



**Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias**

Mención Ffitotecnia

Tesis en opción al Título Académico de Master en Agricultura Sostenible.

Influencia de aislados bacterianos rizosféricos y endófitos, sobre parámetros morfofisiológicos y el rendimiento agrícola del sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) en un suelo Ferralítico rojo típico

Autora: Lic. María del Pilar Fernández Pedroso

Tutor: MSc. Bladimir A. Díaz Martín

2015

"Año 57 de la Revolución"

A mi mamá por ser la sombra de mí ser.

A mis hermanas y hermanos: la luz de mi vida.

Al señor: por estar siempre a mi lado.

A mi hijo: que por su defraude profesional me ha permitido crecerme.

El agradecimiento es la más linda virtud del hombre

A mi tutor Bladimir A. Díaz Martín y René Cupull Santana que sin su dedicación y su amor a su trabajo no podría ver realizado este trabajo.

A mi hijo por ser la luz que me ilumina.

A los técnicos del centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) de la Universidad central de Las Villas.

A la Revolución Cubana que nos da la posibilidad de superarnos cada día más.

A todos los que de una forma u otra hicieron posible la realización de este trabajo.

A Dios por darme tanta fuerza para enfrentar esta vida.

RESUMEN

Se realizaron aislamientos de bacterias de la rizosfera e interior de la raíz del cultivo del sorgo y se caracterizaron las mismas morfológica y culturalmente, se determinaron los modos de acción de los aislados más prominentes en la estimulación del crecimiento vegetal, los cuales se llevaron a condiciones de campo. El experimento tuvo un diseño de bloques al azar y se desarrolló sobre un suelo Ferralítico rojo típico ubicado en el municipio de Remedios, provincia de Villa Clara con el objetivo de determinar el efecto que producen las bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el rendimiento agrícola del sorgo var. UDG-110. Se peletizaron semillas de sorgo con seis aislados bacterianos y un control sin peletizar. Se evaluaron parámetros morfofisiológicos y componentes del rendimiento agrícola. Los resultados mostraron que los aislados 4 y 24 fueron los que más estimularon el crecimiento vegetal en el cultivo del sorgo incidiendo sobre varios de los parámetros morfofisiológicos del mismo, siendo mayor la producción de biomasa cuando se aplicó el aislado 4. Los aislados 4, 6 y 24 produjeron los mayores efectos sobre el rendimiento en grano del cultivo con 14.57 t ha^{-1} ; 11.65 t ha^{-1} y 13.21 t ha^{-1} respectivamente. El aislado 4 presentó los mejores resultados económicos con una ganancia de $32897.14 \text{ \$MN ha}^{-1}$.

ABSTRACT

Isolates of bacteria from the rhizosphere and inside the root of sorghum were obtained and it were characterized morphology and culturally, the modes of action of most prominent isolated in stimulating plant growth were determined, which led to field conditions. The experiment had a randomized block design and was developed on an Inceptisol soil located in the municipality of Remedios, Villa Clara province in order to determine the effect produced by the plant growth promoting bacteria in agricultural yields of sorghum var. UDG-110. Sorghum seeds were pelleted with six bacterial isolates and a control without pelletizing. Morphophysiological parameters and crop yield components were evaluated. The results showed that the isolated 4 and 24 were the most stimulated plant growth in of sorghum crop, incident on several morphophysiological parameters, being higher biomass production when the isolated 4 were applied. The isolated 4, 6 and 24 produced the greatest effect on grain yield crop with 14.57 t ha^{-1} ; 11.65 t ha^{-1} and 13.21 t ha^{-1} respectively. The isolated 4 exhibited the best economic results with a profit of \$ 32,897.14 MN ha^{-1} .

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 La sostenibilidad de los sistemas agrícolas.....	4
2.2.1 Utilización del sorgo en Cuba	4
2.2.2 Importancia Económica del sorgo	5
2.2.3 El rendimiento del cultivo del sorgo	5
2.2.4 Fertilización del cultivo del sorgo.	6
2.2.5 Descripción de la variedad UDG-10.....	7
2.3 Bacterias rizosfericas	10
2.4 Bacterias endófitas.....	12
2.5 Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	14
2.5.2 Producción de sustancias reguladoras del crecimiento de la planta.	17
2.5.3 Efecto de las RPCV en el crecimiento de la planta.....	19
2.5.4 Las RPCV en una agricultura de estrés	21
2.5.5 Las RPCV como biofertilizante	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	21
3.1 Aislamiento, caracterización morfológica, cultural y determinación de los mecanismos de acción de los aislados bacterianos en condiciones de laboratorio ...	23
3.1.1 Obtención de los aislados bacterianos.....	21
3.1.2 Caracterización morfológica y cultural de los aislados bacterianos	24
3.1.3 Determinación de la producción de ácido-3-indolacético	24
3.1.4 Determinación de la solubilización de fosfatos.....	25
3.1.5 Determinación del control del patógeno <i>Sclerotium rolfsii</i>	25
3.2 Realización del experimento en condiciones de campo	27
3.2.1. Descripción del experimento	27

3.2.2 Evaluaciones realizadas	30
3.3 Procesamiento estadístico.....	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1 Procedencia de los aislados bacterianos	32
4.2 Descripción morfológica y cultural de los aislados bacterianos	33
4.3 Producción de ácido-3-indolacético y solubilización de fosfatos por los aislados bacterianos	34
4.4 Control del patógeno <i>Sclerotium rolfsii</i> por los aislados bacterianos	38
4.5 Influencia de los aislados bacterianos sobre los parámetros morfofisiológicos del cultivo del sorgo	40
4.5.1 Evaluaciones a los 30 días	40
4.5.2 Evaluaciones a los 50 días	43
4.6 Influencia de los aislados bacterianos sobre el rendimiento del sorgo	47
4.6.1 Producción de biomasa	47
4.6.2 Influencia de los aislados bacterianos sobre algunos componentes del rendimiento a los 100 días de ciclo del cultivo	49
4.7 Valoración económica de los resultados	53
5. CONCLUSIONES.	56
6. RECOMENDACIONES	57
7. BIBLIOGRAFIA	

1. INTRODUCCIÓN

El sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) es el quinto cereal de importancia en el mundo después del trigo, el maíz, el arroz y la cebada (FAO, 2008). A nivel de planeta más del 35% del sorgo es cultivado para el consumo humano, el resto se utiliza principalmente para la alimentación animal, producción de alcohol y productos industriales (FAO, 1995). Se cultivan más de 40 millones de hectáreas en 98 países, principalmente en Nigeria, India, USA, México, Sudan, China y Argentina (Praveen *et al.*, 2012)

En Cuba, el sorgo constituye una excelente alternativa, en la agricultura y para la seguridad alimentaria del país, debido a su habilidad de crecer bien en condiciones edáficas extremas. El grano de sorgo se utiliza para la alimentación animal en la formulación de piensos (aves, porcinos, bovinos, etc.), y en forma de forraje. También es usada su harina en la alimentación humana en la confección de dulces y panes, siendo de vital importancia para las personas celiacas que presentan intolerancia a una proteína llamada “gluten”.

En los suelos agrícolas, excepto por los aportes antropogénicos, las comunidades diazotróficas son la fuente principal de nitrógeno. La fijación biológica ofrece una alternativa no contaminante de nitrógeno y puede mejorar la producción de los cultivos y disminuir el uso de fertilizantes sintéticos (Remans, 2007).

Por otra parte, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal representan una amplia variedad, que cuando crecen en asociación con la planta hospedera resultan en una estimulación del crecimiento de la misma (Verma, 2001).

Se han obtenido aislados de *Herbaspirillum* en asociación endofítica con los tejidos de la planta de sorgo con la habilidad de fijar nitrógeno (James *et al.*, 1997).

El estudio de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y sus modos de acción incluido el control de microorganismos patógenos conduce a la selección de

aquellas con una mayor estimulación del crecimiento en el cultivo y de esa manera pueden llegar a constituir biofertilizantes comerciales (Farooq y Bano, 2013).

La variedad de sorgo UDG-110 de grano beige, proveniente de la Universidad de Guadalajara, México, fue introducida y seleccionada en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas por el Grupo de Mejoramiento Genético y Producción de semillas de granos perteneciente al Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP).

En condiciones experimentales de secano ha demostrado tener un potencial de rendimiento de 11.1 a 12.2 t ha⁻¹ y de 20 a 55 t ha⁻¹ de masa verde. En áreas de producción se han logrado rendimientos agrícolas de 2.8 a 3.4 t ha⁻¹ en dependencia de la época de siembra y el tipo de suelo (Martín et al., 1992).

Teniendo en cuenta la carencia de fertilización química para este cultivo, los daños por contaminación al suelo y las aguas que la misma causaría, el potencial de rendimiento de reserva que aún existe para esta variedad y el beneficio reportado por la utilización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal se propone lo siguiente:

Hipótesis

La aplicación selectiva de aislados bacterianos rizosféricos y endófitos al cultivo del sorgo variedad UDG-110 pudiera influir en un aumento de su producción en biomasa y grano.

Objetivo General

- Determinar el efecto que producen los aislados bacterianos rizosféricos y endófitos en el rendimiento agrícola del sorgo en un suelo Ferralítico rojo típico.

Objetivos específicos

1. Aislar morfológicamente los aislados bacterianos rizosféricos y endófitos asociados del cultivo del sorgo.
2. Describir morfológicamente los aislados bacterianos rizosféricos y endófitos obtenidos del cultivo del sorgo.
3. Determinar los posibles modos de acción de los aislados bacterianos en la estimulación del crecimiento vegetal tales como la producción de ácido-3-indolacético y la solubilización de fosfatos, además del control del patógeno *Sclerotium rolfsii* Sacc.
4. Evaluar el efecto de los aislados bacterianos sobre algunos parámetros morfofisiológicos, el rendimiento en biomasa y grano del sorgo en condiciones de campo.
5. Valorar económicamente los resultados obtenidos con los tratamientos aplicados.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 La sostenibilidad de los sistemas agrícolas

La sostenibilidad de los sistemas agrícolas sin comprometer la calidad y la conservación medioambiental es una de las preocupaciones mayores del mundo de hoy. El uso excesivo de agro-químicos (fertilizantes y pesticidas) está planteando serias amenazas para el ambiente. La roturación, la degradación de los suelos, la ganadería intensiva, son las causas fundamentales del cambio climático en la agricultura. La tala de bosques, el desmonte de cerros para producción intensiva de frutales, eliminan sumideros de carbono fundamentales (plantas y suelos que absorben carbono atmosférico) e incrementa el calentamiento global (Mundaca, 2010). El sistema actual de agricultura “industrial”, basado en el monocultivo, en el uso intensivo de energía fósil en forma de fertilizantes, plaguicidas, maquinaria y combustible, incrementa de manera decisiva la productividad del trabajo, pero es degradante de la base productiva, principalmente del suelo y la biodiversidad. La dimensión ecológica, de los efectos que provoca la agricultura industrializada se expresan en la nivelación o descenso de los rendimientos de producción, derivado de la degradación de la base productiva, (erosión, compactación, esterilización de suelos, disminución de la Materia Orgánica, resistencia e ineficacia de plaguicidas) desplazamiento de la producción de pequeños agricultores hacia zonas marginales y ecológicamente frágiles, introducción de tecnologías de producción destructivas en zonas no aptas para cultivo

2.2.1 Utilización del sorgo en Cuba

A nivel de planeta más del 35% del sorgo es cultivado para el consumo humano. Según el criterio de los especialistas, el sorgo es ideal para establecer ciclo de rotación con el arroz, al tiempo que su siembra contribuirá a reducir importaciones de trigo, pues la mezcla de ambos en proporciones adecuadas no altera la calidad ni el sabor del pan (Martín *et al.*, 1994).

Cuba a pesar de que no existe tradición de cultivo de este cereal se han dado pasos importantes en la extensión del mismo en el país ya que constituye una alternativa viable y factible (Saucedo *et al.*, 2005). La necesidad de reducir importaciones, debido a los altos precios del trigo y otros cereales a nivel

internacional, ocasionado en buena medida por las dificultades para su adquisición a su vez motivadas por el férreo bloqueo impuesto a Cuba por EE.UU

2.2.2 Importancia Económica del sorgo

El cultivo se expandió casi por todo el mundo al notarse sus facilidades de adaptación al suelo y su resistencia a la sequía, entre otras características. En 1960, la Estación Experimental de Chilote en Texas, liberó las primeras variedades híbridas de sorgo, las que permitieron explotar posteriormente su vigor híbrido con respecto a las variedades de polinización libre tradicionales (Martín *et al.*, 1994).

En los últimos tiempos, dicho cultivo ha adquirido una gran importancia ya que es capaz de sustituir otros cereales en una amplia gama de productos, tanto en la alimentación humana como animal. Las variedades actuales cultivadas son específicas para ciertos propósitos de la producción, existiendo variedades para grano, grano y forraje o forraje (Martín *et al.*, 1994).

2.2.3 El rendimiento del cultivo del sorgo

El rendimiento del cultivo, según (Ayala, 1994), es una propiedad de los sistemas agrícolas e integra una amplia variedad de respuesta de la planta siendo la manifestación más importante y trascendente en la adaptación de cualquier planta cultivada. El sorgo para nuestras condiciones establece su rendimiento agrícola entre 1.5 y 4t ha⁻¹ (Arredondo, 2000).

Además de lo anterior, la intensa sequía y las altas temperaturas presentes en Cuba en los últimos años, asociados según expertos a un cambio climático global, han constituido dos de los factores que mayores daños han provocado en muchos cultivos, resultando ser el sorgo más tolerante que otros cereales a dichas

condiciones, cuestión que apoya la conveniencia de su cultivo extensivo (Cargil, 2005).

2.2.4 Fertilización del cultivo del sorgo.

Para aumentar los rendimientos de las plantas se pueden emplear biofertilizantes que ayudan en la nutrición de las plantas, según el tipo y los requerimientos nutricionales de los suelos donde se va a sembrar sorgo se puede utilizar fertilizante de formula completa sobre la base de NPK o los fertilizantes simples, solo o en mezclas, que satisfagan las exigencias del cultivo. Para lograr rendimientos adecuados se requiere de una buena fertilización o sus consecuencias se verán reflejadas en los resultados (Wu *et al.*, 2005).

Lo anterior queda establecido según el tipo de suelo, por lo que se recomienda aplicar 100 kg ha⁻¹ de nitrógeno en los suelos Pardos con carbonatos, aluviales y vertisuelos. En los Ferralíticos rojos y arenosos se recomienda 120 kg ha⁻¹. La demanda de P₂O₅ no excede de 40 kg ha⁻¹. No es necesario aplicar K₂O, salvo en casos excepcionales (Martín *et al.*, 1992).

Cuba, en la década de los 80, contaba con una agricultura de altos insumos con el empleo de la mecanización y altos contenidos de fertilizantes químicos, con el objetivo de producir los alimentos necesarios, sin embargo en las condiciones actuales existe limitaciones en cuanto a estos aspectos anteriores (Simó, 2003).

Por esto anterior y como alternativa de fertilización viable es que algunos autores plantean que en los países tropicales, la investigación básica orientada hacia el aislamiento, identificación y caracterización funcional de biofertilizantes y su desarrollo como inoculantes ha llevado a desarrollos industriales importantes para el sector agrícola (Oliveira et al., 2008)

2.2.5 Descripción de la variedad UDG-110

La Facultad de Agronomía de la Universidad de Guadalajara, México, liberó en el año 1989 la variedad UDG-110 (Fig. 2.1) de polinización libre, la cual fue introducida y seleccionada en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas a finales de 1990.

