluar el efecto de la coinoculación de *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp. en cebada y trigo a dosis reducida al 50% de FN.

6. Materiales y métodos

6.1 Origen y aislamiento de *Gluconacetobacter* sp.

El aislado PGM-3 se obtuvo a partir de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), para ello se cortó un entrenudo de 16-10 cm para facilitar su manipulación, se lavó con detergente (La Corona[®]) 1% (p/v) y se enjuagó con agua potable, se desinfectó con Hipoclorito de sodio (Clorox[®]) 5% (p/v)/10 min, se enjuagó 6 veces con agua potable estéril; se desinfectó con Alcohol al 70% (v/v)/10 min, de nuevo se enjuagó 6 veces con agua potable estéril; luego el entrenudo se colocó en papel Aluminio estéril, para retirar la cascara con cuchillo desinfectado con Hipoclorito de sodio (Clorox[®]) y Alcohol (Dibut *et al.*, 2005). Después se tomó 5 cm del entrenudo y se cortó en cuatro partes para dejar expuesto el xilema de la caña (sitio de ubicación de *Gluconacetobacter* sp.); luego en mortero estéril, el entrenudo se maceró con 5.0 mL solución salina (NaCl) 0.85% (p/v) y detergente (La Corona[®]) al 10% (p/v) para extraer el jugo de la caña, del cual se tomaron 0.5 mL para inocular el caldo LGI con la siguiente fórmula g/L: sacarosa 100.0; K₂HPO₅ 2.0; KH₂PO₄ 2.0; NaCl 1.0; MgSO₄ 3.0; extracto de levadura 1.0; azul de bromotimol al 2 % (p/v) 10 mL/L (Cavalcante y Dobereiner, 1988) y 10 mL/L de la solución de oligoelementos con la siguiente composición (g/L): H₃BO₄ 2.86; ZnSO₄ 0.22; MnCl₂ 1.81; K₂MnO₄ 0.09 (Sánchez-Yáñez 2007), el pH se ajustó a 6.0 con ácido acético al 2 % (v/v); el caldo LGI se incubó a 32°C/24 h (Dibut *et al.*, 2005); como probable crecimiento positivo sospechoso de *Gluconacetobacter* sp. se detectó la turbidez y viraje de verde a amarillo en el caldo LGI; se realizó tinción Gram para observar un bacilo corto Gram negativo; luego se sembró en agar LGI (misma fórmula con adición de 18 g/L de agar bacteriológico) para su purificación, se incubó a 32°C/24-48 h; de nuevo al Gram se detectó

un bacilo corto Gram negativo (Sánchez-Yáñez 2007), el aislado PGM-3 se cosecho con 5.0 mL solución salina (NaCl) 0.85% (p/v) y detergente al 1% (p/v) (La Corona[®]) y luego para su conservación en silosil estéril e incluso para su inoculación en cebada y trigo de acuerdo con el cuadro 1.

6.2 Activación de *Burkholderia sp. Leu 33*

En la colección de bacterias promotoras del crecimiento vegetal del Laboratorio de Microbiología Ambiental, del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH se obtuvo la cepa de *Burkholderia sp. Leu 33* la que se activó en caldo *Pseudomona cepacia* acida azaleico y tryptamina (PCAT) con la siguiente composición química g/L: MgSO₄ 0.1; ácido azaleico 2.0; tryptamine 0.4; K₂HPO₄ 4.0; KH₂PO₄ 4.0; extracto de levadura 0.02; el pH se ajustó a 5.7 con acida acético 2% v/v; el caldo PCAT se incubo a 30°C/24 h, al aparecer la turbidez en este caldo se realizó la tinción Gram y en el microscopio se detectó un bacilo corto Gram negativo (Sánchez-Yáñez *et al.*, 2007), para comprobar su pureza se sembró en agar PCAT (misma composición química con 18g/L de agra bacteriológico), donde se incubo a 30°C/24-48 h y de nuevo con tinción Gram se observó un bacilo corto Gram negativo (Sánchez-Yáñez 2007); *Burkholderia sp. Lue 33* se inoculo en cebada y trigo de acuerdo al cuadro 1.

6.3 Solarización del suelo.

Se solarizaron 60 Kg de suelo laterítico sódico pobre en materia orgánica y N mineral, por acción del calor para eliminación de fitopatógenos, plagas y enfermedades. El suelo se colocó sobre un plástico obscuro y se tapó con otro negro, el día siguiente, se rego con agua potable y se tapó de nuevo con el plástico negro y el tercer día, se destapo y uso el suelo para el llenado de las jarras de Leonard (Ramírez y Sáinz, 1995).

6.4 Preparación del sistema hidropónico de Jarra de Leonard.

El experimento para medir la respuesta de la cebada y trigo a la inoculación con *Burkholderia* sp. y el aislado *PGM-3*, en invernadero se realizó en el sistema hidropónico de jarras de Leonard constituido por la parte inferior de botella de PET, que contenía la solución mineral completa al 100% de N en forma de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, como se muestra en la figura 1 con la siguiente composición g/L: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 12.0; KH_2PO_4 3.0; K_2HPO_4 3.5; MgSO_4 1.5; CaCl_2 0.1; FeSO_4 0.5 mL y 1.5 mL/L de solución de oligoelementos con la siguiente composición química (g/L): H_3BO_3 2.86; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22; $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.81; K_2MnO_4 0.09 (Sánchez-Yáñez, 2007) con un pH ajustado 6.8-7.0 con ácido acético 2% (v/v), que alimento a la cebada y/o trigo, en la parte superior de la botella de PET se colocó 1.5 kg de suelo agrícola (figura 1b) pobre en materia, conectado con algodón según figura 1c para la alimentación por capilaridad del contenedor con SMC al suelo como se muestra en la figura 1 (Luna y Sánchez-Yáñez, 1995).

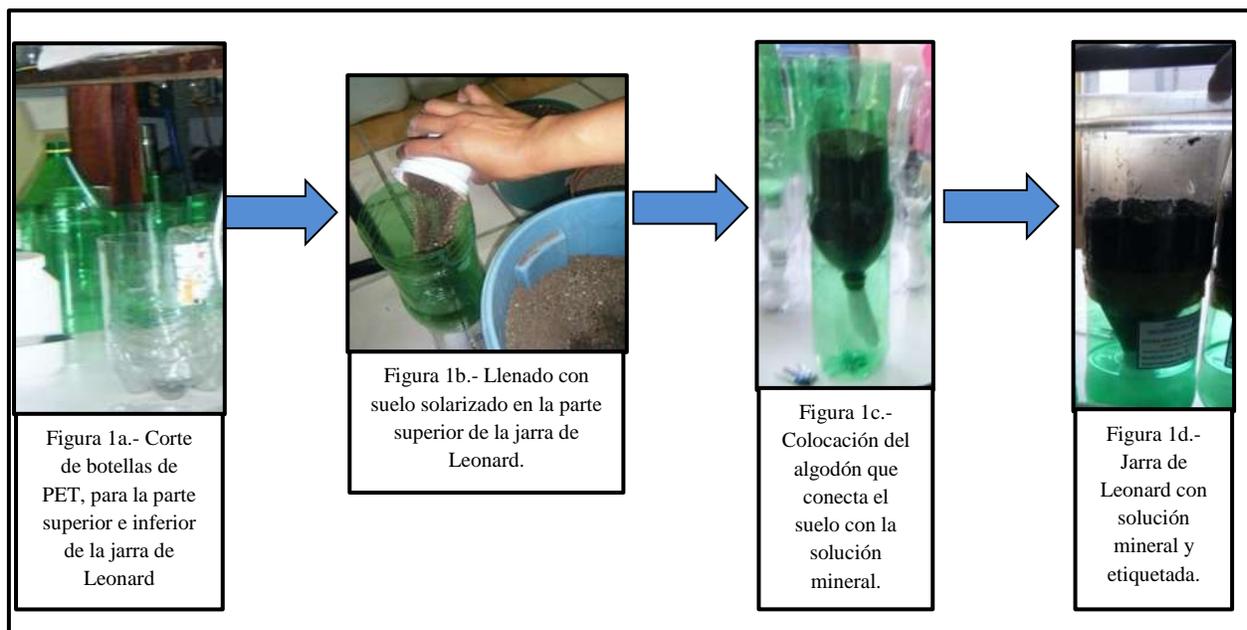


Figura 1. Preparación del sistema hidropónico de jarra de Leonard.

El diseño experimental para analizar la respuesta de la cebada y trigo a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y aislado *PGM-3* se muestra en el cuadro 1 en el cual se señalan todos los tratamientos:

Cuadro 1 Diseño experimental para analizar la respuesta de la cebada y trigo a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y aislado *PGM-3*.