El período comprendido entre la siembra y germinación varía de 3 a 5 días. A partir de la misma y hasta la diferenciación floral transcurren de 35 a 45 días, en esta etapa la planta tiene una altura de 45 a 55 cm. Posteriormente a los 25 a 30 días se observa el embuchamiento.

El estado de buche, el cual ocurre cuando la planta tiene de 95 a 120 cm, presentando el número total de nudos (Saucedo *et al.*, 2005). Según este autor, el tiempo transcurrido entre el estado de buche y el inicio de la emergencia de la panícula es de 7 a 8 días.

La floración o antesis es de 6 a 8 días. En ésta fenofase la planta alcanza su máxima área foliar y su altura fluctúa entre 122 y 142 cm (Saucedo *et al.*, 2005). En la estación de seca, posteriormente de 18 a 20 días el grano presenta el estado lechoso y la planta presenta su porte total.

El grano pasa de estado lechoso a estado mazoso a los 10 a 12 días y posteriormente de 13 a 15 días aparece el hilo o capa negra indicadora de que la planta alcanzó la madurez fisiológica. Sin embargo, la madurez total (comercial) se alcanza cuando el grano contiene de 16 a 18% de humedad, lo cual ocurre entre 114

a 138 días a partir de la germinación en dependencia de la época de siembra. Presenta ligera fotosensibilidad, alargando su ciclo y longitud de la planta en siembras realizadas en el período marzo-agosto (Saucedo *et al.*, 2005).

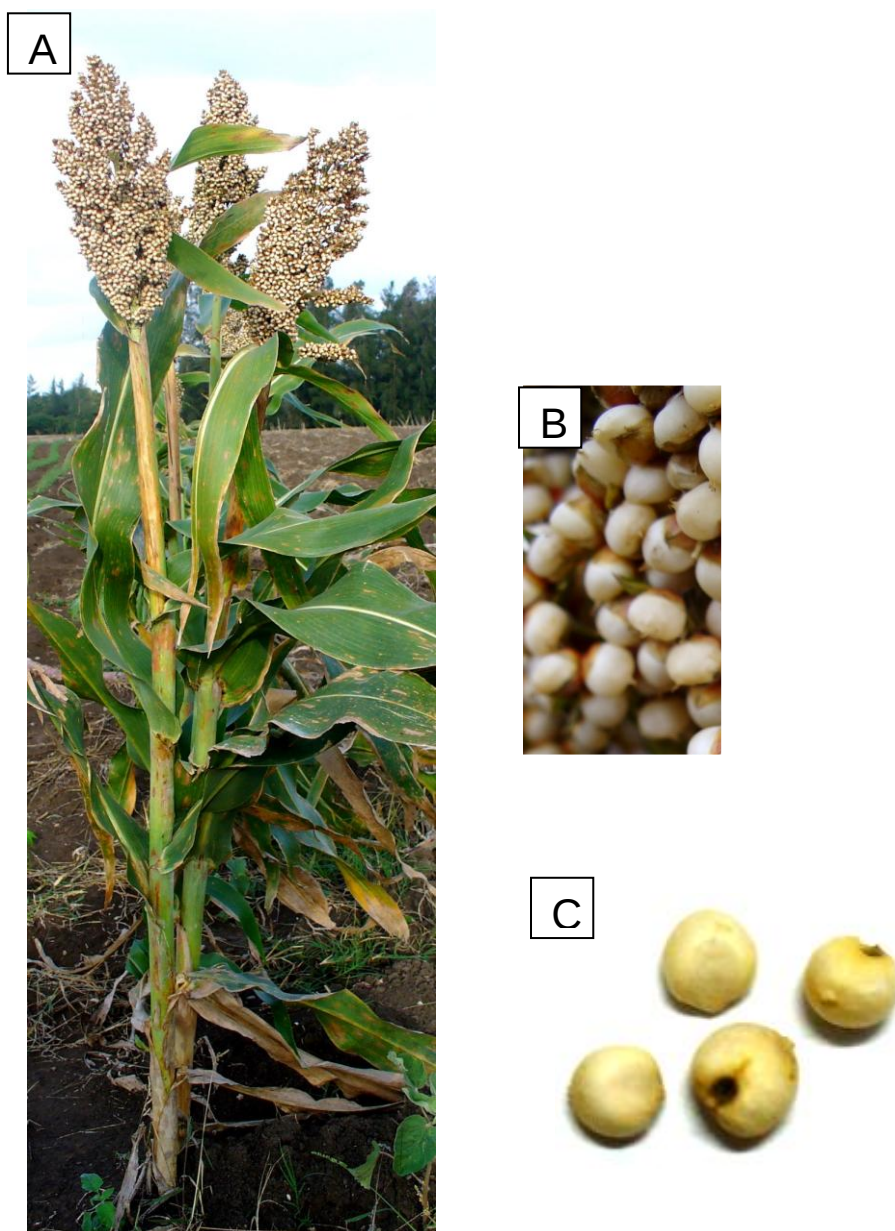


Figura 2.1 A: Planta de sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench) de la variedad UDG-110; B: detalle de su panícula y C: detalle de sus granos.

Las planta de la variedad UDG-110 se caracteriza porque su tallo alcanza una longitud medida de la base de la planta a la base de la panícula de 95 a 140 cm. en condiciones desfavorables y hasta 175 cm en ambientes idóneos en siembras realizadas en el periodo septiembre-diciembre. En siembra desde marzo-agosto alcanza una longitud del tallo de 150 a 200 cm. El tallo es poco fibroso de sabor semi dulce durante el llenado del grano. El tallo presenta de 9 a 12 nudos en el periodo de siembra de septiembre a diciembre y de 14 a 17 nudos entre marzo y agosto, se observa que el número de nudos se corresponde con el número de hojas para las siembras realizadas. Su índice de área foliar (IAF) oscila de 4,11 en marcos de siembra de 0,90 x 0,10 m hasta 8,20 a distancias de 0,70 x 0,5 m (Saucedo *et al.*, 2005).

Las hojas son de color verde pálido en los primeros estadios después de la fenofase de formación de la hoja bandera su color es más intenso alcanzando a verdes tonalidades oscuras con presencia de alguna cera, se implantan con una angulación aproximadamente de 45°, presentando de un 30 a 35% de ondulación marginal en el tercio superior de la planta y su nervadura central es blanca (Saucedo *et al.*, 2005).

Además se observa presencia de cera en las vainas de las hojas. Posee resistencia a la senescencia aun después de ser cosechada la panícula. La última hoja denominada bandera es más corta, semi erecta y ondulada. La panícula es semi compacta con un grosor de 6 a 10 cm y de largo mide de 26 a 31 cm la excursión de la panícula mide de 12 cm. Cuando se cosecha muy pasado de madurez el aspecto de la panícula es abierto (Saucedo *et al.*, 2005).

Las semillas son redondas, lisas y de color beige en el pericarpio, en tanto que el endospermo es semi cristalino y blanco, el número de granos por panícula varía de 1290 a 2000, la masa de 1000 granos al 14% de humedad es de 34 a 37 gramos. El peso de los granos de una panícula varía en un rango de 44 a 110 gramos (Saucedo *et al.*, 2005).

2.3 Bacterias rizosféricas

La rizosfera de la planta es un ambiente ecológico muy importante para los microorganismos que colonizan este lugar próximo de las raíces de las plantas en crecimiento. Distintas comunidades de microorganismos beneficiosos del suelo están asociadas con los sistemas radicales de todas las plantas superiores (Khalid *et al.*, 2006).

Estas rizobacterias son consideradas como competidores microbianos eficaces en la zona de la raíz, y el efecto neto de las asociaciones planta-microbio en el crecimiento de la planta puede ser positivo, neutro, o negativo.

Tales bacterias que habitan las raíces de la planta e influyen positivamente en el crecimiento de la planta son llamadas a menudo rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) (Arshad y Frankenberger, 1998; Zahir *et al.*, 2004). Estas bacterias, después de la inoculación, rápidamente, colonizan las semillas y raíces en respuesta a la exudación y, así afecta el crecimiento de la planta.

Muchos microorganismos son muy dependientes para su supervivencia de sustratos preformados, exudados por las raíces de las plantas (Frankenberger y Arshad, 1995; Glick *et al.*, 1998; Khalid *et al.*, 2006).

A su vez la microflora que habita la rizosfera puede causar cambios importantes en el crecimiento y desarrollo de la planta produciendo reguladores del crecimiento de la planta (RCP) o sustancias biológicamente activas, o alterando niveles endógenos de RCPs, y/o facilitando el suministro y captación de nutrientes y proporcionando otros beneficios.

Estos microorganismos son herramientas potenciales para la agricultura sostenible porque ellos no sólo aseguran la disponibilidad de nutrientes esenciales a las plantas sino que también refuerzan la eficacia del uso del nutriente. Varios autores han informado aumentos significativos en el crecimiento y rendimiento de cultivos

agrícolas en respuesta a inoculantes microbianos (RPCV) en condiciones controladas o de campo (Kennedy *et al.*, 2004; Khalid *et al.*, 2004a, 2006; Gravel *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2007; Zhuang *et al.*, 2007; Arshad *et al.*, 2008; Banchio *et al.*, 2008; Contesto *et al.*, 2008; Figueiredo *et al.*, 2008).

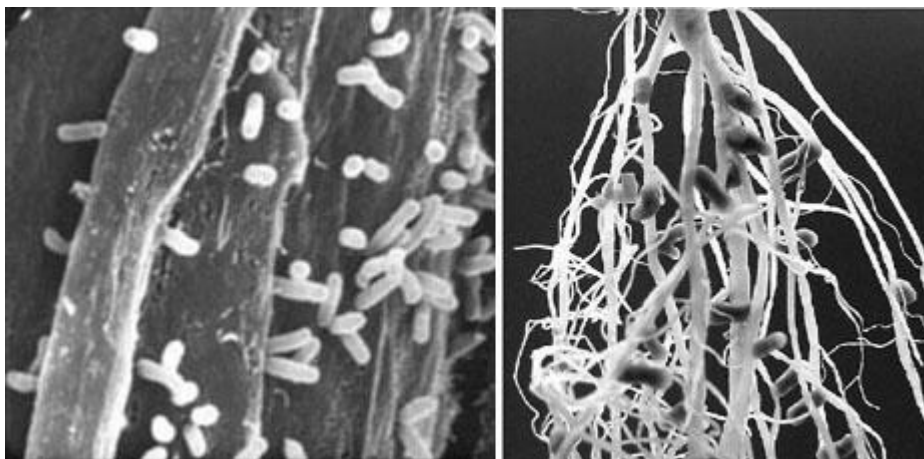


Fig. 2.3 La asociación mutualista entre las bacterias que fijan el nitrógeno y leguminosas. Izquierda. Bacteria fijadora de nitrógeno *Rhizobium* colonizados en los pelos de la raíz de plantas de trébol. Derecha. Tomado de imágenes de google.

Además de estimular el crecimiento de la planta, las RPCV también refuerzan la eficacia de los fertilizantes, mitigan el stress abiótico, controlan los patógenos de las plantas y causan la degradación de compuestos xenobióticos (Glick 2003, 2004; Huang *et al.*, 2004; Khan 2005; Arshad *et al.*, 2007; Saleem *et al.*, 2007; Zhuang *et al.*, 2007; Ahmad *et al.*, 2008; Amor *et al.*, 2008; Dell'Amico *et al.*, 2008; Lebeau *et al.*, 2008; Kohler *et al.*, 2009).

Se han aislado muchos microorganismos prometedores y se han comercializado como biofertilizantes; sin embargo, sus efectos en los rendimientos de los cultivos fluctúan de cultivo a cultivo, de lugar a lugar, y de época a época, dependiendo de la supervivencia de los microorganismos introducidos en la semilla, las raíces, y el suelo (Khalid *et al.*, 2004a; Hafeez *et al.*, 2006).

Para hacer eficaz la utilización de inoculantes microbianos, se requieren métodos exactos y fiables para supervisar el destino de las RPCV aplicadas a la rizosfera o rizoplasma y aumentar así su eficacia en condiciones de campo.

2.4 Bacterias endófitas

La palabra endófito en inglés “endophyte” se deriva del griego “endon” (dentro) y “phyte” (planta). Las bacterias endófitas son bacterias que viven en los tejidos de las plantas sin hacer daño sustantivo u otro beneficio que no sea su residencia (Kado *et al.*, 1992; Kobayashi y Palumbo, 2000).

Los endófitos bacterianos pueden ser aislados de los tejidos de la planta desinfectados superficialmente o pueden extraerse del tejido interno de la planta (Hallmann *et al.*, 1997).

El criterio para reconocer una “verdadera” bacteria endófitas ha sido publicado por Reinhold-Hurek y Hurek, 1998) y esto no sólo requiere del aislamiento de los tejidos superficialmente desinfectados sino también la evidencia microscópica para visualizar las bacterias dentro de los tejidos de la planta (Fig. 2.2). El último criterio no siempre se cumple. El uso del término endófitos putativos se ha recomendado para aquéllos no validados microscópicamente. Los verdaderos endófitos también pueden ser reconocidos por su capacidad de reinfectar plántulas desinfectadas.



Fig. 2.2. Observación de bacterias endófitas dentro de una célula del floema (Tomado de imágenes de google)

Las bacterias en las raíces y en la rizosfera se benefician de los exudados de la raíz, pero algunas bacterias y hongos son capaces de entrar en la planta como endófitos que no causan daños y podrían establecer una asociación mutualista (Azevedo *et al.*, 2000).

Los endófitos entran en el tejido de la planta principalmente a través de la zona de la raíz; sin embargo, porciones aéreas de la planta, como las flores, los tallos, y los cotiledones, pueden ser también utilizados para su entrada. Específicamente, las bacterias entran en los tejidos vía radículas brotadas, las raíces secundarias, estomas, o como resultado de un daño foliar (Kobayashi y Palumbo, 2000).

Los endófitos dentro de una planta pueden localizarse en el punto de entrada o pueden propagarse a lo largo de la planta. Estos microorganismos pueden residir dentro de las células, en los espacios intercelulares, o en el sistema vascular (Kobayashi y Palumbo, 2000).

Algunas bacterias rizosféricas pueden colonizar el interior de raíces y tallos, mostrando que estas bacterias son una fuente de endófitos (Germaine *et al.*, 2004)

Después de un día de exposición de ciertas raíces de la planta a las bacterias, ellas pueden encontrarse en las partes aéreas de la planta. (Guo *et al.*, 2002) inocularon las raíces de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*.) cultivadas hidropónicamente con $4.55 \log \text{ UFC}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ de *Salmonellae* y al día siguiente encontraron que los hipocotilos, los cotiledones, y los tallos tuvieron alrededor de $3 \log \text{ g}^{-1}$ de UFC. La sistemática propagación de una cepa de *Burkholderia* endófito a las partes aéreas de *Vitis vinifera* parece ser a través del flujo de transpiración (Compant *et al.*, 2005).

2.5 Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las RPCV afectan el crecimiento y desarrollo de plantas por mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos incluyen fijación de N_2 , la movilización de nutrientes, a través de la producción de fosfatasas, sideróforos, o los ácidos orgánicos, y la producción de fitohormonas y enzimas (Lucy *et al.*, 2004; Khalid *et al.*, 2004a, b; Gray y Smith 2005; Cakmakci *et al.*, 2006; Tsavkelova *et al.*, 2007).

Indirectamente, las bacterias pueden ejercer una influencia positiva en el crecimiento de la planta disminuyendo ciertos efectos deletéreos de un organismo patógeno induciendo resistencia al patógeno en el hospedante o controlando el patógeno en la superficie de la raíz o produciendo quitinasas u otras sustancias supresivas de patógenos (Raj *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004; Van Loon y Glick 2004; Van Loon, 2007).

Aunque los científicos han reportado ambos mecanismos directo e indirecto para la estimulación del crecimiento por RPCV no existe una clara separación entre estos dos mecanismos. Ciertas bacterias poseen múltiples características para influir sobre el crecimiento de la planta donde una característica puede dominar sobre la otra (Shaharooni *et al.*, 2006a, Shaharooni *et al.*, 2008; Hafeez *et al.*, 2006).

Una bacteria que influye en el crecimiento de la planta liberando RCPs puede también jugar un rol en el control de patógenos de las plantas y enfermedades, y viceversa. Así que, la respuesta de la planta a las RPCV es un fenómeno complejo, y recientes adelantos en la investigación al nivel molecular han proporcionado una base suficiente para entender estos mecanismos con más precisión.

2.5.1 Fijación, movilización y captación de nutrientes

Los microorganismos del suelo pueden proporcionar nutrientes a las plantas a través de la fijación de N_2 atmosférico o reforzando la movilización nutriente, la captación a

través de sus actividades biológicas, tales como la mineralización y a través de la producción de sideróforos, ácidos orgánicos y fosfatasas, etc.

La fijación biológica de N_2 por rizobios y bacterias diazotróficas asociativas es un proceso espontáneo y es uno de los mecanismos ampliamente estudiados por los cuales las plantas se benefician de su interacción con su copartícipe. Las bacterias benefician a las plantas fijando N_2 en intercambio con el carbono fijado proporcionado directamente a las bacterias o indirectamente por el carbono liberado como exudados de la raíz.

Sin embargo, la obtención de beneficios máximos del diazótrofo biofertilizante en la finca requiere una estrategia sistemática diseñada para utilizar totalmente todos estos factores beneficiosos, permitiendo que los rendimientos de los cultivos sean mantenidos o incluso incrementados mientras las aplicaciones de fertilizantes se reducen (Kennedy *et al.*, 2004).

Numerosos estudios han mostrado que especies diferentes de bacterias fijan N_2 atmosférico y por consiguiente afecta el crecimiento y rendimiento de varios cultivos (Bai *et al.*, 2003; Afzal y Bano, 2008; Khalequzaman y Hossain, 2008; Figueiredo *et al.*, 2008).

Además de la fijación biológica de N_2 , también se conoce que las RPCV afectan la disponibilidad de nutrientes para la planta a través de la acidificación y cambios de redox o por la producción de quelantes férricos y sideróforos, y/o movilizandolos fosfatos de metales (Burd *et al.*, 2000; Romkens *et al.*, 2002; Abou-Shanab *et al.*, 2003).

Varios reportes han sugerido que las RPCV pueden estimular el crecimiento de la planta a través de su actividad solubilizadora de P (Khan *et al.*, 2007; Wani *et al.*, 2007; Afzal y Bano, 2008).

Además, (Wu *et al.*, 2005) informaron incrementos en la asimilación de nutrientes, como N, P, y K, en las plantas, en respuesta a la inoculación con solubilizadores de

P (*Bacillus megaterium*) y solubilizadores de K (*Bacillus mucilaginous*). Igualmente, se reportó que la inoculación con un solubilizador de fosfato *Bacillus* aislado M3 mejoró significativamente los contenidos de P, Fe, y Mn de las hojas de frambuesa (*Rubus idaeus*), haciendo pensar que *Bacillus* M3 solo o en combinación con algunas otras bacterias tuvo el potencial para aumentar la nutrición de las plantas de frambuesa, además del crecimiento y rendimiento.

El fósforo es uno de los requerimientos de nutrientes más esenciales en las plantas. Irónicamente, los suelos pueden tener gran reserva de fósforo total (P) pero las cantidades disponibles para las plantas son por lo general una pequeña proporción de este total. Esta baja disponibilidad de fósforo a las plantas es la causa de la gran mayoría de P en el suelo el que se encuentra en formas insolubles, mientras que las plantas sólo lo pueden absorber en dos formas solubles, la monobásicos (H_2PO_4) y los iones dibásicos (HPO_4^{2-}) (Richardson *et al.*, 2009)

Varios microorganismos pueden solubilizar fosfato a través de la conversión de la forma insoluble de fósforo a forma soluble mediante la acidificación, la secreción de ácidos orgánicos o protones (Richardson *et al.*, 2009) y la quelación y reacciones de intercambio (Hameeda *et al.*, 2008).

Varias bacterias y hongos saprófitos son reportados por los mecanismos de quelación para solubilizar fosfato en el suelo (Whitelaw, 2000).

La liberación de exudados de las raíces de plantas tales como ligandos orgánicos también puede alterar la concentración de P en la solución del suelo. La solubilización de fosfato se lleva a cabo a través de diversos procesos microbianos incluyendo la producción de ácido orgánico y extrusión de protones. En ciertos casos, la solubilización de fosfato es inducida por la necesidad de fosfato (Hinsinger, 2001)

Un bosquejo general de solubilización de fósforo en el suelo muestra que los géneros bacterianos como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Serratia* son reportados como solubilizadores de fosfato (Mehnaz y Lazarovits, 2006).

Las rizobacterias pueden solubilizar P de fuentes inorgánicas y mejorar el crecimiento y el rendimiento de las plantas de cultivo. Además, ejemplos de algunos solubilizadores de P se han reportado con diferentes especies microbianas íntimamente asociadas con un gran número de cultivos agrícolas como la papa, el tomate, el trigo, y otros como., entre estas especies microbinas están *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus circulans* y *Cladosporium herbarum*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas chlororaphis* y *P. putida* y *Rhizobium leguminosarum*. La capacidad de RPCV para solubilizar fosfato mineral, ha sido de gran interés para los microbiólogos agrícolas ya que puede mejorar la disponibilidad de fósforo para el crecimiento vegetal eficaz. lo que representa un posible mecanismo de la promoción de crecimiento de las plantas en condiciones de campo (Verma *et al.*, 2001).

2.5.2 Producción de sustancias reguladoras del crecimiento de la planta.

Las sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas (SRCP) son componentes orgánicos que están presentes de forma natural y que influyen sobre varios procesos fisiológicos en la planta tales como el alargamiento celular y la división de la célula.

Está bien establecido que la mayoría de los microorganismos del suelo pueden producir sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas, que incluyen fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno, y ácido abscísico) y enzimas (Frankenberger y Arshad, 1995; Glick, 1995; Khalid *et al.*, 2006) el cual es considerado como uno de los principales mecanismos de promoción del crecimiento por las RPCV.

La producción de SRCP por los microorganismos es afectado por la presencia de sustratos así como el tipo y la concentración de exudados. El inóculo en presencia de un precursor específico fisiológico de un RCP y/o inóculo que producen concentraciones fisiológicamente activas de fitohormonas puede ser muy eficaz promoviendo el crecimiento de la planta y reforzando la consistencia y

reproducibilidad (Frankenberger y Arshad, 1995; Arshad y Frankenberger, 1998, 2002).

Varios estudios han informado la habilidad de varias RPCV en la producción de auxinas *in vitro* e *in vivo* (Almonacid *et al.*, 2000; Khalid *et al.*, 2004a, b; Gravel *et al.*, 2007). Similarmente, la bacteria fototrófica purpúrea asociada a la planta (Serdyuk *et al.*, 1995) *Methylobacterium* sp. (Senthilkumar *et al.*, 2009) ha sido reportada con la capacidad de producir citoquininas *in vitro*.

Diferentes especies bacterianas como *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Escherichia coli* y muchos más se han informado como sintetizadores de sustancias promotoras del crecimiento de la planta incluyendo auxinas, giberelinas, citoquininas y ácido abscísico (Tuomi y Rosenquist, 1995; Karadeniz *et al.*, 2006; Tsavkelova *et al.*, 2007).

La microbiota del suelo también se conoce por producir la fitohormona gaseosa etileno *in vitro* e *in vivo* (Weingart *et al.*, 1999; Akhtar *et al.*, 2005).

Algunas RPCV pueden influir en el crecimiento de la planta alterando la síntesis de fitohormonas endógenas a través de la producción de enzimas específicas. Entre estas enzimas bacterianas la 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminasa juega un significativo papel en la regulación de una hormona de la planta, el etileno, y así en la modificación del crecimiento y desarrollo de las plantas (Arshad y Frankenberger, 2002; Glick, 2005).

Los aislados bacterianos con ACC deaminasa pueden por lo menos eliminar parcialmente el estrés inducido por el impacto negativo en las plantas por el etileno mediado por la conversión de la germinación semilla/raíz ACC en ketobutirato y amoníaco (Glick *et al.*, 1998).

Desde entonces, numerosas especies de bacterias Gram.negativas y Gram.positivas han sido reportadas como productoras de ACC deaminasa (Belimov *et al.*, 2005;

Sessitsch *et al.*, 2005; Blaha *et al.*, 2006; Stiens *et al.*, 2006; Shaharoon *et al.*, 2006a, 2006b, 2007a, 2007b, 2008; Shahzad *et al.*, 2008).

2.5.3 Efecto de las RPCV en el crecimiento de la planta

El potencial de las RPCV para mejorar el crecimiento y rendimientos de varios cultivos se ha documentado extensamente. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han conducido bajo ambientes controlados en lugar de condiciones naturales de campo. Los resultados de estos estudios han demostrado claramente que las RPCV poseen abundantes potenciales para reforzar el crecimiento y rendimiento de cultivos. Sin embargo, la selección de un aislado de RPCV funcionalmente eficaz es muy crítico, y las respuestas de la planta son a menudo variables dependiendo del aislado bacteriano, el genotipo de la planta, y los sitios experimentales. También se ha afirmado que la RPCV aislada de un cultivo específico o una zona ecológica es más eficaz en la producción de resultados consistentes si se vuelve a aplicar al mismo cultivo y en la misma zona ecológica (Chanway y Holl, 1992).

Esto podría ser debido a una mayor adaptabilidad de la RPCV introducida, proporcionada en la rizosfera, mientras la inconsistencia en las respuestas del mismo cultivo a la misma RPCV podría atribuirse a: (1) la pobre calidad del inoculo, (2) la vida corta de la RPCV, (3) carencia de sistemas estandarizados de entrega, y/o (4) el fracaso en el mantenimiento de la densidad requerida de la RPCV sobre las semillas o raíces. Por otra parte, la naturaleza y composición del material utilizado como portador de la RPCV también juega un papel significativo en la producción de su impacto en las plantas inoculadas.

Otro aspecto importante de estos ensayos es que los efectos de las RPCV han sido investigados bajo diferentes dosis de fertilizantes los cuales han afectado la eficacia

de las RPCV, llevando a una acción incoherente bajo diferentes agroecosistemas (Shaharoona *et al.*, 2008).

Considerando la alta demanda en el suministro de alimentos, es sabio hacer esfuerzos para mejorar la producción de los cultivos empleando las RPCV. También es pertinente que la mayoría de las investigaciones se han enfocado en los diazotrofos, los cuales fueron probados bajo diferentes dosis de aplicación de N. Podría ser muy útil si la RPCV seleccionada se probara bajo diferentes proporciones de los tres nutrientes mayores (N, P, y K) en lugar de sólo N. Además, el estado de fertilidad del suelo también debe ser considerado mientras se utilizan las RPCV junto con dosis específicas de fertilizantes de N, P, y K. Por consiguiente, el entendimiento apropiado de los mecanismos de acción de la RPCV seleccionada puede ayudar substancialmente en la obtención de respuestas consistentes en términos de mejoramiento del crecimiento y rendimiento de los cultivos. Si todos estos factores son considerados adecuadamente, en la agricultura se pueden obtener beneficios significativos de las RPCV basados en enfoques biotecnológicos (Shaharoona *et al.*, 2008).

Otro aspecto que requiere la atención urgente es la mejora de calidad del producto agrícola seguido de la inoculación de la RPCV. Desde que las RPCV ejercen su influencia a través de diferentes mecanismos, es muy probable que ellos pueden afectar la calidad del producto; desafortunadamente, la mayoría de los estudios han informado los efectos de las RPCV en el crecimiento y rendimiento de las plantas inoculadas en términos cuantitativos, pero muy poco es sabido sobre los parámetros de calidad del producto modificado por las inoculaciones con RPCV (Shaharoona *et al.*, 2008).

Los esfuerzos futuros deben, ser dirigidos hacia evaluar cómo la calidad de producto alimenticio es afectada por la RPCV, además de su rol en el crecimiento y desarrollo de plantas (Shaharoona *et al.*, 2008).

2.5.4 Las RPCV en una agricultura de estrés

Los cultivos agrícolas están expuestos a muchos estreses que son inducidos por factores bióticos y abióticos. Estos estreses invariablemente afectan el crecimiento de la planta y el rendimiento de los cultivos dependiendo del tipo e intensidad de los mismos. Bajo condiciones de estrés, como la salinidad, la sequía, aniego, metales pesados y patogenicidad, la producción de etileno en las plantas en proporciones substancialmente aceleradas es un rasgo muy común que adversamente afecta el crecimiento de la raíz y, por consiguiente, el desarrollo de las plantas. Ciertas RPCV reducen la síntesis del etileno por la metabolización del ACC (un precursor inmediato de biosíntesis del etileno en las plantas superiores) en un ketobutirato y amoníaco, y así mitiga el impacto negativo de los estreses bióticos y abióticos en las plantas (Saleem *et al.*, 2007).

Recientemente, varios autores han documentado profundos efectos de la inoculación con RPCV conteniendo ACC deaminasa en el crecimiento de las plantas bajo condiciones de estrés (Saleem *et al.*, 2007).

En el escenario actual donde se confrontan varios estreses bióticos y abióticos en la agricultura, el papel de las RPCV que contienen ACC deaminasa podría ser crucial para la producción sostenible de los cultivos. Sin embargo, algunos aspectos beneficiosos de estas RPCV bajo salinidad, sequía, aniego, biocontrol, temperatura, y estrés nutritivo y en la industria de flor cortada y en la nodulación de legumbres no han sido explotados a fondo (Khan, 2005).

2.5.5 Las RPCV como biofertilizantes

Los bioabonos son las sustancias o preparados a partir de microorganismos vivos que, cuando se aplican a las semillas o superficies de las plantas adyacentes al suelo pueden colonizar la rizosfera o las partes interiores de las plantas y por lo tanto promueven el crecimiento de la raíz (Bevivino *et al.*, 1998).

El término, biofertilizante no debe utilizarse entre intercambiadamente con abonos verdes, estiércol, intercalado o fertilizante químico-orgánico complementado. Curiosamente algunas especies RPCV son capaces de promover el crecimiento de plantas, actuando ambos como biofertilizante y bioplaguicidas. Algunas cepas de *Burkholderia cepacia* se han observado con características de biocontrol sobre *Fusarium* spp., mientras que también pueden estimular el crecimiento del maíz en condiciones pobres en hierro a través de la producción de sideróforos (Bevivino et al., 1998). *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* se reportan como las cepas RPCV promisorias para su capacidad de actuar como biofertilizantes (Vessey, 2003). La relación entre la RPCV y su anfitrión se pueden clasificar en dos niveles básicos de la complejidad: (1) rizosférico y (2) endofítico. En relación a las rizosféricas, los RPCV pueden colonizar la rizosfera, la superficie de la raíz o incluso los espacios intercelulares superficiales de raíces de las plantas (McCully, 2001). Los cambios en diferentes propiedades físico-químicas del suelo rizosférico tales como el pH del suelo, potencial de agua y la presión parcial de O₂ y exudados de la planta en comparación con el suelo no rizosférico pueden afectar a la capacidad de las cepas de RPCV para colonizar la rizosfera (Griffiths et al., 1999).