Tratamiento	Trigo	Cebada	Solución Mineral	Irrigación con agua
Control Absoluto	+	+	-	+
Control Relativo	+	+	+ 100% de N en forma de (NH ₄)SO ₄	-
<i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i>	+	+	+ 50% N en forma de (NH ₄)SO ₄	-
Aislado <i>PGM-3</i>	+	+	+ 50% N en forma de (NH ₄)SO ₄	-
<i>Burkholderia</i> sp. <i>Leu 33</i> + Aislado <i>PGM-3</i>	+	+	+ 50% N en forma de (NH ₄)SO ₄	-

Se aplicó (+)

No se aplicó (-)

En el cuadro 1 se muestra todos los tratamientos que se realizaron en el experimento; 1) la cebada y trigo usado como control absoluto, irrigo con agua potable, 2) cebada y trigo usado como control relativo, alimentado con solución mineral (SM) al 100% de N en forma de (NH₄)SO₄, 3) cebada y trigo con *Burkholderia* sp. *Leu 33*, alimentado con SM al 50% de N en forma de (NH₄)SO₄, 4) cebada y trigo con aislado *PGM-3*, alimentado con SM al 50% de N en forma de (NH₄)SO₄, 5) cebada y trigo coinoculado con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y con aislado *PGM-3*, alimentado con SM al 50% de N en forma de (NH₄)SO₄.

6.5 Inoculación de la semilla de cebada y trigo con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y aislado *PGM-3*.

Para ello se desinfecto las semillas de cebada y trigo, se sumergieron con Hipoclorito de Sodio (Clorox[®]) 5% (p/v)/5 min, se enjuagaron 5 veces con agua potable estéril, se sumergieron con Alcohol 70%/5 min, se enjuagaron 5 veces con agua potable estéril; entonces 30 semillas se depositó en una bolsa (250g) de plástico, ahí se inocularon 3.0 mL de cultivo con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y del aislado *PGM-3*; la bolsa se agito vigorosamente/20 min (Sánchez-Yáñez *et al.*, 2007) de acuerdo al cuadro 1. Por cada tratamiento se realizaron 5 repeticiones de jarra de Leonard. En la parte superior de la jarra de Leonard donde se encuentra el suelo, se humedeció con agua potable y se sembraron 4 semillas inoculadas como se muestra en la figura 2a en el solárium; se cubrió las jarras de Leonard que permanecieron en oscuridad hasta la germinación de la semilla, posteriormente las plantas se expusieron a la luz en invernadero (Plata-Guzmán *et al.*, 2006).



Figura 2. Siembra de las semillas de la cebada y trigo en jarra de Leonard.

6.6 Variables respuesta para analizar el efecto de inoculación de *Burkholderia sp. Leu 33* y aislado *PGM-3* en cebada y trigo.

El efecto de la inoculación de ambas BPCV, se analizó a nivel de plántula a los 32 días después de la siembra y en floración a los 62 días, para cebada y trigo; en ambas etapas se midió con una regla graduada para la fenotípica: altura de planta (AP) y longitud radical (LR). La biomasa: peso fresco total (PFT) y peso seco total (PST), en el cual se colocó la cebada y trigo en horno a 70°C/48h (García-González *et al.*, 2005).

6.7 Análisis estadístico de resultados.

El análisis estadístico de la respuesta de la cebada y trigo a la inoculación y coinoculación con *Burkholderia sp. Leu 33* y aislado *PGM-3*, se realizó por el método de Tukey (García *et al.*, 2001).

6.8 Identificación de la BPCV endófito de la caña de azúcar.

Se identificó el aislado *PGM-3* mediante API20NE, un sistema de identificación para géneros de bacilos Gram negativos, que consta de 21 pruebas bioquímicas: reducción de nitrato, triptófano, fermentación de glucosa, arginina dehidrolasa, ureasa, hidrólisis de esculina, gelatinasa, β -galactosidasa, D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, D-manitol, N-acetil-D-glucosamina, maltosa, D-gluconato, caprato, adipato, L-malato, citrato, fenilacetato. Para lo cual se sembró el aislado *PGM-3* en caldo LGI. Se tomó una asada del tubos/cajas de *PGM-3* y se suspendió en 5.0 mL de solución salina. El tubo se agito a 200 rpm/48 h. Posteriormente se tomó 0.1 mL de la suspensión de solución salina del aislado *PGM-3* y se inoculo los microtubos de API20NE, en sistema API20NE se incubo a 32°C/48 h (Salazar *et al.*, 2008).

6.9 Conservación de BPCV

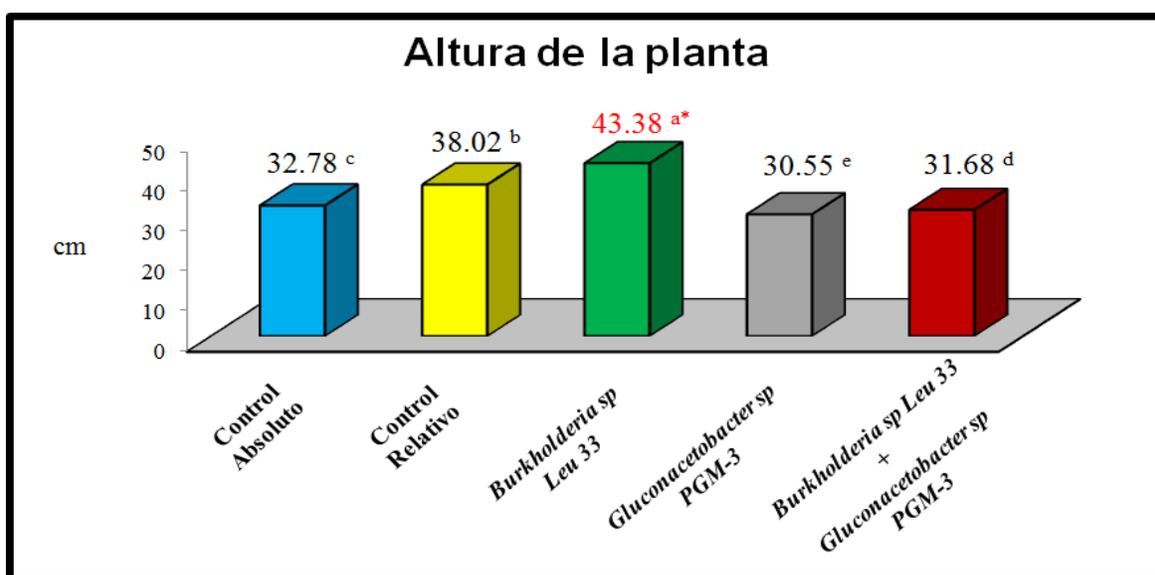
El aislado *PGM-3* y *Burkholderia* sp. *Leu 33* se conservaron en silosil; para ello se usó 1mL de la suspensión de cada cepa pura, cultivadas previamente en LGI y PCAT; para 1g de silosil estéril, con tres repeticiones y se conservan para la colección de BPCV del laboratorio de microbiología ambiental del Instituto de investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH (Sánchez-Yáñez *et al.*, 2007).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Respuesta de la cebada a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* a nivel de plántula.

En el figura 3 se observa la respuesta positiva de la cebada a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* que causo aumento en su AP con 43.38 cm, un valor estadístico diferente y significativo a los 38.02 cm de la AP de su homóloga usada como CR y de la misma gramínea empleado como CA con una AP de 32.78 cm; lo que sugiere, que algunos ácidos orgánicos y aminoácidos excretados por la raíz de la cebada *Burkholderia* sp. *Leu 33* los transformo en SPCV; como una auxina lo que le permitió tener un desarrollo en el sistema meristemo apical del tallo de la gramínea, a pesar de la reducir al 50% del FN, para su crecimiento, lo que impacto en su AP de la cebada mostrado con los resultados obtenidos. Datos similares fueron reportados por García-Reyna *et al.*, 2005 en maíz tratado con *Burkholderia* sp. al disminuir la dosis de FN donde alcanzó una AP de 47% estadísticamente superior y significativo al 35% de AP de su homologado utilizado como CR.