Las RPCV endofíticas residen dentro de los espacios apoplásticos de las plantas hospedantes. Hay una evidencia directa de la existencia de endofitos en los espacios intercelulares apoplásticos del tejido del parénquima (Dong et al., 1997) y el xilema (James et al., 2001). Los mejores ejemplos que se pueden citar son la simbiosis rizobio-leguminosa (Vessey, 2003). Por lo tanto, los medios por los cuales los RPCV mejoran el estado nutricional de las plantas hospederas y de este modo actúan como biofertilizantes se pueden clasificar en cinco áreas distintas, como la fijación biológica de N₂, el aumento de la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera, aumento de la superficie de la raíz, la mejora de las simbiosis beneficiosas y finalmente, las combinaciones de todos los modos anteriores de acción.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Aislamiento, caracterización morfológica, cultural y determinación de los mecanismos de acción de los aislados bacterianos en condiciones de laboratorio

3.1.1 Obtención de los aislados bacterianos

Los aislados bacterianos se obtuvieron a partir de la variedad de sorgo UDG-110 sembrada en suelo Pardo mullido medianamente lavado ubicado en la Estación Experimental Agrícola “Álvaro Barba Machado” perteneciente al Centro de Investigaciones agropecuarias de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas y de un suelo Ferralítico rojo típico ubicado en la zona de Toranzo, Remedios. Se tomaron muestras de suelo rizosférico y raíz a los 7, 30 y 60 días de ciclo del cultivo.

Se realizaron diluciones seriadas de estos dos suelos rizosféricos (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) a partir de 1g de suelo de las que fueron depositadas 100 μ L en tubos conteniendo medio nitrógeno fixation (NFb) semisólido y placas de Petri con agar nutriente (BIOCEN). El medio nitrógeno fixation (NFb) tenía la siguiente composición: ácido málico: 5.0 g; K_2HPO_4 : 0.5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.2 g; NaCl: 0.1 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 0.02 g; Solución de micronutrientes: 2 ml; solución de bromotimol azul (0.5% in 0.2N KOH): 2 ml; Fe(III) EDTA (1.64%): 4.0 ml; solución de vitaminas: 1.0 ml; agua destilada: 1.0 L; pH ajustado a 6.8. Para el medio semisólido se adicionó 0.5 g de agar y se Autoclaveó a 121°C por 15 min. La solución de micronutrientes poseía la siguiente composición: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0.4 g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.12 g; H_3BO_3 : 1.4 g; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$: 1.0 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$: 1.5 g; agua destilada: 1.0 L; y la solución de vitaminas: biotina: 10 mg; piridoxina HCL: 20 mg; agua destilada: 0.1 L.

De los tubos con el medio nitrógeno fixation (NFb) semisólido que presentaron un halo blanco por debajo de la superficie del medio se hicieron siembras en placas de Petri conteniendo agar nutriente y se agotó el contenido del asa de inoculación sobre el medio de cultivo hasta obtener cultivos puros, que se reinocularon nuevamente en medio nitrógeno fixation (NFb) para comprobar la formación del halo por los mismos.

En el caso de los aislados endófitos a partir de la raíz, se realizó la desinfección superficial de la misma con alcohol al 75% durante 1min y posteriormente fueron sumergidas en bicloruro de mercurio (HgCl_2) durante 2 min. Luego de la desinfección de las raíces se procedió al lavado intenso de las mismas (hasta 10 veces) con agua destilada estéril y se realizó la maceración de las mismas para su posterior siembra en placas. Del último lavado se tomaron 100 μL que se depositaron en placas de Petri conteniendo agar nutriente para comprobar que las bacterias provenían del interior de la raíz y no de la rizoplanea o alguna contaminación. Se realizaron diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} y se tomaron 100 μL que fueron diseminados sobre el medio con la espátula de Drigalski. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 72 horas.

3.1.2 Caracterización morfológica y cultural de los aislados bacterianos

Los aislados obtenidos se caracterizaron cultural y morfológicamente teniendo en cuenta diferentes parámetros como crecimiento de la colonia, color, viscosidad, bordes, elevación sobre el medio, morfología y respuesta al Gram (Pérez *et al.*, 2010).

3.1.3 Determinación de la producción de ácido-3-indolacético

Todas las bacterianas endófitas y rizosféricas previamente aisladas y seleccionadas y que contaban con al menos un parámetro diferente en el análisis morfológico se inocularon en medio líquido Agar Triptona Soya y fueron incubadas a 30°C durante 48 h para la determinación de la producción de auxinas (AIA) por las mismas, la cual se realizó mediante colorimetría y usándose el reactivo de Salkowski (Spaepen, 2008).

El reactivo de Salkowski consistió en la disolución de 12 g de FeCl_3 en 7.9 M de H_2SO_4 (Glickmann y Dessaux, 1995) para 1 L de agua destilada estéril. Luego de la reacción exotérmica, el frasco donde se realizó el reactivo se le aplicó una envoltura de papel lumínico para impedir que este se expusiera a la luz por ser fotosensible.

Para la medición de las proporciones de AIA producidas por los aislados se tomaron tubos eppendorf de 1.5 ml, en los cuales se añadió 750 µl de cada uno de los cultivos bacterianos y se centrifugaron por 5 minutos a 6000 rpm. Posteriormente se trasladó el sobrenadante para un nuevo tubo eppendorf y se le agregó 750 µl de reactivo Salkowski. La reacción se mantuvo a la oscuridad por 30 minutos y posteriormente se midió la absorbancia (DO_{530nm}) por espectrofotometría a 530 nm. Las concentraciones de AIA se estimaron usándose una curva estándar. Para el ploteo de la curva se realizaron diluciones seriadas de auxinas sintéticas a diferentes concentraciones, a las cuales se les añadió el reactivo Salkowski y se incubó por 30 minutos, midiéndose posteriormente la DO_{530nm} . En la curva se plotearon las densidades ópticas contra las concentraciones de auxinas sintéticas, este proceso ocurrió a las 48 hora a un pico máximo de producción auxinas.

3.1.4 Determinación de la solubilización de fosfatos

La solubilización de fosfatos se determinó utilizándose placas de Petri que contenían el medio Pikovskaya-PVK (Pikovskaya, 1948) con la siguiente composición por L: glucosa, 10 g; $Ca_3(PO_4)_2$, 5 g; $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 g; NaCl, 0.2 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g; KCl, 0.2 g; extracto de levadura, 0.5 g; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.002 g; and $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.002 g. Para la determinación de la solubilización de fosfatos se sembraron los aislados en el medio PVK y se midió en cm el halo alrededor de la colonia con una regla milimetrada, conjuntamente se determinó la modificación del pH utilizando un pHmetro marca HANNA en el medio NBRIP (Nautiyal, 1999) cuya composición para un L fue la siguiente: glucosa, 10 g; $Ca_3(PO_4)_2$, 5 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25 g; KCl, 0.2 g y $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 g. La reducción del pH a partir de inicial 7 puede indicar la producción de ácidos orgánicos relacionados con la solubilización de fosfatos.

3.1.5 Determinación del control del patógeno *Sclerotium rolfsii*

Durante el desarrollo de los experimentos en condiciones controladas se observó la presencia del patógeno *Sclerotium rolfsii* Sacc en los suelos Pardo mullido

medianamente lavado y el Ferralítico rojo típico y se aisló de ambos suelos y se conservó en medio PDA hasta ser utilizado en la pruebas de control por los aislados bacterianos (Fig. 3.1). El medio agar papa destroza (PDA) contenía la siguiente composición: papa pelada y cortada 200g; glucosa 10g; agar 15g; agua destilada 1L.

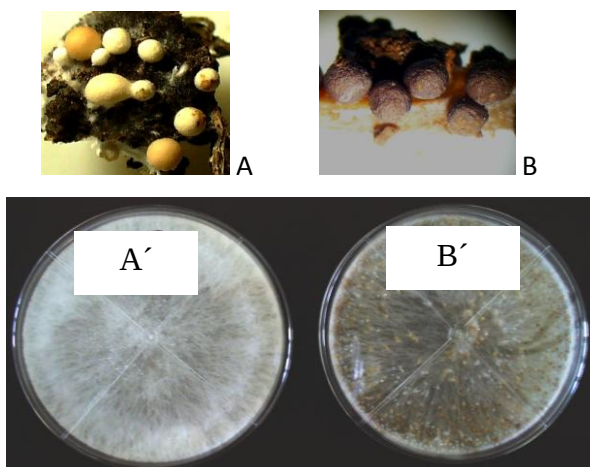


Fig. 3.1. Esclerocios en el suelo Pardo mullido medianamente lavado (A) y en el suelo Ferralítico rojo típico (B). Crecimiento del hongo en el medio agar papa destroza (PDA) aislado de ambos suelos respectivamente A' y B'.

El ensayo del control del hongo *Sclerotium rolfsii* se realizó por el método de enfrentamiento dual y se depositó en el centro de la placa con medio agar papa destroza (PDA) un disco de 1cm que contenía el patógeno proveniente de cada tipo de suelo y a su vez se realizaron cuatro orificios en el medio de cultivo en los que se depositaron 50µL en cada uno del cultivo en caldo nutriente de los aislados bacterianos seleccionados, las concentraciones de los aislados fueron superiores a 1.10^8 ufc contadas en cámara de Neubauer. Las placas fueron incubadas a 28°C durante 5 días en la oscuridad y se comprobó el control del patógeno midiendo el halo de inhibición en mm con una regla milimetrada.

3.2 Realización del experimento en condiciones de campo

3.2.1. Descripción del experimento

Para la realización del experimento en condiciones de campo se tuvieron en cuenta los resultados alcanzados en condiciones semicontroladas para selección de los aislados bacterianos con mayores capacidades en la estimulación del crecimiento vegetal.

Todos los aislados seleccionados se sembraron en medio caldo nutriente (UNI-CHEM) con la siguiente composición: peptona 10g, extracto de carne 3g, cloruro de sodio 5g y pH 7.4 ± 0.2 , en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Los cultivos bacterianos se mantuvieron en agitación continua durante 24 horas en una zaranda orbital marca GERHARDT a 130 rpm a una temperatura de 30°C. Luego de la incubación se realizó un conteo de células viables para disponer con títulos en cada uno de los cultivos de 10^8 a 10^9 ufc ml⁻¹. El conteo se realizó en cámara de Neubauer, colocando 1 µl (0.1 mm³) de cultivo en dicha cámara, realizando el conteo de células mediante la observación en microscopio óptico por cada muestra.

Para la peletización de las semillas de sorgo se utilizó casting proveniente de la fase intermedia del IBP que poseía las siguientes características pH (7.2), MO (48%). El casting fue tamizado por un tamiz de 0.5mm Ø y se saturó con el caldo nutriente conteniendo cada cultivo bacteriano según los tratamientos a aplicar y se dejó secar a la sombra durante 24 horas. Se utilizaron semillas de sorgo de la variedad UDG-110, las mismas se desinfectaron durante 1 minuto en etanol 75% y fueron lavadas intensamente (más de seis veces) con agua destilada estéril y peletizadas con almidón al 8% y casting inoculado con aislados bacterianos provenientes de la rizosfera e interior de la raíz del sorgo (Fig. 3.2).



Fig. 3.2. Peletización de las semillas de la variedad de sorgo UDG-110 con casting conteniendo cada uno de los aislados bacterianos.



Figura 3.4 Geolocalización del área experimental (R) donde se establecieron los tratamientos con los aislados rizosféricos y endófitos en la variedad de sorgo UDG-110, municipio de Remedios, provincia de Villa Clara.

El experimento se desarrolló en la finca “Camaco” perteneciente al municipio de Remedios, provincia Villa Clara (Fig. 3.4), en el período comprendido de diciembre del 2011 a abril del 2012, en un suelo Ferralítico rojo típico (Hernández *et al.*,1999).

Se utilizaron semillas de sorgo de la variedad UDG-110 peletizadas con almidón al 8% y casting inoculado con aislados bacterianos provenientes de la rizosfera e interior de la raíz del sorgo.

Se establecieron los siguientes tratamientos:

1. Control (sin peletización)
2. Aislado 4
3. Aislado 6
4. Aislado 19
5. Aislado 22
6. Aislado 24
7. Aislado 27

Las semillas peletizadas con los aislados bacterianos se sembraron a 0.70m x 0.05m a una profundidad de 2 o 3cm en cuatro parcelas ubicadas al azar, con 6.0m de largo y 4.20m de ancho. Para las determinaciones de rendimiento en biomasa y grano se muestrearon 4 plantas por réplica para un total de 16 por tratamiento.

Las atenciones fitotécnicas realizadas al cultivo fueron mínimas, semejantes a las empleadas en condiciones de una agricultura de bajos insumos y ellas fueron las siguientes:

- Control de malezas: se efectuaron dos limpiezas con azadón, las primeras en los primeros 30 días y la segunda a los 60 días.

- Riegos: se realizaron cuatro riegos con normas parciales brutas de 200-250 m³ ha⁻¹, el primero a los 10 días de germinado y los restantes a los 50, 70, 80 días posteriores a la misma.

3.2.2 Evaluaciones realizadas

- Diámetro del tallo (DT): medido en mm en la parte media del tallo mediante un Pie de Rey
- Altura de la planta (AP): medida en cm desde la superficie del suelo hasta el ápice de la panícula.
- En el caso del rendimiento agrícola se determinó a través de la evaluación de los componentes del rendimiento (a los 100 días) y de la biomasa (80 días).
- Área foliar total de la planta (AFT): se midió en cm el largo y el ancho de todas las hojas en la planta marcada por réplica y empleando el factor de corrección 0,62 se calculó el área foliar de dicha planta como la sumatoria del largo por ancho de sus hojas, multiplicada por el factor de corrección.
- Peso Fresco de Follaje y Raíz por separado (PFF y PFR) (g): recién cosechada se pesan en una balanza analítica
- Peso Seco de Follaje y Raíz por separado (PSF y PSR) (g): las muestras fueron puestas en la estufa a 65 °C durante 48 horas y luego fueron pesadas en una balanza analítica.

Los componentes del rendimiento evaluados fueron los siguientes:

- Largo de la panícula (LP): medida en cm desde la base hasta su ápice
- Peso de la panícula (PP): peso total en g, sin desgranarla
- Peso de los granos de la panícula (PGP): peso en g del total de granos de la Panícula.

- Peso de 100 granos de la panícula (P100): promedio en g de tres pesadas de 100 granos.
- Rendimiento potencial experimental (RPE): se estimó multiplicando el número de tallos existentes en dos metros lineales ($1,80 \text{ m}^2$) por la media del peso de los granos por panícula en cada réplica y luego se llevó este valor a t ha^{-1} .

3.3 Procesamiento estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete STATGRAPHIC Centurión XV sobre el sistema operativo Windows. Cada análisis se realizó teniendo en cuenta la normalidad de los datos a procesar.

Los resultados de las evaluaciones realizadas se compararon entre ellos para determinar las diferencias estadísticas individuales de los tratamientos mediante un análisis de varianza simple (*One-Way ANOVA*) y la prueba paramétrica de rangos múltiples de Tuckey HSD con nivel de significación $p < 0.05$. En todos los casos evaluados se realizó la verificación de varianza para conocer la homogeneidad de estos y por consiguiente seleccionar la prueba paramétrica o no paramétrica idónea a utilizar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Procedencia de los aislados bacterianos

Los aislados bacterianos con características más prominentes en la estimulación del crecimiento vegetal (comprobados en condiciones semicontroladas) en su mayoría fueron obtenidos en los primeros días de ciclo del cultivo, o sea, a los 7 y 30 días (tabla 4.1), lo cual presupone una pronta colonización y establecimiento de las bacterias en nichos asociados con la raíz y rizosfera lo que les permite a partir de aquí ejercer efectos sobre el crecimiento vegetal de la planta a través de diferentes modos o mecanismos de acción (Ghevariya y Desai, 2014).

Tabla 4.1. Procedencia de los aislados con mayores posibilidades en la estimulación del crecimiento vegetal.

Aislado (código)	Suelo	Días del muestreo	Procedencia	Medio de cultivo
4 (PNF-57)	Pardo	7	Rizosfera	NFb
6 (FE-55)	Ferralítico	7	Endófito raíz	Agar nutriente
19 (PRz-144)	Pardo	60	Rizosfera	Agar nutriente
22 (FNF-54)	Ferralítico	30	Rizosfera	NFb
24 (FRz-106)	Ferralítico	7	Rizosfera	Agar nutriente
27 (FRz-127)	Ferralítico	30	Rizosfera	Agar nutriente

4.2 Descripción morfológica y cultural de los aislados bacterianos

La caracterización cultural y morfológica de los aislados bacterianos muestra un crecimiento que va desde ligero o moderado hasta abundante en medio agar nutriente. El color de las colonias fue variable mostrando en su mayoría viscosidad, bordes regulares y elevación sobre el medio. La morfología predominante fue bacilo corto con respuesta negativa al Gram (tabla 4.2). En otras investigaciones autores como (Ngoma *et. al.*, 2014), al aislar y caracterizar 23 bacterias endófitas provenientes de las raíces de *Sorghum bicolor*, *Spinacia oleracea*, y *Zea mays* encontraron que fueron más frecuentes las Gram negativas con un 60.8%, mientras que las Gram positivas fueron el 39.1%.

Tabla 4.2. Caracterización cultural y morfológica de los aislados bacterianos.

Aislado	Crecimiento	Color	Viscosidad	Bordes	Elevación	Morfología	Gram
No. (código)							
4 (PNF-57)	+++	2*	++	++	++	CB	-
6 (FE-55)	+	3*	+++	+	++	BL	-
19 (PRZ-144)	++	3**	+++	+	+	BC	-
22 (FNF-54)	+	3*	+++	+	++	BC	-
24 (FRZ-106)	+	2***	+++	++	++	BC	-
27 (FRZ-127)	++	3*	+++	+	++	BC	-

Leyenda

Parámetro	Descripción
Crecimiento	(+) ligero (++) moderado (+++) abundante
Color	(2) Translucido (3) Opaco (2*) rosado translucido (2***) blanco translucido (3*) blanco opaco (3**) amarillo opaco
Viscosidad	(-) ninguna (+) ligero (++) moderado (+++) abundante
Bordes	(+) regular (++) irregular
Elevación	(+) plano (++) elevado
Gram	(+) positivo (-) negativo
Morfología	(BL) bacilo largo (BC) bacilo corto (CB) cocobacilo

4.3 Producción de ácido-3-indolacético y solubilización de fosfatos por los aislados bacterianos

Todos los aislados bacterianos fueron capaces de producir ácido-3-indolacético destacándose el 4 de manera muy significativa (tabla 4.3). Esta auxina es de gran importancia en el desarrollo de las plantas controlando importantes procesos fisiológicos que incluyen el aumento y división celular, la diferenciación de tejidos y la respuesta a la luz (Sang *et al.*, 2013)

La producción de reguladores del crecimiento por las bacterias promotoras del crecimiento vegetal puede alterar la arquitectura de la raíz y la promoción de desarrollo de la planta con la producción de diferentes fitohormonas como el ácido-3-indolacético, el ácido giberélico y las citoquininas (Kloepper *et al.*, 2007). Varias bacterias promotoras del crecimiento vegetal así como algunas especies patógenas, simbióticas y rizobacterias de vida libre son reportados como productores de ácido-3-indolacético y ácido giberélico en el suelo rizosférico y por lo tanto juegan un papel importante en el aumento de la superficie de la raíz y el número de pelos radicales de muchas plantas (Han *et al.*, 2005).

Investigaciones recientes sobre la síntesis de auxina por rizobacterias (Spaepen *et al.*, 2007) como productores de fitohormonas demostraron que las rizobacterias pueden sintetizar el ácido-3-indolacético a partir del triptófano por diferentes vías, aunque el mecanismo general de la síntesis de auxina se concentra básicamente en las vías triptófano independiente.

Las bacterias fitopatógenas utilizan la vía acetamida indol para sintetizar ácido-3-indolacético que ha sido implicado anteriormente en la inducción de tumores en las plantas.

(Swain *et al.*, 2007) informaron un efecto positivo de la producción de ácido-3-indolacético por cepas de *Bacillus subtilis* en *Dioscorea rotundata* L. Ellos aplicaron una suspensión de *B. subtilis* en la superficie de la planta, lo que resultó en un aumento en la relación raíz: tallo, así como el número de brotes en comparación con las plantas no inoculadas. La potencialidad de *Azotobacter* spp., para producir alta cantidad de ácido-3-indolacético (7,3 a 32,8 mg ml⁻¹) en la agricultura fue reportado por (Ahmad *et al.*, 2005). Del mismo modo, los

crecimientos significativos de brotes en maíz y arroz enanos mutantes fueron promovidos por giberelinas sustancias que fueron excretadas por *Azospirillum spp.* (Boiero et al., 2007).

Solo cuatro de los seis aislados utilizados en la investigación solubilizaron fosfato en medio pikovskaya, además todos redujeron el pH del medio NBRIP a partir del inicial (pH 7), destacándose el aislado 22 con un pH de 3.9. Al observar estos resultados se puede inferir que no solamente se produce la solubilización de fosfatos a través de la producción de ácidos orgánicos sino también a través de la posible acción de la enzima fosfatasa (tabla 4.3 y fig. 4.1), lo cual está en correspondencia con lo expresado por autores como (Wan y Wong, 2004).

Tabla 4.3. Producción de ácido-3-indolacético y pH en medio NBRIP de los aislados

Aislado	AIA ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	pH en medio NBRIP
No. (código)	(48 horas)	(72 horas)
4 (PNF-57)	145.56 a	5.7 d
6 (FE-55)	31.18 b	5.0 c
19 (PRz-144)	1.09 c	5.8 d
22 (FNF-54)	3.92 c	3.9 a
24 (FRz-106)	9.33 c	4.4 b
27 (FRz-127)	22.48 b	5.2 c
EE $\pm$	12.22	0.17

Letras desiguales en una misma columna difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD

La solubilización de fosfatos según (Fernández y Rodríguez, 2005) es propia de bacterias gram negativas, entre ellas *Pseudomonas cepacia*, *Erwinia herbicola* y *Burkholderia cepacia*. Distintos ácidos orgánicos tales como: el ácido oxálico, el malónico, el succínico y el glucónico han sido identificados y relacionados con este

proceso. La liberación de estos ácidos a la rizosfera provoca su acidificación y esto puede directamente incrementar la solubilización del fósforo.

Los microorganismos solubilizadores de fósforo constituyen hasta un 40 % de la población de bacterias del suelo y una porción significativa de ellos son aislados de la rizosfera (Martínez y Dibut, 2012).

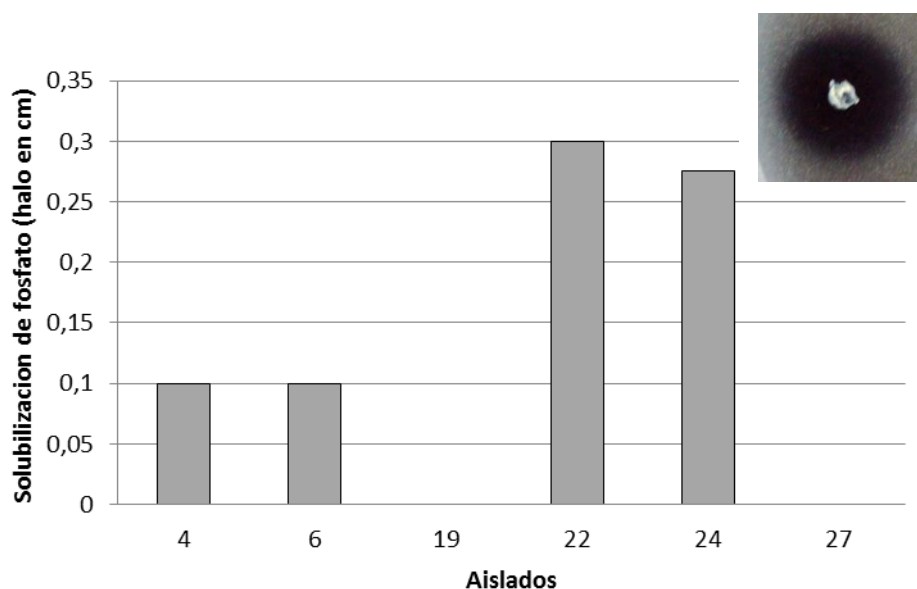


Figura 4.1. Solubilización de fosfato en medio pikovskaya (halo en cm). Detalle de halo de solubilización (Derecha arriba)

Según autores como (Goldstein y Krishnaraj, 2007), las bacterias solubilizadoras de fosfato, son microorganismos que pueden afectar el suministro de P para las plantas de diferentes maneras: (1) mediante la inmovilización de P en la biomasa microbiana, (2) por la descomposición enzimática de compuestos orgánicos de P, y/o (3) mediante la promoción de la solubilización de fosfatos insolubles. Los dos últimos mecanismos de liberación de ortofosfato inorgánico soluble (H_2PO_4^-) en la solución

del suelo, de la que puede ser absorbido por las raíces de las plantas. La capacidad de algunas bacterias transmitidas por el suelo para disolver fosfatos minerales fue observada por los investigadores, hace más de un siglo

La mayor parte de los primeros estudios se centraron en el aislamiento de microorganismos solubilizadores de P desde el suelo rizosférico y la caracterización de su actividad solubilizante de fosfato bajo condiciones in vitro. Aunque miles de bacterias solubilizadoras de fosfatos (BSF) se han aislado en el pasado, éstas pertenecen a solo a unos pocos géneros de bacterias, a saber: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Pantoea*, y algunos otros miembros de la familia Enterobacteriaceae. Especies pertenecientes al género *Rhizobium* y organismos relacionados también han sido identificados como BSF (Kampfer, 2007).

La producción de fertilizantes fosfatados solubles generalmente se logra mediante el tratamiento con ácido sulfúrico de roca fosfórica. Por lo tanto no es de extrañar que las bacterias acidófilas como por ejemplo *Acidithiobacillus* sp., sean capaces de oxidar compuestos reducidos del azufre como la pirita a ácido sulfúrico (H_2SO_4), y participar en la solubilización de P en los suelos. Por ejemplo, la adición de *Acidithiobacillus thiooxidans* (anteriormente *Thiobacillus thiooxidans*) y roca fosfática de bajo grado a un Oxisol provocó una rápida caída en el pH del suelo a niveles por debajo de 4,0 y un aumento en el nivel soluble-P (Muchovej et al., 1989).

La cantidad de P así solubilizado fue suficiente para el sostenimiento de sorgo (*Sorghum bicolor*) crecimiento en niveles similares a los obtenidos con superfosfato. Se obtuvieron resultados similares por (Stamford et al., 2007) con el uso de *A. ferrooxidans* y jícama (*Pachyrhizus erosus*), en suelos ácidos con bajo P disponible

Estos modos o mecanismos de acción son de gran importancia en la promoción del crecimiento vegetal del sorgo (Idris et al., 2009), (Suzuki et al., 2004) y presupone la

posible utilización de estas bacterias en productos biofertilizantes en condiciones de campo.

4.4 Control del patógeno *Sclerotium rolfsii* por los aislados bacterianos

Se puede observar que los aislados 4, 6, 24 y 27 fueron capaces de inhibir el crecimiento en el medio Agar papa destrozada (PDA) del hongo *Sclerotium rolfsii* proveniente de ambos tipos de suelos (Fig. 4.2 y 4.3).

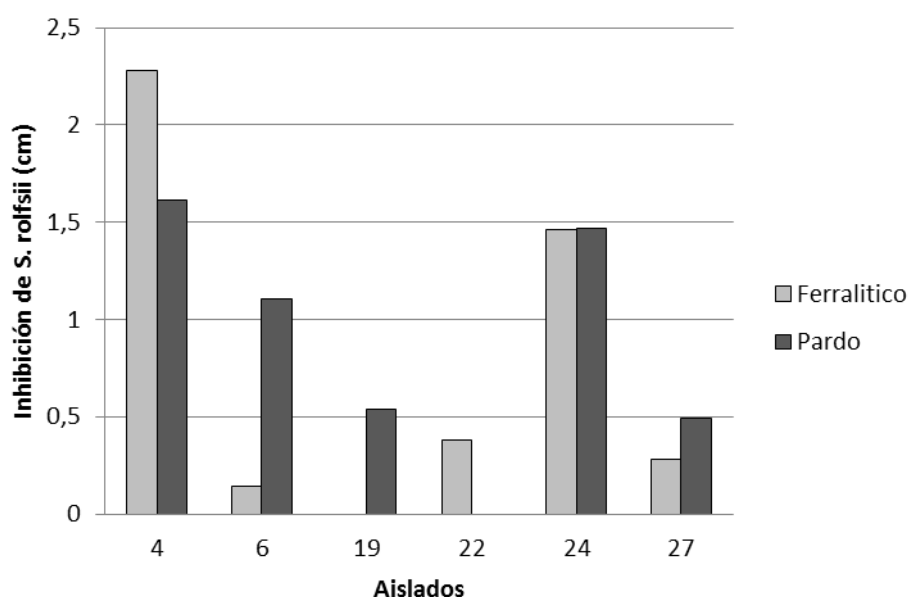


Fig.4.2. Inhibición del crecimiento del hongo *S. rolfsii* (cm) por los aislados bacterianos.

Dentro de los efectos indirectos de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal sobre el crecimiento de las plantas están los ejercidos en la prevención de efectos perjudiciales provocados por los microorganismos patógenos de éstas a través de la producción de metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de los patógenos (Farooq y Bano, 2013).