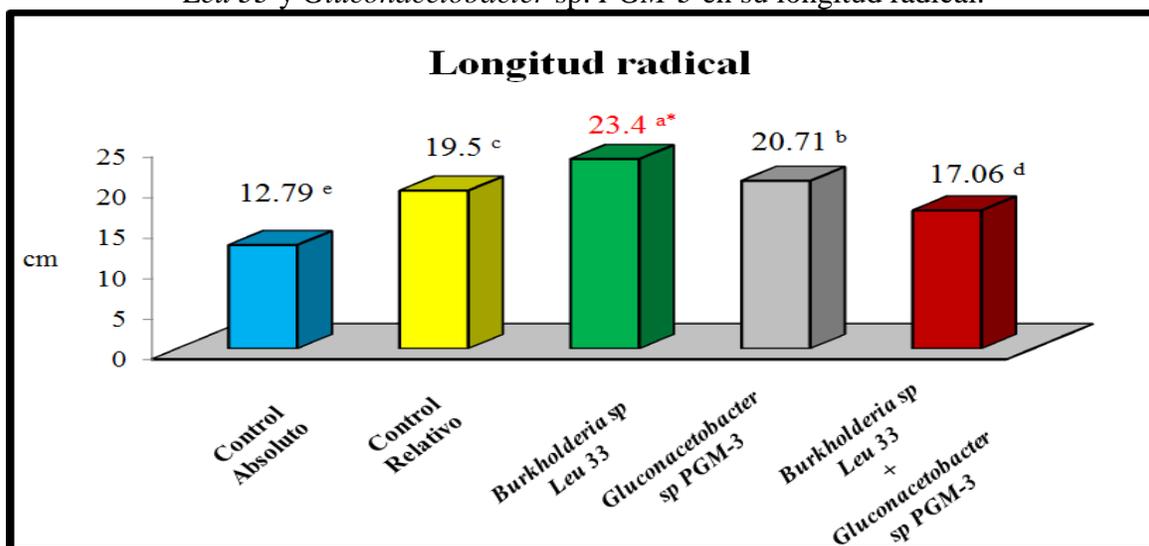
Figura 3. Respuesta de la cebada a nivel de plántula a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* en su altura de planta.



*Letras distintas con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) según Tukey.

En la figura 4 se muestra la respuesta de la cebada a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3*, así como sus homólogos sin inocular, usados como CR alimentado con SMC y el empleado como CA irrigado con agua, en donde se observó que la cebada con *Burkholderia* sp. *Leu 33*; incremento su LR en 23.4 cm, valor estadísticamente diferente significativo a los 19.5 cm de LR de la misma gramínea usada como CR y 12.79 cm de su homóloga empleado como CA, lo anterior sugiere que en el caso de la inoculación de la cebada con *Burkholderia* sp. *Leu 33* transformo los exudados radicales en SPCV, lo que causó una mayor proliferación de raíces secundarias, en consecuencia mayor absorción del FN, a pesar de una dosis al 50% de FN. Análogo a lo reportado a la respuesta positiva del maíz a la inoculación con *Burkholderia* sp. (Riggs *et al.*, 2001) en donde se observó un efecto favorable de la inoculación mediado por la conversión de exudados radicales en SPCV y por Mora y Toro (2007) en el cual el efecto positivo de la inoculación regulado por SPCV de origen bacteriano, en maíz inoculado con *B. cepacia* que causo 28% de LR en comparación al maíz sin inocular.

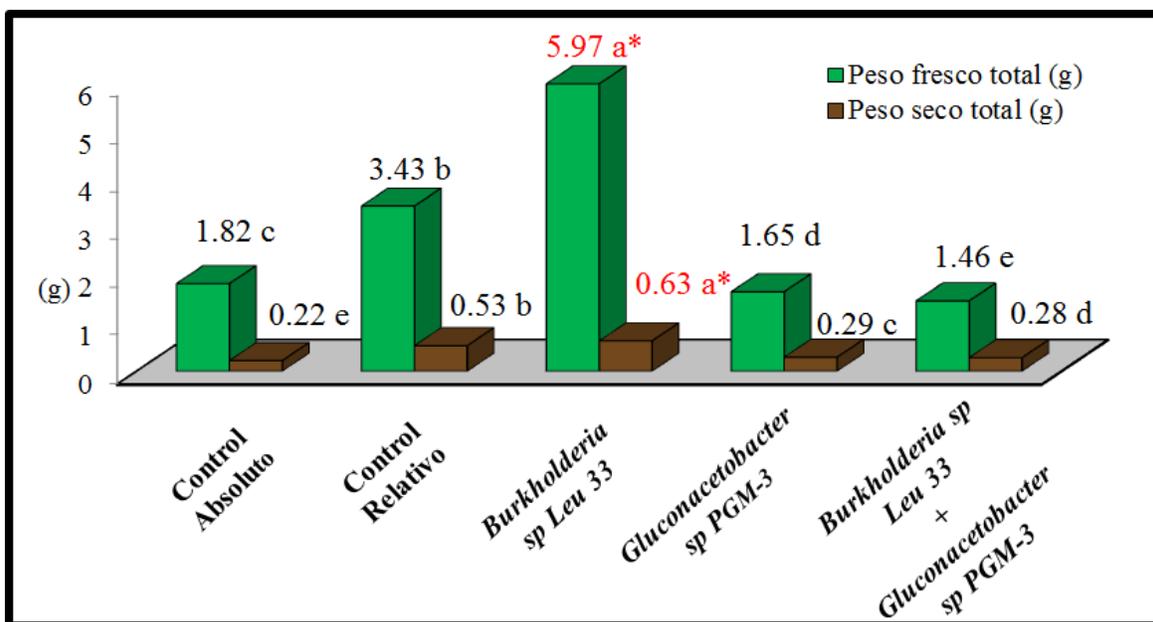
Figura 4. Respuesta de la cebada a nivel de plántula a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* en su longitud radical.



*Letras distintas con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) según Tukey.

En la figura 5 se muestra la respuesta positiva de la cebada a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33*, en su PST con 6.46g y en los 0.63g de PST, ambos valores estadísticos distintos significativo a los 2.99g de PFT y 0.57g de PST de su homologo usado como CR y de la misma gramínea utilizado como CA con 1.82 de PFT y 0.22g de PST, lo que sugiere que la inoculación de la cebada con *Burkholderia* sp. *Leu 33* convirtió los exudados radicales; como aminoácidos en SPCV que promovieron una mayor absorción del FN a dosis 50% menos de los recomendado lo que incremento la longitud radical y numero de raíces secundarias de la gramínea, dado que está probado que *Burkholderia* sp. tiene afinidad por exudados radicales que se transformaron en SPCV, en consecuencia alcanzo una mayor PST, similar a lo reportado por Mora y Toro (2007), donde el maíz inoculado con *B. cepacia*, registro un aumento en su PST a pesar de reducir al 50% la dosis del FN, aplicado en el cual la SPCV producidas por las BPCV fueron la razón de la respuesta positiva de la gramínea.

Figura 5. Respuesta de la cebada a nivel de plántula a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* en su biomasa.

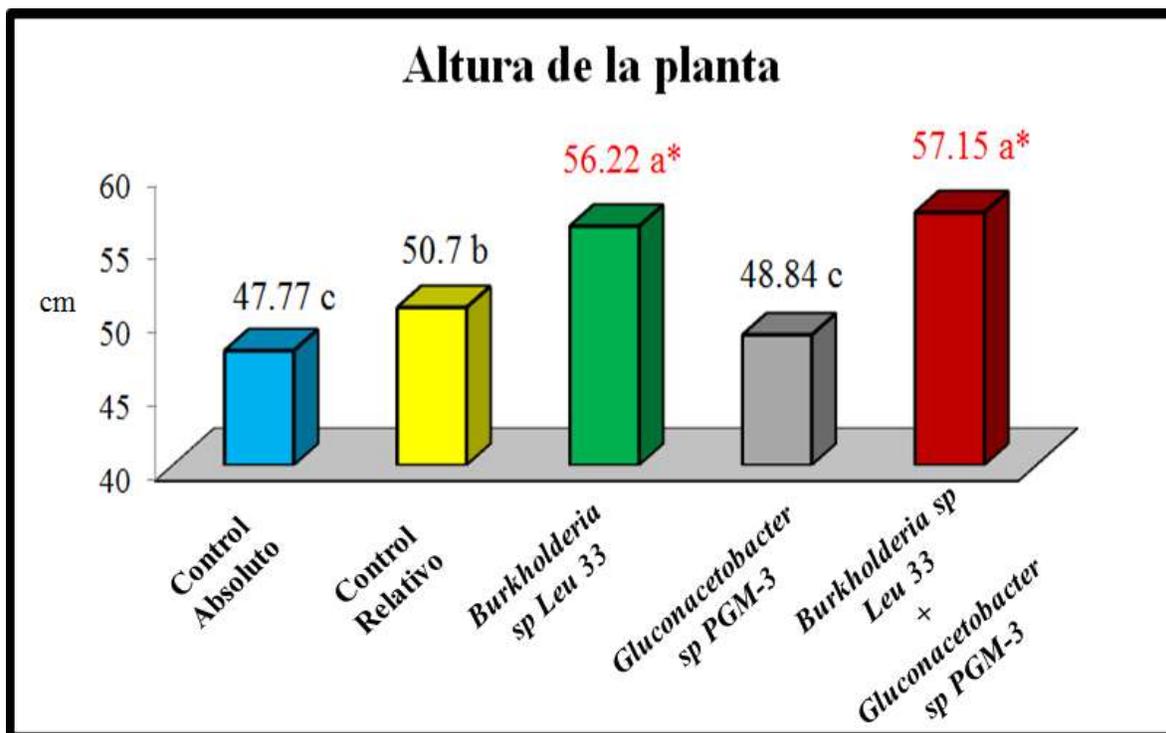


*Letras distintas con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) según Tukey.

7.2 Respuesta de la cebada a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* a nivel de floración.

En la figura 6 se muestra la respuesta positiva de la cebada a la coinoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* que se alimentó a la dosis 50% de FN en forma de $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, la inoculación mixta incremento la AP con 57.15 cm, un valor estadístico diferente y significativo a los 50.7 cm de AP de su homóloga usada como CR con SMC equivalente a la dosis de FN al 100%, además de su misma gramíneas utilizado como CA con una AP de 47.77 cm; lo anterior sugiere que la coinoculación de la cebada con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3*, ambos géneros actuaron de manera sinérgica, al combinar su capacidad metabólica para transformar azúcares y aminoácidos de la raíz de la cebada en SPCV como; auxinas y giberelinas, las que promovieron una mayor y mejor absorción del FN, en consecuencia hubo un incremento en su número de raíces secundarias y longitud de la cebada, lo que impactó favorablemente en su AP. En la literatura revisada no se encontró la respuesta de la cebada a la coinoculación con *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp., por lo cual la coinoculación de ambas BPCV es una innovación para producción de cebada a dosis reducidas.

Figura 6. Respuesta de la cebada a nivel de floración a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* en su altura de planta.

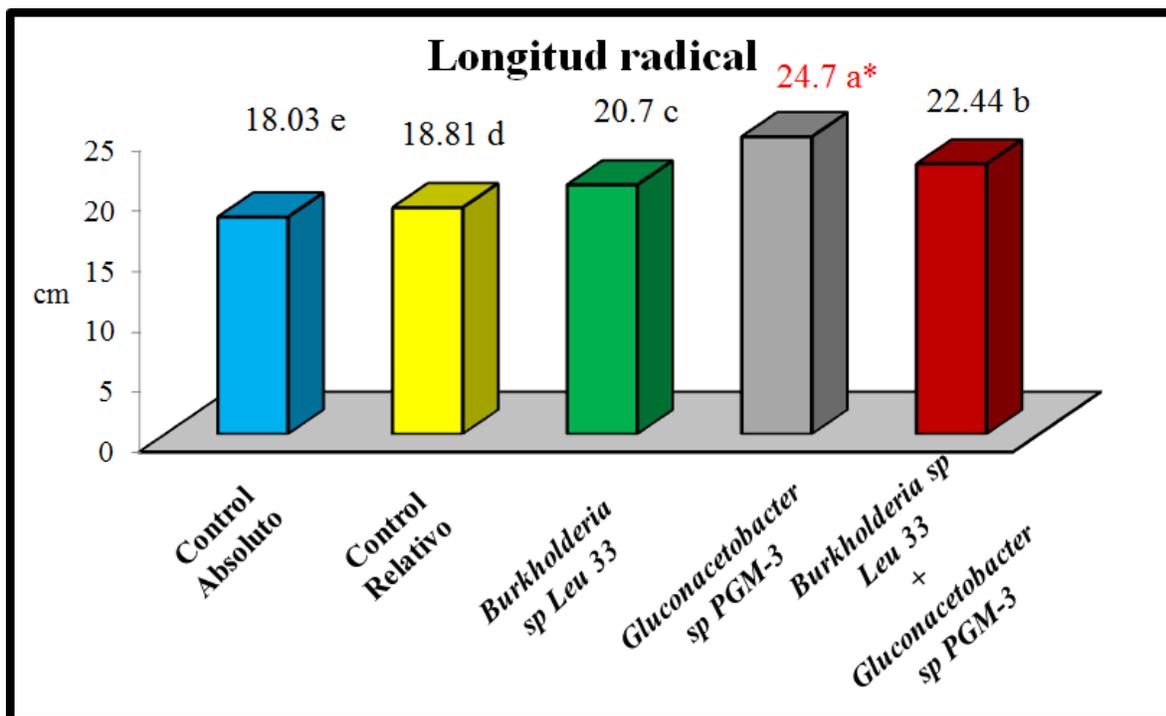


*Letras distintas con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) según Tukey.

En la figura 7 se muestra la respuesta positiva de la cebada a la inoculación con *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* que alcanzo una LR de 24.69 cm, valor estadístico distinto y significativo a los 22.3 cm de LR de su homologo usado como CR con SMC al 100% del FN y de la misma gramínea empleada como CA con una LR de 18.03 cm, lo que se sugiere que la cebada inoculada con *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* tiene la capacidad de penetrar y proliferar en la raíz, con un efecto más directo por encontrarse endófitamente, al utilizar aminoácidos y azúcares presente en la cebada, los que transformo en SPCV (Rojas *et al.*, 2009) a dosis reducida de FN al 50%, reflejado en la proliferación de pelos radicales (Chanway *et al.*, 2000; Bent *et al.*, 2001) y con ello aumentar la área de exploración de los pelos radicales en el suelo para la absorción del FN (Muthukumarasamy *et al.*, 2002), para su crecimiento. Resultados similares fueron reportados por García-González *et al.*, 2005 en

trigo inoculado con el endófito *A. brasilense* que incremento su LR, ambos géneros endófitos nativos de la caña de azúcar.

Figura 7. Respuesta de la cebada a nivel de floración a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* en su longitud radical.

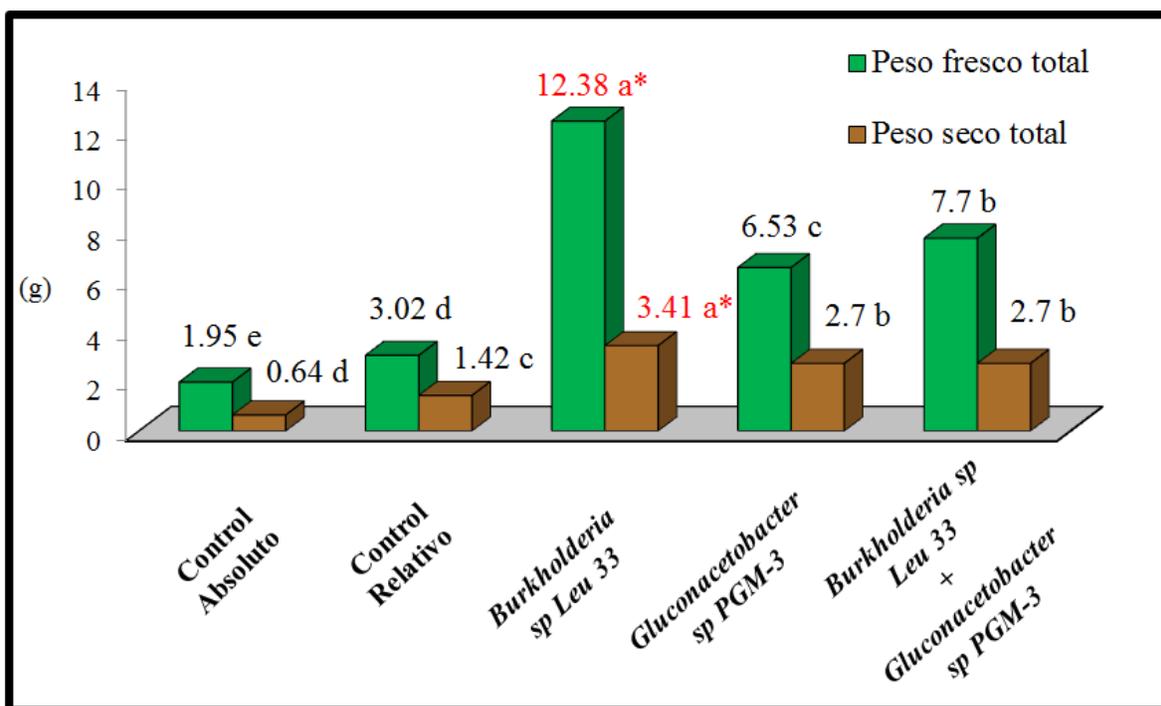


*Letras distintas con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) según Tukey.

En la figura 8 se muestra la respuesta positiva de la cebada a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* con un efecto en su PFT de 12.38 g y 3.41g de PST, valores estadísticos diferentes significativos a los 3.02g de PFT y 1.42g de PST de su homólogo usado como CR con SMC equivalente a dosis de FN al 100%. Lo que se sugiere un efecto positivo de la inoculación de la cebada con *Burkholderia* sp. *Leu 33*, por colonizar la rizosfera de la gramínea, que transformo SPCV a partir de compuestos de carbono y nitrógeno que se generaron durante la fase de crecimiento de la planta (Jacoud *et al.*, 1999), que influyo directamente en su capacidad de absorción del FN (Riggs *et al.*, 2001), para su crecimiento favorable a dosis reducida del FN al 50%, que a su vez hubo un incremento en

la biomasa de la cebada. Resultados similares fueron reportados por Plata-Guzmán *et al.*, 2006, con un efecto positivo a la inoculación con *Burkholderia* sp. en maíz, en donde observaron el efecto positivo de la inoculación por la transformación de SPCV, a partir de los exudados radicales de la gramínea.