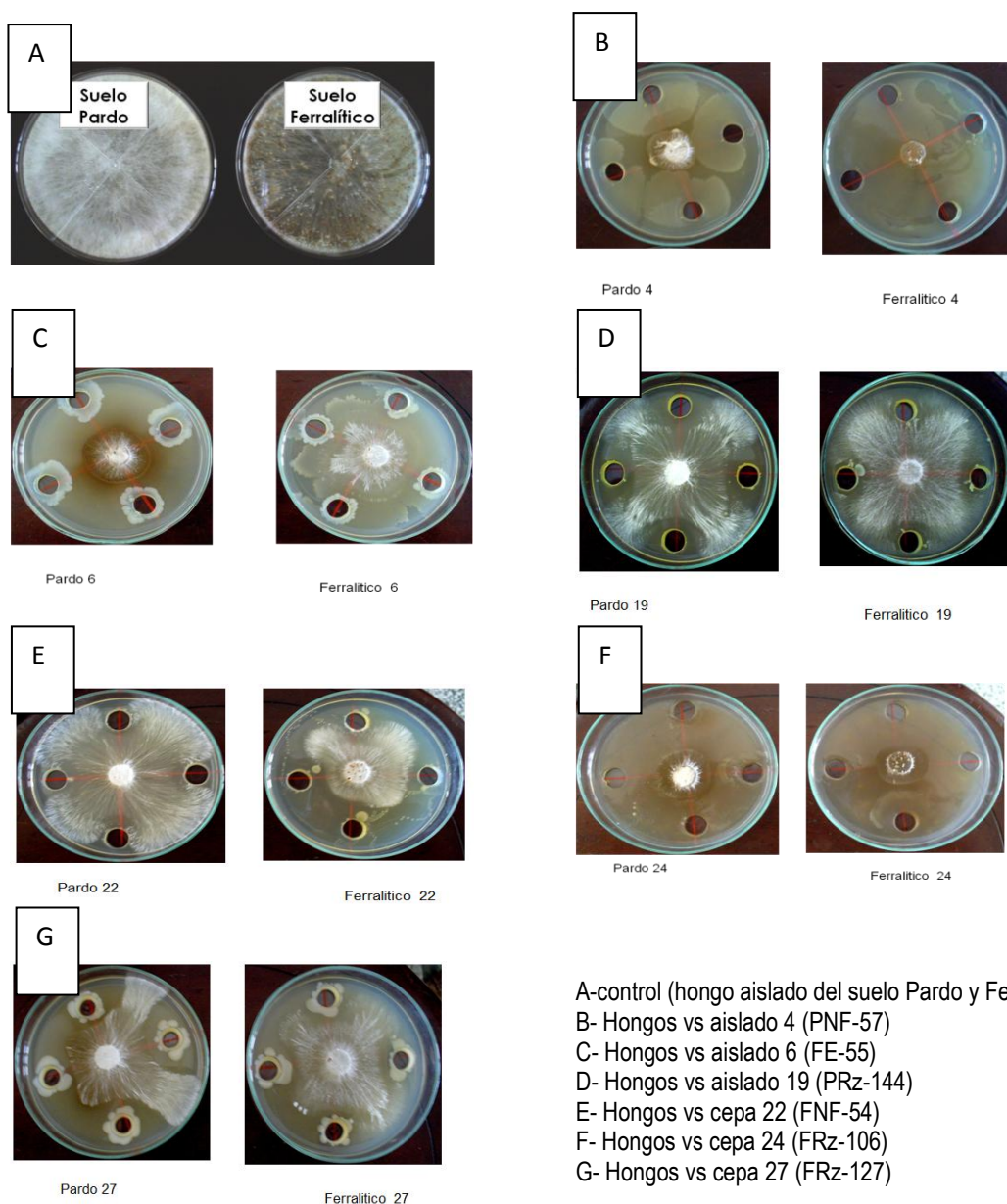


Fig. 4.3. Inhibición del crecimiento del hongo *S. rolfsii* por los aislados bacterianos.

Las rizobacterias pueden suprimir el crecimiento de diversos fitopatógenos de diversas formas, como compitiendo por los nutrientes y el espacio, lo que limita el suministro de Fe disponible a través de la producción de sideróforos, la producción de enzimas líticas y la antibiosis (Jing *et al.*, 2007).

Entre las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, las *Pseudomonas fluorescentes* son abundantemente reportadas por su amplio espectro de actividad antagonista contra un gran número de fitopatógenos. (Han *et al.*, 2005) han informado de la cepa *Delftia tsuruhatensis*

HR4, que suprime el crecimiento de diversos patógenos vegetales como *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani* y *Xanthomonas oryzae*.

4.5 Influencia de los aislados bacterianos sobre los parámetros morfofisiológicos del cultivo del sorgo

4.5.1 Evaluaciones a los 30 días

Cuando se analizan los valores de peso fresco y peso seco de las hojas, tallo y raíz a los 30 días de germinado el cultivo de sorgo (tabla 4.4) se aprecia que el aislado 24 sobresalió de manera positiva con respecto al resto de los tratamientos aunque en alguno de los parámetros evaluados no existió diferencias significativas como es el caso de los aislado 22 y 27. Este mismo aislado bacteriana 24 si presentó diferencias significativas en todos los pesos evaluados con respecto al tratamiento control.

Tabla 4.4. Influencia de las aislados bacterianos a los 30 días del ciclo del cultivo del sorgo sobre el peso fresco y seco de la planta.

Tratamiento	Peso fresco de las hojas (g)	Peso fresco del tallo (g)	Peso fresco de la raíz (g)	Peso seco de las hojas (g)	Peso seco del tallo (g)	Peso seco de la raíz (g)
Control	0.98 b	0.84 c	0.39 b	0.21 c	0.07 c	0.12 b
Aislado 4	2.55 b	1.98 bc	0.53 b	0.41 bc	0.15 bc	0.15 ab
Aislado 6	1.19 b	1.11 bc	0.28 b	0.23 c	0.08 c	0.11 b
Aislado 19	2.65 b	2.72 abc	0.83 ab	0.55 bc	0.19 bc	0.21 ab
Aislado 22	3.63 ab	3.87 abc	1.05 ab	0.76 abc	0.27 abc	0.32 ab
Aislado 24	5.61 a	5.93 a	2.35 a	1.22 a	0.45 a	0.81 a
Aislado 27	3.62 ab	4.40 ab	1.15 ab	0.83 ab	0.38 ab	0.41 ab
EE	0.59	0.75	0.34	0.12	0.06	0.14

Letras desiguales en una misma columna difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD

En cuanto al peso fresco y seco de toda la planta (Fig. 4.4) se observó que el tratamiento con el aislado 24 produjo los mayores efectos sobre estos parámetros sin diferencias significativas con los aislados 22 y 27 y si con el resto de las aislados y con el tratamiento control.

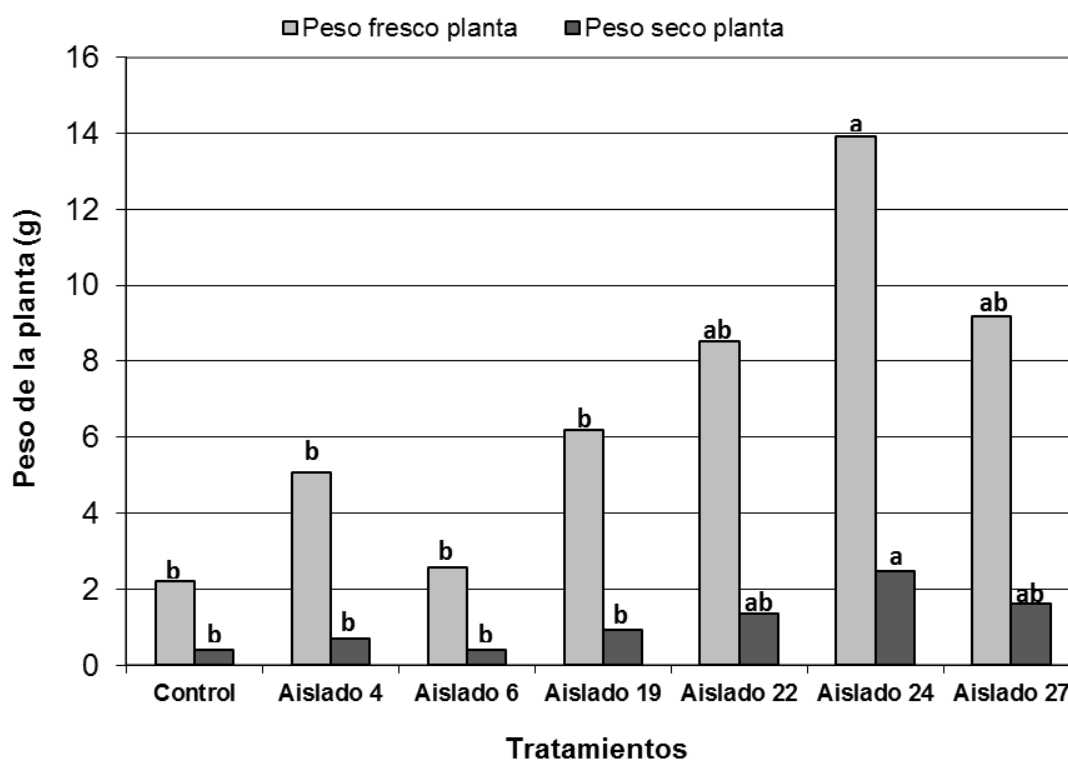


Fig 4.4. Influencia de las aislados bacterianos sobre el peso total de la planta a los 30 días de ciclo del cultivo (g). EE peso fresco: 1.64; EE peso seco:0.31

A los 30 días de ciclo del cultivo el mayor diámetro, altura de la planta y área foliar lo presentó el tratamiento con el aislado 24 sin diferencias con los de los aislado 27 y 22 y si con diferencias marcadamente significativas con el tratamiento control con dos o más veces el valor de cada parámetro evaluado por encima de este último (tabla 4.5).

Tabla 4.5. Influencia de los aislados bacterianos a los 30 días del ciclo del cultivo del sorgo sobre el diámetro del tallo, altura y área foliar.

Tratamiento	Diámetro del tallo (mm)	Altura de la planta (cm)	Área foliar cm ²
Control	5.35 c	36.15 d	64.12 c
Aislado 4	6.80 bc	44.23 cd	127.38 bc
Aislado 6	5.94 bc	37.73 d	78.57 c
Aislado 19	7.69 abc	48.35 bc	138.77 bc
Aislado 22	8.32 ab	57.33 ab	197.48 ab
Aislado 24	10.14 a	62.00 a	250.32 a
Aislado 27	7.73 abc	60.43 a	198.34 ab
EE	0.54	2.27	23.13

Letras desiguales en una misma columna difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD

El aislado 24 coinciden mecanismos o modos de acción como la solubilización de fosfatos y la producción de ácido-3-indolacético. También (Singh *et al.*, 2007) en estudios con sorgo y maíz plantean que el sistema radical determina la capacidad de la planta para acceder al agua del suelo y que su arquitectura puede influir en la adaptación a condiciones donde exista limitación de este recurso.

Estos resultados ponen de manifiesto que mediante el mecanismo de acción de la producción de AIA es posible obtener satisfactorios resultados respecto a la producción de semillas y biomasa del cultivo del sorgo. (Idris *et al.*, 2009) reportan el efecto beneficioso de diferentes aislados endofíticos sobre parámetros de crecimiento de cultivo del sorgo. En este sentido (Patten y Glick, 2002) reportan que varias especies de bacterias endofíticas de los géneros *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cerratia*, entre otros, pueden afectar positivamente las raíces y el follaje. (Singh *et al.*, 2007) reportan que el estudio en condiciones naturales de la

rizo-deposición de carbono sobre las bacterias endófitas, así como la interacción de componentes químicos, físicos y biológicos, en especial el efecto sobre la microflora rizosférica son estudios que deben encaminarse en aras de lograr una adecuada diversidad microbiana en los suelos.

(Asghar *et al.*, 2002) reportan la existencia de una positiva correlación entre la colonización de las raíces de plantas de sorgo por bacterias, la adecuada arquitectura de estos órganos, la producción de masa seca y la producción de AIA por las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, lo que se corrobora en el presente estudio con aislados bacterianos cubanos.

4.5.2 Evaluaciones a los 50 días

En las evaluaciones realizadas a los 50 días del ciclo del cultivo se apreció que el peso fresco y seco de las hojas, tallos y raíces fueron superiores en las plantas con los aislados 4 y 27 con diferencias marcadamente significativas con el aislado 19 y el tratamiento control (tabla 4.6). Los tratamientos con los aislados 4 y 27 a pesar de haber mostrado los mayores valores absolutos no mostraron diferencias estadísticas con los tratamientos que contenían los aislados 6, 22 y 24.

Los datos relacionados con el diámetro del tallo, la altura de la planta y el área foliar a los 50 días de ciclo del cultivo (tabla 4.7) fueron superiores en los tratamientos 4 y 27 sin diferencias significativas con los tratamientos donde se emplearon los aislados 22, 24 y 6, este último mantuvo diferencias significativas por debajo del aislado 4 y 27 solamente en el parámetro altura de la planta.

Tabla 4.6. Influencia de las aislados bacterianos a los 50 días del ciclo del cultivo del sorgo sobre el peso fresco y seco de la planta.

Tratamiento	Peso fresco de las hojas (g)	Peso fresco del tallo (g)	Peso fresco de la raíz (g)	Peso seco de las hojas (g)	Peso seco del tallo (g)	Peso seco de la raíz (g)
Control	4.63 b	3.50 b	1.75 ab	1.11 b	0.37 b	0.50 ab
Aislado 4	20.63 a	19.63 a	5.88 ab	4.04 a	1.91 a	1.74 a
Aislado 6	10.00 ab	8.88 ab	3.25 ab	2.02 ab	0.89 ab	0.96 ab
Aislado 19	4.50 b	3.63 b	1.00 b	1.36 b	0.47 b	0.39 b
Aislado 22	15.38 ab	13.63 ab	6.75 a	2.99 ab	1.35 ab	1.35 ab
Aislado 24	10.50 ab	9.63 ab	2.75 ab	2.26 ab	1.06 ab	0.68 ab
Aislado 27	20.50 a	20.25 a	7.00 a	4.12 a	2.04 a	1.58 ab
EE	2.73	2.85	1.25	0.56	0.28	0.29

Letras desiguales en una misma columna difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD

Estos resultados no coinciden con los reportados por (Oramas *et al.*, 2005) quien estudio la variedad UDG-110, la cual ha mostrado los mayores resultados productivos en nuestro país e iguala a la ISIAP Dorado - 52 - recomendada internacionalmente como testigo en comparaciones de variedades de sorgo. En ensayos reportados por (Cancio *et al.*, 2003); Lorenzo, 2004) al estudiar este cultivo del sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) con la aplicación de micorrizas reportan resultados similares en cuanto a estimulaciones de este parámetro lo que denota la importancia de la utilización de biofertilizantes en el mismo.

Por su parte las bacterias promotoras del crecimiento vegetal producen efectos sobre el crecimiento de la raíz es así que el tratamiento de semillas o esquejes en algunas plantas con bacterias no patógenas, tales como *Agrobacterium alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*,

Streptomyces, entre otras, induce la formación de raíces (Esitken *et al.*, 2003). Este fenómeno puede atribuirse a la producción de auxina, inhibición de la síntesis de etileno o mineralización de los nutrientes por bacterias promotoras del crecimiento vegetal eficientes (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

Se han reportado bacterias promotoras del crecimiento vegetal por su inmensa potencialidad para alterar varias vías hormonales que podrían explicar los diferentes cambios morfológicos en las plantas como un aumento de la tasa de elongación de raíces laterales, lo que resulta en más arquitectura en un sistema de raíz ramificado de las plantas (Erturk *et al.*, 2010).

Tabla 4.7. Influencia de los aislados bacterianas a los 50 días del ciclo del cultivo del sorgo sobre el diámetro del tallo, altura y área foliar.