Figura 8. Respuesta de la cebada a nivel de floración a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* en su biomasa.



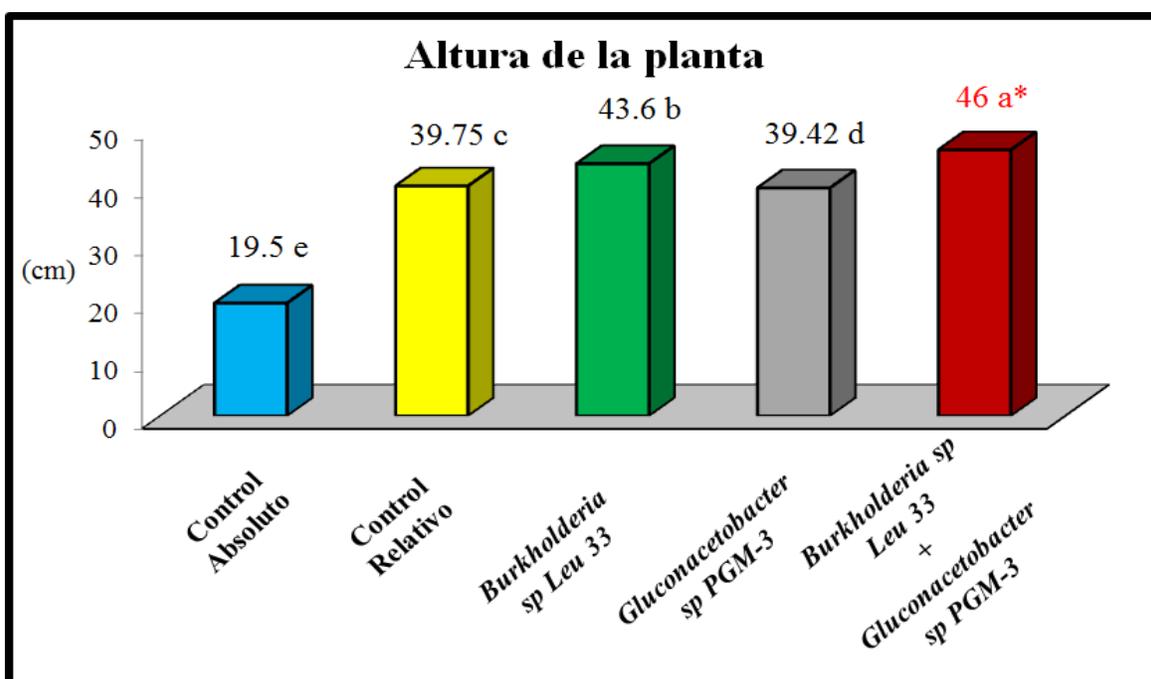
*Letras distintas con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) según Tukey.

7.3 Respuesta del trigo a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y

Gluconacetobacter sp. *PGM-3* a nivel de plántula.

En la figura 9 se observa la respuesta positiva del trigo a la coinoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* que aumento su AP con 46 cm, un valor estadístico diferente significativo a los 39.75 cm de la AP de su homologo usado como CR con SMC equivalente a dosis de FN recomendado y de la misma gramínea empleado como CA con una AP de 19.5 cm. Lo que sugiere que la coinoculación del trigo con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3*, ambos géneros endófitas, tuvieron una mayor disponibilidad de azúcares y aminoácidos en los tejidos del trigo, los que transformaron en SPCV, que actúan sobre la formación de dominios apicales, diferenciación vascular y en el desarrollo de órganos (Blakeslee *et al.*, 2005; Tsavkelova *et al.*, 2006), a pesar de la reducción de la dosis al 50% del FN. En la bibliografía revisada no se encontró la coinoculación de *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp. en trigo.

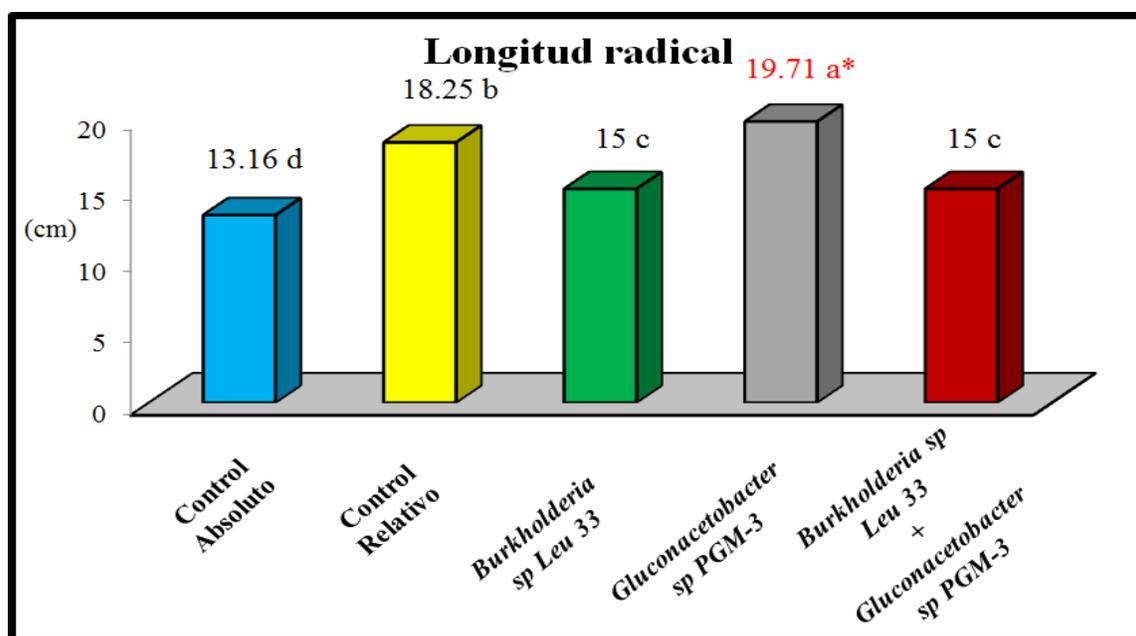
Figura 9. Respuesta de la trigo a nivel de plántula a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* en su altura de planta.



*Letras distintas con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) según Tukey.

En la figura 10 se observa la respuesta positiva del trigo a la inoculación con *Gluconacetobacter* sp. PGM-3 que obtuvo una LR de 19.71 cm, valor estadístico distinto significativo a los 18.25 cm de LR de su homólogo usado como CR con SMC y de misma gramínea utilizado como CA con una LR de 13.16 cm. Lo que sugiere que la inoculación del trigo con *Gluconacetobacter* sp. PGM-3, fue atraído por los exudados radicales del trigo que constituye fuente de Carbono, mismo que transformo en SPCV, observado en la elongación de la raíz de la gramínea, que permitió una mejor absorción de FN, a dosis reducidas al 50% FN, para su crecimiento sano del trigo, datos similares fueron reportados por García-González *et al.*, 2005 en trigo inoculado con el endófito *A. brasilense*, con el efecto positivo por la transformación de SPCV, reflejado en su incremento de LR. Ambos géneros han sido aislados de la caña de azúcar y productoras de SPCV, nativos endófitamente de esta gramínea (Reis *et al.*, 1990; Döbereiner *et al.*, 1993; Dibut *et al.*, 2005).

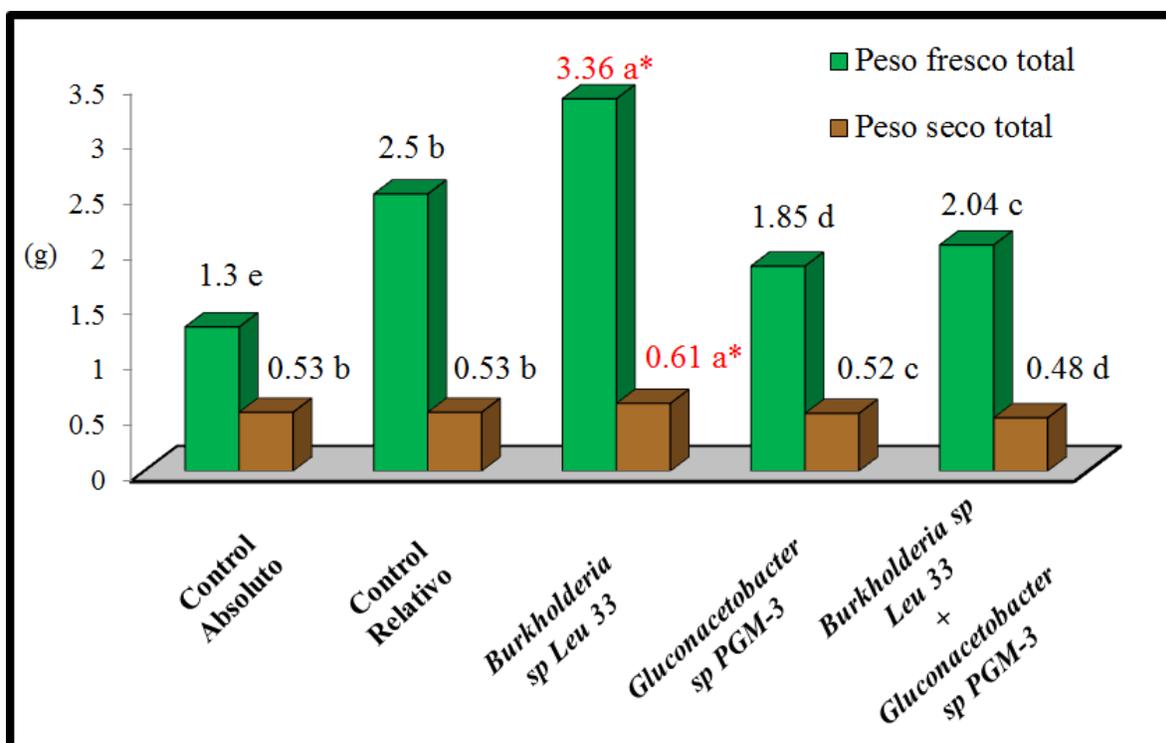
Figura 10. Respuesta de la trigo a nivel de plántula a la inoculación con *Burkholderia* sp. Leu 33 y *Gluconacetobacter* sp. PGM-3 en su longitud radical.



*Letras distintas con diferencia estadística significativa (P<0.05) según Tukey.

En la figura 11 se muestra la respuesta positiva del trigo a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* en su PFT con 3.36g y 0.61g de PST, ambos valores estadísticos distintos significativo a los 2.5g de PFT y 0.53g de PST de su homologo usado como CR con SMC a dosis de FN al 100% y de misma gramínea empleado como CA. Lo anterior sugiere que *Burkholderia* sp. *Leu 33*, colonizo endófitamente las raíces del trigo y uso las excreciones de la raíz, para la conversión de una porción de los compuestos orgánicos de raíz en SPCV, lo que indujo una mayor proliferación de raíces secundarias y una mayor absorción del FN a dosis 50%, lo que se reflejó en la biomasa del trigo (Rosas et al., 2009).

Figura 11. Respuesta del trigo a nivel de plántula a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* en su biomasa.



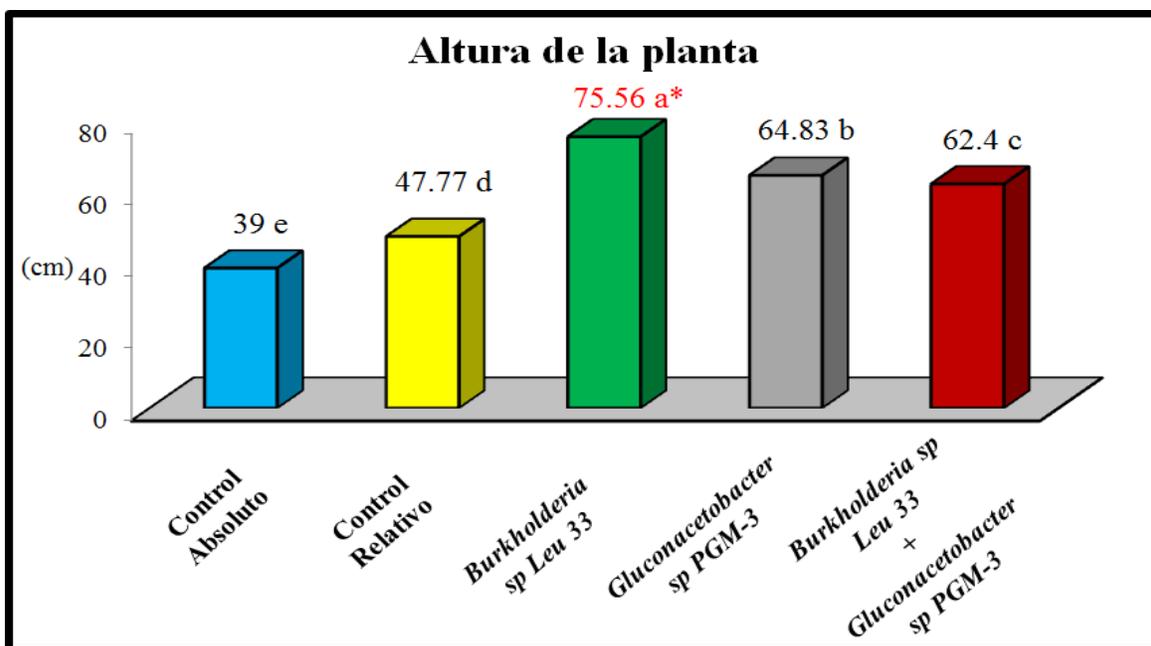
*Letras distintas con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) según Tukey.

7.4 Respuesta del trigo a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y

Gluconacetobacter sp. *PGM-3* a nivel de floración.

En la figura 12 se observa el trigo a nivel de floración respondió positivamente a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* en su AP con 75.56 cm, un valor estadístico superior significativo a 47.77 cm de AP de su mismo homólogo usado como CR SMC equivalente FN al 100% y de la misma gramínea utilizado como CA. Lo que sugiere que la inoculación del trigo con *Burkholderia* sp. *Leu 33*, utilizo los exudados radicales constituidos principalmente por aminoácidos y ácidos orgánicos de la rizosfera de la gramínea y los convirtió en fitohormonas; como auxina o giberilina, que indujo la elongación de la raíz y el desarrollo de órganos como: la espiga (Camelo *et al.*, 2011), por una mayor absorción del FN a dosis al 50%, efecto observado en la AP del trigo. Resultados similares fueron reportados por Mora y Toro, 2007, en maíz inoculado con *Burkholderia* sp. que incremento su extensión del tallo con 57%.

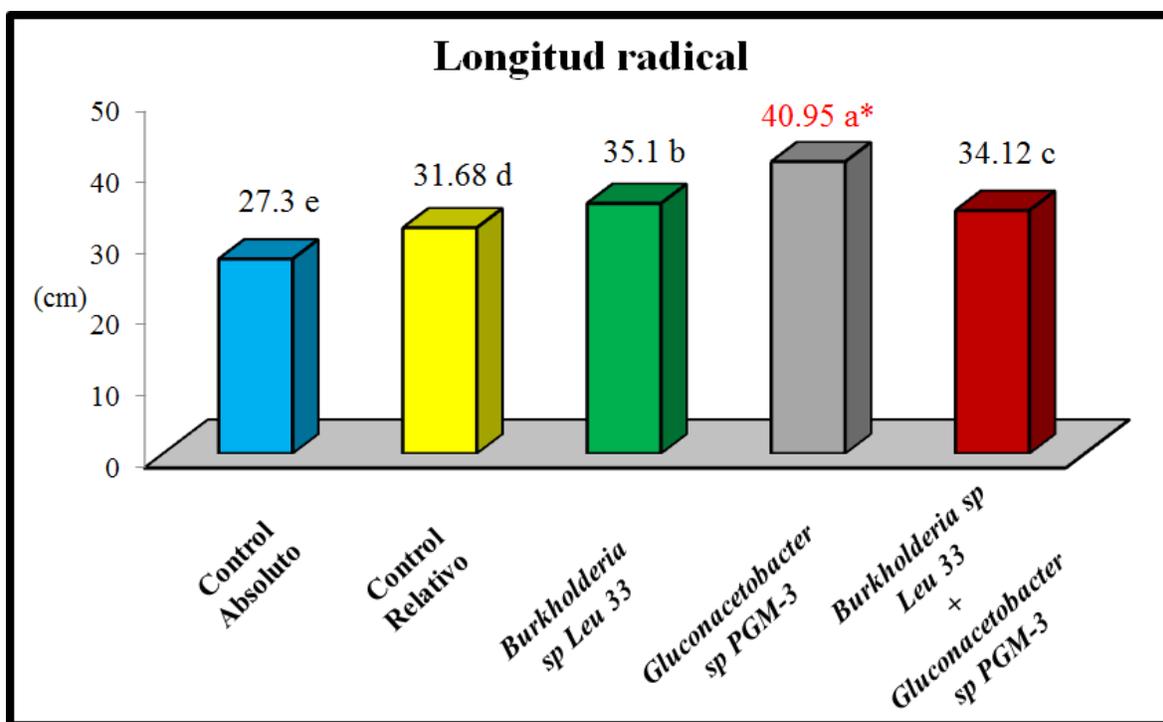
Figura 12. Respuesta del trigo a nivel de floración a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* en su altura de planta.



*Letras distintas con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) según Tukey.