Tratamiento	Diámetro del tallo (mm)	Altura de la planta (cm)	Área foliar (cm ²)
Control	8.50 bc	51.68 d	142.66 b
Aislado 4	13.53 a	81.50 ab	513.02 a
Aislado 6	10.63 abc	68.58 bc	321.32 ab
Aislado 19	7.27 c	58.40 cd	143.82 b
Aislado 22	11.98 abc	73.93 ab	446.28 a
Aislado 24	10.10 abc	73.75 ab	323.96 ab
Aislado 27	13.38 ab	87.13 a	591.05 a
EE	1.08	3.07	63.83

Letras desiguales en una misma columna difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD

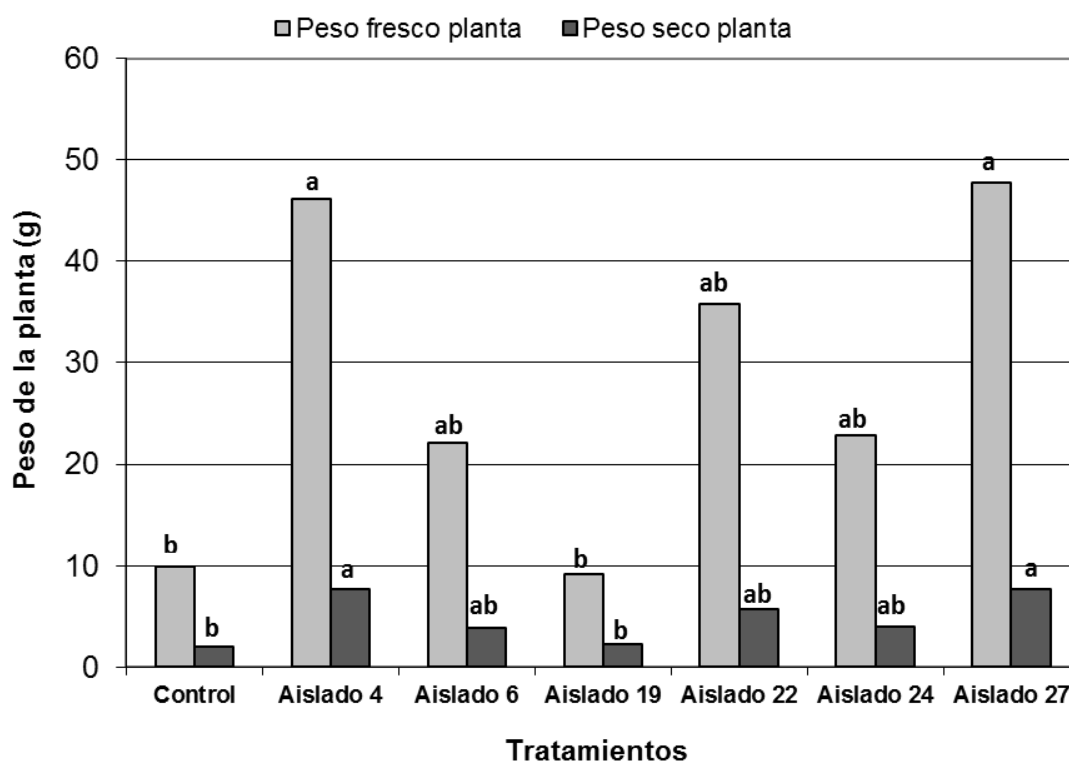


Fig 4.5. Influencia de las aislados bacterianos sobre el peso total de la planta a los 50 días de ciclo del cultivo (g). ES peso fresco:6.57; ES peso seco:1.06.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden cambiar la fisiología de las plantas y de ciertas propiedades nutricionales y físicas del suelo rizosférico e indirectamente influyen en los patrones de colonización de los microorganismos del suelo en esa región en particular. La inoculación de rizobacterias aumentó de la absorción de elementos nutrientes como Ca, K, Fe, Cu, Mn y Zn por las plantas a través de la estimulación de la ATPasa de la bomba de protones (Mantelin y Touraine, 2004).

Los reportes de las combinaciones de inoculantes a base de *Bacillus* y *Microbacterium* mejoraran la absorción de los elementos minerales por las plantas de cultivo (Karlidag *et al.*, 2007).

Este aumento en la absorción de nutrientes por las plantas podría ser explicado a través de la producción de ácido orgánico por las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, disminuyendo el pH del suelo en la rizosfera. La solubilización de las formas no disponibles

de nutrientes es uno de los criterios esenciales para facilitar el transporte de la mayoría de estos nutrientes (Glick, 1995).

4.6 Influencia de los aislados bacterianos sobre el rendimiento del sorgo

4.6.1 Producción de biomasa

La mayor estimulación del diámetro del tallo, peso y largo de la panícula se observó en el tratamiento con el aislado 24 (tabla 4.8) lo que refuerza el criterio de la incidencia de múltiples mecanismo en la promoción del crecimiento vegetal en esta bacteria.

Cuando se evaluó la altura de la planta a los 80 días del ciclo del cultivo los valores de este parámetro oscilaban entre 73.17 cm y 119.00cm para el tratamiento control y el aislado 22 respectivamente, lo cual corresponde en parte con los resultados planteados por Saucedo *et al.* 2005 quien expresó que la planta de la variedad UDG-110 se caracteriza porque su tallo alcanza una longitud medida de la base de la planta a la base de la panícula de 95 a 140 cm. en condiciones desfavorables y hasta 175 cm en ambientes idóneos.

(Rana, 1984) estima que el tipo óptimo de planta debe tener unos 175 cm de altura, por lo cual nuestras variedades, con alturas bastante mayores o menores que este valor, no cumplen este requisito. Sin embargo, aunque las variedades altas son inconvenientes para la mecanización de la cosecha, también pueden ser prometedoras para la producción de grano y forraje.

Tabla 4.8. Influencia de los aislados bacterianos a los 80 días del ciclo del cultivo del sorgo sobre el diámetro del tallo, la altura, peso de la panícula y largo de la panícula.

Tratamiento	Diámetro del tallo (mm)	Altura de la planta (cm)	Peso panícula (g)	Largo panícula (cm)
Control	0.91 b	73.17 b	11.33 c	15.50 c
Aislado 4	1.57 ab	112.20 a	35.83 bc	26.47 ab
Aislado 6	1.67 a	109.67 a	59.33 ab	26.77 ab
Aislado 19	1.36 ab	112.00 a	32.17 bc	24.67 ab
Aislado 22	1.57 ab	119.00 a	39.83 abc	20.67 bc
Aislado 24	2.06 a	111.33 a	76.33 a	28.00 a
Aislado 27	1.69 a	95.00 ab	46.17 abc	23.17 ab
EE±	0.15	7.26	8.00	1.37

Letras desiguales en una misma columna difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD

La relación de los parámetros evaluados previamente demuestra la correspondencia existente entre el crecimiento, la biomasa de las plantas y diferentes mecanismos de acción como la producción de auxinas como responsable de la estimulación de estos parámetros (Fig. 4.6). Este resultado demuestra que a medida que la producción de auxinas es adecuada, como se aprecia con los resultados obtenidos en el aislado 24, puede beneficiarse la masa fresca del follaje y por consiguiente los parámetros de crecimiento en la parte aérea de las plantas, así como en las raíces, con diferencias significativas con respecto al tratamiento control.

Esto anterior está dado por la capacidad que tienen las raíces de incrementar los procesos de absorción y traslocación de nutrientes tales como: P, N, K, Ca, Mg, Zn, Cu, Mo y B. (Koide, 1991 y Marschener y Dell, 1994). Resultados similares obtuvieron (Díaz *et al.*, 2001).

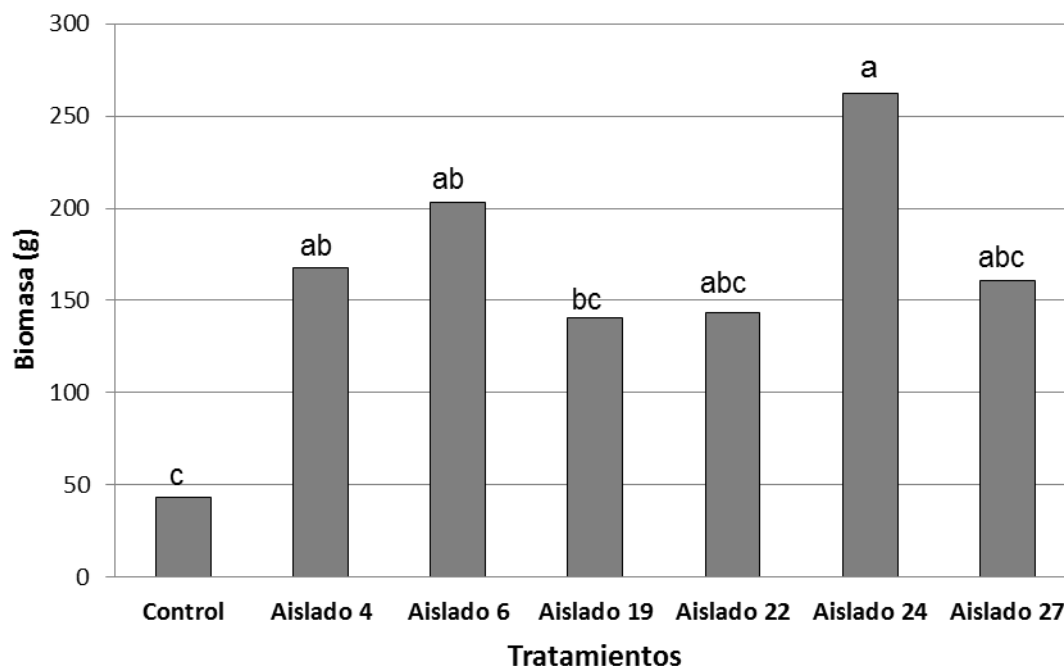


Fig 4.6. Producción de biomasa a los 80 días de ciclo del cultivo (g). EE: 24.84

4.6.2 Influencia de los aislados bacterianos sobre algunos componentes del rendimiento a los 100 días de ciclo del cultivo

Existió un resultado coincidente en el tratamiento con la aislado 24 al provocar elevados rendimientos en biomasa y también en grano lo cual se puede apreciar en la figura 4.6 y la tabla 4.9.

El aislado 4 a pesar de que no fue significativo su rendimiento en biomasa, si produjo los mayores valores en grano con 14.57 t ha^{-1} seguido del tratamiento con el aislado 24 con 13.21 t ha^{-1} lo cual demuestra la factibilidad de aplicación de la biofertilización de este cultivo doblando prácticamente el rendimiento con respecto al tratamiento control que fue de 6.42 t ha^{-1} .

Se observaron también los mayores valores en cuanto a peso de todos los granos y 100 granos en los aislados 4 y 24. Estos resultados son superiores a los reportados por (Cancio *et al.*, 2003) en el cultivo del sorgo, utilizando la misma variedad.

Tabla 4.9. Resultados obtenidos en el rendimiento del sorgo a los 100 días de ciclo del cultivo.

Tratamiento	Peso panícula con granos (g)	Largo panícula (cm)	Peso todos granos de la panícula (g)	Peso de 100 granos (g)	Rendimiento t ha ⁻¹
Control	28.36 a	19.13 a	22.46 a	2.85 a	6.42 a
Aislado 4	58.53 a	25.15 a	51.00 a	3.37 a	14.57 a
Aislado 6	46.15 a	25.05 a	40.79 a	3.31 a	11.65 a
Aislado 19	36.02 a	22.03 a	32.79 a	3.14 a	9.37 a
Aislado 22	29.49 a	18.77 a	26.69 a	3.08 a	7.63 a
Aislado 24	52.00 a	21.97 a	46.23 a	3.45 a	13.21 a
Aislado 27	30.11 a	19.85 a	27.83 a	3.00 a	7.95 a
EE	8.18	1.50	7.26	0.20	2.07

Letras desiguales en una misma columna difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD

El peso de la panícula es de gran importancia a la hora de tener en cuenta el rendimiento, observándose que no existieron diferencias desde el punto de vista estadístico pero si numéricas que indican la tendencia a ser mayores los valores en los tratamiento donde se aplicaron los aislados 4, 6 y 24. Resultados similares respecto a dicho componente obtuvieron (Cancio *et al.*, 2003) en el cultivo del sorgo, var. UDG-110

Con respecto al largo de la panícula no se observaron diferencias significativas solo la tendencia a ser mayor el valor en los aislados 4 y 6, con valores de 25.15cm y 20.05 cm respectivamente. Este parámetro generalmente esta correlacionado con los principales componentes del rendimiento como el número de grano y su peso (Puente y Rodríguez, 1995; Martínez, 1996). Resultados similares obtuvo (Arredondo, 2000).

Estos resultados no coinciden con los planteados por (Martín *et al.*, 1993) en relación al rendimiento, bajo las condiciones edafoclimáticas y de agrotecnia mínima dadas, en todas las variedades se calcularon rendimientos experimentales superiores a los alcanzados en la práctica agrícola con la variedad UDG-110, que alcanza valores entre 1,5 y 5 t ha⁻¹. (Puente y Rodríguez, 1995) y (Rodríguez *et al.*, 2007), encontraron correlaciones significativas entre estos caracteres del rendimiento. Por otra parte se puede observar que los incrementos en valores porcentuales del rendimiento en la aislado 4 y 24 con respecto al tratamiento control fueron de un 127.07% y 105.83% (Fig 4.7). En otros estudios al trabajar con micorrizas en el cultivo del sorgo (Lorenzo, 2004) obtuvo incremento en valores superiores a un 400% de las plantas micorrizadas con respecto al testigo.

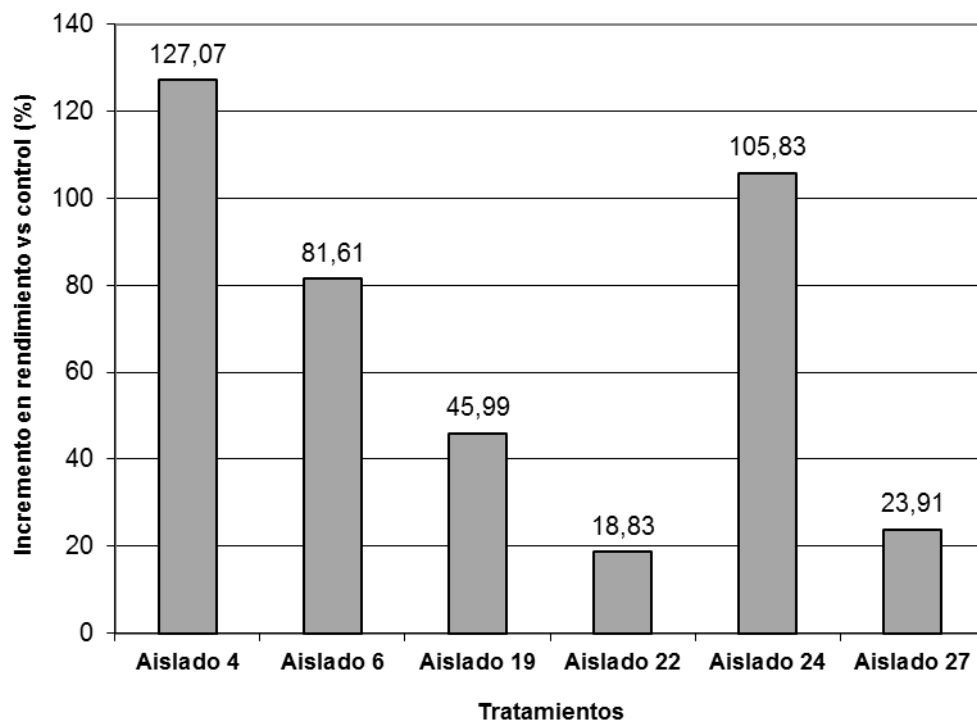


Fig. 4.7. Incremento del rendimiento con respecto al tratamiento control en porciento.

Los resultados obtenidos en el rendimiento del cultivo del sorgo evidencian la importancia de la utilización de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal y su potencial para estimular el crecimiento de las plantas a través de sus diversos mecanismos de acción.

La aplicación de cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la agricultura es una solución potencial ante el aumento de la demanda en nuestro país de alimentos y la mejora de la calidad ambiental. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se han utilizado continuamente para mejorar el crecimiento de las plantas, la germinación de semillas y rendimiento global de los cultivos en diferentes agroecosistemas (Minorsky, 2008).

La inoculación de especies de bacterias promotoras del crecimiento vegetal podría aumentar el crecimiento de parámetros como el área foliar, el contenido de clorofila y, por consiguiente, la biomasa total de las plántulas de Musa en hidroponía exentos de nitrógeno en comparación con el control no inoculado (Baset Mia *et al.*, 2010).