En la figura 13 se muestra la respuesta del trigo a la inoculación con *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* que incremento su LR en 40.95 cm, un valor estadístico diferente significativo a 31.68 cm de LR de su homologado usado como CR con SMC y la misma gramínea empleado como CA con una LR de 27.3 cm. Lo anterior sugiere que el efecto de *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* al ser inoculado en trigo y establecerse endófitamente, tiene la capacidad de transformar con eficiencia fuentes de carbono: como azúcares en SPCV, lo que se reflejó en la elongación de la raíz y proliferación de la misma, en consecuencia un volumen mayor para la absorción del FN a dosis del 50% (Khallid *et al.*, 2001).

Figura 13. Respuesta del trigo a nivel de floración a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* en su longitud radical.

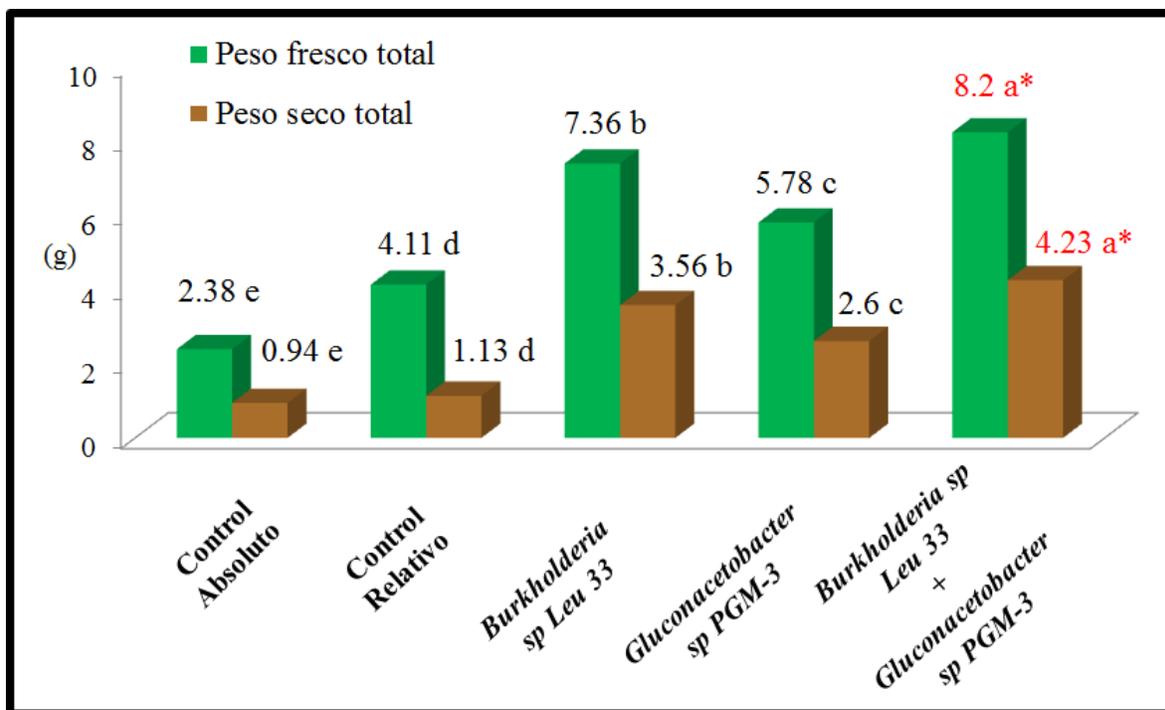


*Letras distintas con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) según Tukey.

En la figura 14 se muestra la respuesta positiva del trigo a la coinoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* que incremento su PST con 8.2g y 4.23g de PST, ambos valores estadísticos distinto significativo a los 4.11g de PFT y 1.13g

de PST de su homólogo usado como CR alimentado con SMC y de la misma gramínea utilizado como CA. Lo anterior sugiere que la coinoculación del trigo con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3*; ejercieron un sinergismo endófito, *Burkholderia* sp. *Leu 33* transforma una fracción de los exudados de la raíz, constituido principalmente por azúcares y aminoácidos en SPCV como una giberelina y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* en una auxina, que indujo una mayor proliferación de raíces secundarias y por consecuencia una mejor absorción del FN, a pesar que el trigo fue alimentado con FN al 50%, efecto reflejado en la biomasa de la gramínea coinoculada.

Figura 14. Respuesta del trigo a nivel de floración a la inoculación con *Burkholderia* sp. *Leu 33* y *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* en biomasa.



*Letras distintas con diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) según Tukey.

7.5 Aislamiento e identificación bioquímica del aislado *PGM-3* de la caña de azúcar.

En la figura 16, se muestra la morfología microscópica del aislado PGM-3 recuperado del tallo de caña de azúcar, con tinción Gram en el microscopio Carl Zeiss se observó un bacilo con 0.7-2.0 μm de diámetro, en par, cadena o solista (Muthukumarasamy *et al.*, 2002), Gram negativo (Figura 16). Según lo reportado en la literatura sugiere que se trata del genero *Gluconacetobacter* sp., con colonias planas de forma irregular y toman un color naranja intenso crecidas en agar LGI (Figura 15) aproximadamente 3 días de incubación.

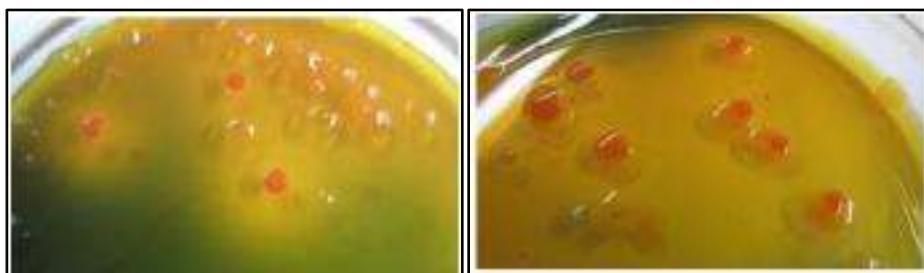


Figura 15. Morfología colonial de *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3* crecido en agar LGI 72h/30°C.



Figura 16. Observación microscópica a 100X de *Gluconacetobacter* sp. *PGM-3*, bacilo Gram negativo, aislado de caña de azúcar crecida en agar LGI por 72h/30°C.

En el cuadro 2 se observa la identificación del aislado PGM-3 del tallo de la caña de azúcar, con el sistema API20NE donde los resultados fueron: reducción de nitritos positiva (+), producción de indol a partir de triptófano (+) y la asimilación de citrato (+), no utiliza la urea (-), resultados similares fueron reportados por Dibut *et al.*, 2005 *Gluconacetobacter* sp. de otros géneros pertenecientes a la familia Acetobacteraceae.

Cuadro 2. Perfil bioquímico de *Gluconacetobacter* sp. aislada de caña de azúcar y *Gluconacetobacter* sp. reportada en la bibliografía.

PRUEBAS BIOQUIMICAS	<i>Gluconacetobacter</i> sp. PGM-3 aislado de caña de azúcar	<i>Gluconacetobacter</i> sp. reportado en la bibliografía
Reducción de nitrato	+*	+
Triptófano	+	+
Fermentación de glucosa	+	+
Arginina dehidrolasa	+	+
Ureasa	-	-
Hidrólisis de esculina	+	A**
Gelatinasa	-	-
β -galactosidasa	+	+
Pruebas de asimilación		
D-glucosa	+	+
L-arabinosa	+	+
D-manosa	+	+
D-manitol	+	+
N-acetil-D-glucosamina	+	+
Maltosa	+	+
D-gluconato	+	A
Caprato	-	-
Adipato	+	A
L-malato	+	+
Citrato	+	+
Fenilacetato	-	-

* Reacción (+)= positiva y Reacción (-)= negativa. **A= no considerada para el género.

Otra prueba para reportar este género de otros relacionados fue la asimilación de azúcares simples: rafinosa, galactosa, arabinosa y manitol, los resultados sugiere que se trata de *Gluconacetobacter* sp., ya que las otras dos especies del género *Gluconacetobacter* tienen un patrón diferente a cada prueba bioquímica (Fuentes *et al.*, 2000). Las pruebas bioquímicas de fuente de C son confirmatorias para la identificación de la especie de *Gluconacetobacter* sp. como los resultados reportado por Muthukumarasamy *et al.*, 2007, en aislado de arroz e identificados como *G. diazotrophicus*. Con los resultados de las pruebas bioquímicas surgieron que el aislado de la caña de azúcar pertenece al género de *Gluconacetobacter* sp.

8 CONCLUSIÓN.

Caña de azúcar, es una fuente de BPCV endófito como: *Gluconacetobacter* sp. para cultivos agrícolas como: cebada y trigo. En este trabajo se demostró que *Burkholderia* sp., ejerció un efecto positivo mejor en el crecimiento de la cebada que *Gluconacetobacter* sp. En contraste el trigo coinoculado con *Burkholderia* sp. y *Gluconacetobacter* sp., ejercieron un efecto positivo para su crecimiento, lo que apoya una posible interacción específica de reconocimiento entre ambos, aspecto fundamental para su explotación en favor de una producción sustentable de estas gramíneas a dosis regulada del FN.

9 BIBLIOGRAFÍA.

1. Benizri, E., E. Baudion y A. Guckert. 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*. 11: 557-574.
2. Bent, E., S. Tuzun, C.P. Chanway y S. Enebak. 2001. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 47: 793-800.
3. Blakeslee, J., Ann Peer, W., Murphy, A. 2005. MDR/PGP Auxin transport proteins and endocytic cycling. *Plant Cell Monogr* 1:159-176.
4. Camelo, M., Vera, S. P., Bonilla, R. R. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Corpoica*. 12:159-166.
5. Cavalcant, V. A., and J. Döbereiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*. 108:23-31.
6. Contreras-López, E., Jaimez-Ordaz, J., Hernández-Madrigal, T., Añorve-Morga, J., Beltrán-Hernández, R. 2008. Composición química de cebadas cultivadas bajo diferentes condiciones de labranza en tres localidades del estado de Hidalgo, México. *Bioagro*. 20:201-208.
7. Chanway, C.P., M. Shishido, J. Nairn, S. Jungwirth, J. Markham, G. Xiao y F.B. Holl. 2000. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Forest Ecology and Management*. 133: 81-88.
8. Chelius, M.K., and Triplett, E.W. 2000. Prokaryotic Nitrogen Fixation; Model system for the analysis of a biological process. Ed Horizont Scientific Press. Hwitts Lane WymondahmNR18.England.1-20.

9. Dibut, B.; Ortega, M; Martínez, R.; Fey, L.; Ríos, Yoania. 2005. Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para cuba. *Cultivos tropicales*. 26:5-10.
10. Döbereiner, J., V. L. D. Baldani, F. Olivares y V. M. Reis. 1993. Endophytic diazotrophs: the key to BNF in gramineous plants. Eds. NA Hegazi, M Fayez y Monib M 395-408. Soy. Univ. en El Cairo Press, El Cairo, Egipto.
11. Fuentes, L. E., Bustillos, R., Tapia, A., Jiménez, T., Wang, E. T., Martínez, E. y Caballero, J. 2000. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. Nov, and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. Nov, associated with coffee plants. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 5:43-49.
12. García-González, M.M., Farías-Rodríguez, R., Peña-Cabriales, J.J., Sánchez-Yáñez, J.M. 2005. Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum* spp. y *Azotobacter beijerinckii*. *Terra*. 23: 65-72.
13. Garcia, J.A., Castillo, A., Ramírez, M. E., Rendón, G., Larqué, M. U. 2001. Comparación de los procedimientos de Tukey, Duncan, Dunnett, HSU y Bechhofer para selección de medias. *Agrociencia*. 35:79-86.
14. García-Reyna M., Farias R., Sánchez-Yáñez J. M. 2005. *Burkholderia*, endofita del teocintle promotora crecimiento de maíz. Disponible: <http://www.monografias.com/trabajos33/burkholderia/burkholderia.shtml>.
15. Jacoud, C., D. Job, P. Wadoux y R. Bally. 1999. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRTI during maize seed germination. *Canadian Journal of Microbiology*. 45: 339-342.
16. James, E.K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*. 65:197-209.

17. Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z.A., Khalid M. 2001. Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis. *Online Journal of Bioblogical Sciences*. 1:750-754.
18. López, P., Sánchez, I., Román, A. 2006. Biological evaluation of the protein quality of different barley varieties (*Hordeum sativum* jess) produced in the states of Hidalgo and Tlaxcala in México. *Revista chilena de nutrición*. 33.
19. Luna, O.H.A. y Sánchez-Yañez, J.M. 1991. Manual de prácticas de microbiología del suelo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. 1era. ed. Monterrey, N.L. México (Inédito).
20. Naiman, A., Latronico, A., García de Salamone, I. 2009. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora. *European Journal of Soil Biology*. 45:44-50.
21. Mora E. y Toro M. 2007. Estimulación del crecimiento vegetal por *Burkholderia cepacia*, una cepa nativa de suelos ácidos de sabanas venezolanas. *Agronomía Tropical*. 57:123-128.
22. Muñoz-Rojas, J., Fuentes-Ramírez, L E., Caballero-Mellado, J. 2005 Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *Microbial Ecology*. 54:57-66.
23. Muñoz-Rojas, J. y Caballero-Mellado, J. 2003. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial Ecology*. 46:454-464.

24. Muthukumarasamy, R., G. Revathi, S. Seshadri y C. Lakshminarasimhan. 2002. *Glucobnacetobacter diazotrophicus* a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*. 83: 137-145.
25. Muthukumarasamy, R., Kang, UG., Parque, KD., Jeon, W-T., Parque, CY., Cho, YS., Kwon, S-W., Roh, D-H., Revathi, G. 2007. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. *Applied Microbiology*. 102:981-991.
26. Palafox-Caballero, A., Tosquy-Valle, O., Sierra-Macías, M., Turrent-Fernández, A., Espinosa-Calderón, A. 2005. Response of Common and High Quality Protein Corn Hybrids to Chemical Fertilization. *Terra*. 23:129-135.
27. Piccinin , G., Braccini , A., Dan , L., Scapim , C., Ricci, T., Bazo, G. 2013. Efficiency of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* on agronomic characteristics and yield of wheat. *Industrial Crops and Products*. 43:393-397.
28. Piromyou, P., Buranabanyat, B., Tantasawat, P., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Teaumroong, N. 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. *European Journal of Soil Biology*. 47: 44-54.
29. Plana, R., Medina, N., Moreno, I., Ramírez, A. 1999. Efecto agronómico de la biofertilización con dos rizobacterias en la producción de trigo (*Triticum aestivum* L.) en cuba. *Cultivos tropicales*. 20:5-8.
30. Plata-Guzmán, D., Sánchez-Yáñez, J.M., Farías-Rodríguez, R., Cárdenas-Navarro, R. 2006. Respuesta de maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con rizobacterias de teocintle (*Zea mays* sp. mexicana l). Disponible:

- <http://www.monografias.com/trabajos33/inoculacion-maiz/inoculacion-maiz.shtml>.
31. Ramírez, J., Sáinz, R. A., 1995. La solarización como herramienta para el control de malezas, patógenos y plagas del suelo. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos43/solarizacion-malezas/solarizacion-malezas3.shtml>.
 32. Reis, V. M., Y. Zang y R. H. Burris. 1990. Regulation of nitrogenase by ammonium and oxygen in *Acetobacter diazotrophicus*. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 62: 317.
 33. Riggs, P.J., Chelius, M.K., Iniguez, A.L., Kaeppler, .S.M, and Triplett, E.W. 2001. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28: 829-836.
 34. Rojas, M., Rodríguez, A., Trujillo, I., Heydrich, M. 2009. Relacion de la fijación de nitrógeno y la producción de auxinas en las cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* procedentes de diferentes cultivos. *Colombiana de Biotecnología*. 11: 84-93.
 35. Rosas , S., Avanzini , G., Carlier , E., Pasluosta, C., Pastor , N., Rovera, M. 2009. Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. *Soil Biology and Biochemistry*. 41:1802-1806.
 36. Salazar, E. Z., Nieves, B., Ruíz, J., Vila, J. 2008. Utilidad del Sistema API 20NE para identificar especies del género *Acinetobacter* y otros bacilos Gram negativos no fermentadores. *Sociedad Venezolana de Microbiología*. 28:89-95.
 37. Sánchez-Yáñez J.M. 2006. Interacciones microbianas en la agricultura. Disponible:<http://www.monografias.com/trabajos35/interaccionesmicrobianas/interacciones-microbianas.shtml>.

38. Sánchez-Yáñez J.M., 2007. Breve Tratado de Microbiología Agrícola, teoría y práctica, Ed. UMSNH, UDEM. pp: 130-133, 136-138, 153-155. ISBN: 978-970-95424-1-7.
39. Sevilla, M.; Burris, R. H.; Nirmala-Gunalapa, G. L.; Kennedy, C. y Gunalapa, N. 2001. Comparison of benedit to sugarcane plant growth and N15 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif-mutant strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14:358-366.
40. Tsavkelova, E., Klimova, S., Cherdyntseva, T., Netrusov, A. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl Biochem Microbiol* 42:117-126.
41. Villaseñor, H. y Espitia R. 2000. El Trigo de Temporal en México. Libro Técnico N° 1. Chapingo, Estado de México., México, SAGAR, INIFAP, CIRCE, Campo Experimental Valle de México. 315. Disponible y revisado 23/02/13 en: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/1821>.
42. Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki, and M. Arakawa. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. Nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia*. *Microbial Ecology*. 36:1251-1275.
43. Youssef H., Fayez M., Monib M., Hegazi N. (2004). *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a natural endophytic diazotroph of Nile Delta sugarcane capable of establishing an endophytic association with wheat. *Biology and Fertility of Soils*. 39: 391-397.