Dobbelaere *et al.*, 2001) evaluaron el efecto de la inoculación de *Azospirillum* sp., sobre el crecimiento de algunas plantas agrícolamente importantes y se observó un aumento significativo en el peso seco tanto del sistema de raíces y las partes aéreas de las plantas inoculadas con RPCV, lo que resulta en un mejor desarrollo y la floración.

La longitud total de la raíz, superficie y volumen de las mismas aumentó después de la inoculación con *Pseudomonas fluorescens* 92rk y P190r en tomate y pepino (Saravanakumar y Samiyappan, 2007).

Las RPCV inducen cambios en las capas externas de la corteza de la raíz debido a la mejora de las divisiones de células en los extremos de las raíces de las plántulas de maíz y trigo (Baset Mia *et al.*, 2010).

Semillas de diversos cultivos y plantas ornamentales bacterizadas con una mezcla de RPCV y rizobios antes de la siembra produjeron como resultado un aumento del crecimiento y resistencia a las enfermedades (Zehnder *et al.*, 2001).

(Khalid *et al.*, 2004) observaron las respuestas del crecimiento de trigo después de la inoculación con rizobacterias y sugirió que el crecimiento del trigo depende básicamente de una serie de factores como el genotipo de la planta, la naturaleza de inoculantes RPCV, así como las condiciones ambientales.

Las interacciones entre *Acaulospora* y *Azospirillum* y su efecto sinérgico sobre el crecimiento de arroz con diferentes fuentes y los regímenes de fósforo del suelo también se ha estudiado por (Ahanthem y Jha, 2008). Los resultados de indican la influencia de inoculantes microbianos en la reducción de la demanda de fertilizantes inorgánicos por 50%.

4.7 Valoración económica de los resultados

Para la realización de la valoración económica se tuvo en cuenta los siguientes elementos:

Las normas de siembra para la producción de sorgo granífero son de 10-12 kg ha⁻¹. Cuando el sorgo es para producción se vende por la Empresa de semillas a \$186.00 MN por qq.

Como no existe antecedente de producción del posible inóculo que puede constituir cada aislado bacteriana extrapolaremos el precio de la producción del kg de inóculo de *Rhizobium* que produce el Laboratorio Provincial de Suelos de Villa Clara que es de \$13.00 MN por cada kg.

Si se quiere peletizar 1 kg de la semilla de sorgo se necesitan 0.4 kg de casting, por tanto para peletizar 12 kg de semilla se necesitan 4.8 kg aproximadamente 5 kg que costarían \$ 65.00MN.

Los resultados indican que cuando se utiliza los aislado 4 y 24 las ganancias son superiores a los demás tratamientos con 58746.20\$MN ha⁻¹ y 53256.61\$MN ha⁻¹ lo cual incluso se justifica ampliamente cuando se observa el incremento con respecto al tratamiento control con un valor de 32897.14\$MN ha⁻¹ y 27407.55. De igual forma ocurre para el resto de los aislados que mostraron diferencias monetarias positivas con respecto al tratamiento control (tabla 4.10).

Tabla 4.10. Resultados económicos obtenidos con los tratamientos aplicados.

Tratamiento	Costo del inóculo \$MN Para 12kg semilla	Rend t ha ⁻¹	Ingreso \$MN ha ⁻¹	Ganancia \$MN ha ⁻¹	Diferencia monetaria vs control \$MN ha ⁻¹
Control	0	6.42	25914.06	25849.06	-
Aislado 4	\$65.00MN	14.57	58811.20	58746.20	32897.14
Aislado 6	\$65.00MN	11.65	47024.74	46959.74	21110.68
Aislado 19	\$65.00MN	9.37	37821.61	37756.61	11907.55
Aislado 22	\$65.00MN	7.63	30798.18	30733.18	4884.12
Aislado 24	\$65.00MN	13.21	53321.61	53256.61	27407.55
Aislado 27	\$65.00MN	7.95	32089.84	32024.84	6175.78

El éxito y la comercialización de las cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal dependen de los vínculos entre las organizaciones científicas y las industrias. Según (Nandakumar *et al.*, 2001) las diferentes etapas en el proceso de comercialización incluyen el aislamiento de cepas antagonistas, la selección, ensayos en macetas y la eficacia en el campo, la producción en masa y desarrollo de la formulación, los métodos de fermentación, la viabilidad de la formulación, la toxicología, los vínculos industriales y control de calidad. Por lo tanto, el aislamiento de una cepa de efectiva es un criterio principal para un mejor desarrollo agrícola, que normalmente se realiza a partir de suelos supresores de patógenos, ya sea mediante la técnica de dilución placa o por cebo el suelo con estructuras micóticas, tales como esclerocios (Nakkeeran *et al.*, 2005). La selección de la mejor cepa antagonista se lleva a cabo mediante el screening para la acción antimicrobiana frente a diversos patógenos transmitidos por el suelo, aparte del patógeno diana. La planta, patógeno y antagonistas son entonces coexpuestos a las condiciones ambientales controladas.

Antagonistas prometedores se prueban aún más por su eficacia en ensayos de campo junto con fungicidas recomendados estándar (Pengnoo *et al.*, 2000).

La producción en masa se logra a través sustratos líquidos (Manjula y Podile, 2001), semisólidos y técnicas de fermentación sólida. Por otra parte, el éxito comercial de las cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal requiere de la demanda económica y de un mercado viable, la acción de espectro consistente y amplio, la seguridad y la estabilidad, vida útil larga, los bajos costos de capital y de fácil disponibilidad de materiales de producción. Por lo tanto, el primer requisito para la iniciativa empresarial requiere de una solicitud de patente de la cepa identificada. Control de calidad en este paso es crucial para mantener la confianza de los agricultores sobre la eficacia de la cepa antagónica. Invenciones de investigación procedentes de China, Rusia y otros países occidentales han demostrado el uso potencial de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal hacia el control de enfermedades de las plantas.

En China, estas bacterias promotoras del crecimiento vegetal han sido aplicadas con éxito pleno por más de dos décadas sobre una superficie de 20 millones de hectáreas de diferentes cultivos. Debido a la potencialidad de *Bacillus* spp., más de 20 diferentes productos comerciales a base de *Bacillus* se venden en China para mitigar las enfermedades transmitidas por el suelo (Backman *et al.*, 1997).

Además, *Bacillus* spp., y otras pertenecientes a los géneros tales como *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bulkholderia*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* también se utilizan para la producción de varios productos comerciales, (Nakkeeran *et al.*, 2005). Además, la potencialidad de producir inoculantes a partir de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la mejora de los rendimientos de cultivos de importancia agrícola como el sorgo es algo que no debe ser ignorado en nuestro país reportando ventajas desde el punto económico y medioambientales contribuyendo de manera significativa a la promoción de una agricultura sostenible.

5. CONCLUSIONES.

1. Los aislados bacterianos fueron en su mayoría bacilos cortos Gram negativos con un crecimiento desde ligero a moderado hasta abundante en medio agar nutriente. El color de las colonias fue variable mostrando en su mayoría viscosidad, bordes regulares y elevación sobre el medio.
2. Todas las bacterias produjeron ácido-3-indolacético (destacándose el aislado 4) cuatro de ellas solubilizaron fosfatos (4, 6, 22 y 24), y cuatro (4, 6, 24 y 27) controlaron al patógeno *Sclerotium rolfsii* Sacc proveniente de los dos tipos de suelos.
3. Los aislados 4 y 24 fueron los que más estimularon el crecimiento vegetal en el cultivo del sorgo incidiendo sobre varios parámetros morfofisiológicos del mismo.
4. Los aislados 4, 6 y 24 produjeron los mayores efectos sobre el rendimiento del cultivo con 14.57 t ha⁻¹; 11.65 t ha⁻¹ y 13.21 t ha⁻¹ respectivamente.
5. El aislado 4 presentó los mejores resultados económicos con una ganancia de 32897.14 \$MN ha⁻¹.

6. RECOMENDACIONES

1. Identificar por técnicas moleculares los aislados bacterianos utilizados en el experimento.
2. Experimentar la coinoculación de los mejores aislados para su posible introducción como biofertilizante comercial.
3. Realizar estos estudios con otras variedades de sorgo y otros tipos de suelos con vistas a evaluar su empleo a un mayor escalado.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Shanab RI, Angle JS, Delorme TA, Chaney RL, van Berkum P, Moawad H, Ghanem K, Ghazlan HA (2003) Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by *Alyssum murale*. *New Phytol* 158:219–224
- Afzal A, Bano A (2008) Rhizobium and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). *Int J Agri Biol* 10:85–88
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2005) Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk J Biol* 29:29–34
- Ahmad R, Arshad M, Khalid A, Zahir ZA (2008) Effectiveness of organic-/bio-fertilizer supplemented with chemical fertilizers for improving soil water retention, aggregate stability, growth and nutrients uptake of maize (*Zea mays* L.). *J Sust Agri* 31:57–77
- Akhtar MJ, Arshad M, Khalid A, Mehmood MH (2005) Substrate-dependent biosynthesis of ethylene by rhizosphere soil fungi and its influence on etiolated pea seedlings. *Pedobiologia* 49:211–219
- Almonacid S, Quintero N, Martinez M, Vela M (2000) Determination of quality parameters of bacterial inocula based on liquid formulation elaborated with strains producing indole acetic acid (IAA). Auburn university website <http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscript/almonacid.pdf>
- Amor FMD, Martinez AS, Fortea MI, Legua P, Delicado EN (2008) The effect of plant-associative bacteria (*Azospirillum* and *Pantoea*) on the fruit quality of sweet pepper under limited nitrogen supply. *Sci Hortic* 117:191–196
- Arredondo, Q. L. (2000). Estudio comportamiento de variedades de sorgo granifero (*Sorghumbicolor* (L) Maench.). Trabajo de diploma en opción al titulo de ingeniero Agrónomo. UCLV.p.33
- Arshad M, Frankenberger WT Jr (1998) Plant growth regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Adv Agron* 62:146–151
- Arshad M, Frankenberger WT Jr (2002) Ethylene: agricultural sources and applications. Kluwer Academic, New York

- Arshad M, Khalid A (2008) Annual report. University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan
- Arshad M, Saleem M, Hussain S (2007) Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends Biotechnol* 25:356–362
- Asghar HN, Zahir Z.A, Arshad M and Khalig A (2002). Plant growth regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Adv agron* 62: 146-151.
- Ayala, M, D. (1994). Efecto del régimen hídrico en la producción y calidad del tomate GC'793 cultivado en invernadero. Trabajo de fin de carrera. Universidad politécnica de Venecia. Escuela universitaria de ingeniería Técnico Agrícola de Orihuela. P.77
- Azevedo, J. L., Maccheroni, W., Jr., Pereira, J. O. and de Araujo, W. L. (2000). Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electron. J. Biotechnol.* 3: 258-269.
- Backman PA, Wilson M, Murphy JF (1997) Bacteria for biological control of plant diseases. In: Rechcigl NA, Rechcigl JE (eds) Environmentally safe approaches to crop disease control. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 95–109
- Bai Y, Zhou X, Smith DL (2003) Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci* 43:1774–1781
- Banchio E, Bogino PC, Zygadlo J, Giordano W (2008) Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochem Syst Ecol* 36: 766–771
- Baset Mia MA, Shamsuddin ZH, Wahab Z, Marziah M (2010) Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured *Musa* plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. *Aust J Crop Sci* 4(2):85–90
- Belimov AA, Hontzeas N, Safronova VI, Demchinskaya SV, Piluzza G, Bullitta S, Glick BR (2005) Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biol Biochem* 37:241–250

- Bevivino A et al (1998) Characterization of a free-living maize rhizosphere population of *Burkholderia cepacia* : effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiol Ecol* 7(3):225–237. doi:10.1111/j.15746941.1998.tb00539.x
- Blaha D, Prigent-Combaret C, Mirza MS, Moenne-Loccoz. Y. (2006) Phylogeny of the 1-aminocyclopropane- 1-carboxylic acid deaminase encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol Ecol* 56: 455–470
- Burd GI, Dixon DG, Glick BR (2000) Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal
- Cakmakci R, Doğanmez F, Aydın A, Şahin F (2006) Growth promotion of plants by plant growth promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biol Biochem* 38:1482–1487
- Cancio, M.; D. Lozano y A. Álvarez. (2003). Caracterización de interacciones existente en el agroecosistemas sorgo en la Estación Experimental Álvaro Barba Machado de la UCLV. Trabajo de Curso. P.33
- Chanway CP, Holl FB (1992) Influence of soil biota on Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedling growth: the role of rhizosphere bacteria. *Can J Bot* 70:1025–1031
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clement, C., and Ait Barka, E. (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1685-1693.
- Contesto C, Desbrosses G, Lefoulon C, Bena G, Borel F, Galland M, Gamet L, Varoquaux F, Touraine B (2008) Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on *Arabidopsis* indicate.
- Dell'Amico E, Cavalca L, Andreoni V (2008) Improvement of *Brassica napus* growth under cadmium stress by cadmium-resistant rhizobacteria. *Soil Biol Biochem* 40:74–84
- Díaz, Caridad; Martha, Gómez; Álvarez, M; Martha Laurencia Silva.(2001) Biofertilización del cultivo de la Habichuela (*Phaseolus vulgaris*) en condiciones de organopónicos. *Rev. Centro Agrícola* No2, Año 28 abril-junio p 66.

- Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D et al (2001) Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. Aust J Plant Physiol 28:871–879
- Dong Z, McCully ME, Canny MJ (1997) Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. Ann Bot 80:147–158
- Erturk Y, Ercisli S, Haznedar A, Cakmakci R (2010) Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) stem cuttings. Biol Res 43:91–98
- Esitken A, Karlidag H, Ercisli S, Turan M, Sahin F (2003) The effect of spraying a growth promoting bacterium on the yield, growth and nutrient element composition of leaves of apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacıhaliloglu). Aust J Agric Res 54(4):377–380
- FAO. (1995). El sorgo y el mijo en la nutrición humana. (Colección FAO:
- FAO. (2008). El sorgo y el mijo en la nutrición humana. (Colección FAO: Alimentación y Nutrición No. 27) ISBN 92-5-303381-9. [Consultado 25/06/2010]. Disponible en la World Wide Web
- Farooq,U. y Bano A. (2013) Screening of indigenous bacteria from rhizosphere of maize (*Zea Mays* L.) for their plant growth promotion ability and antagonism against fungal and bacterial pathogens. The Journal of Animal & Plant Sciences, 23(6): 2013, Page: 1642-1652
- Figueiredo MVB, Martinez CR, Burity HA, Chanway CP (2008) Plant growth promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in - the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). World J Microbiol Biotechnol 24:1187–1193
- Frankenberger WT Jr, Arshad M (1995) Phytohormones in soils: microbial production and function. Marcel Dekker, New York
- Germaine, K., Keogh, E., Garcia-Cabellos, G., Borremans, B., Van der Lelie, D., Barac, T., Oeyen, L., Vangronsveld, J., Moore, F. P., Moore, E. R. B., Campbell, C. D., Ryan, D., and Dowling, D. N. (2004). Colonisation of poplar trees by gfp

- expressing bacterial endophytes. FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Ecol. 48:109-118.
- Ghevariya K.K.; Desai P.B. (2014) Rhizobacteria of sugarcane: In vitro screening for their plant Growth Promoting potentials. Research Journal of Recent Sciences Vol. 3, 52-58 Res. J. Recent. Sci.
- Glick BR (1995) the enhancement of plant growth by free living bacteria. Can J Microbiol 41:109–117
- Glick BR (2003) Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. Biotechnol Adv 21:383–393
- Glick BR (2005) Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. FEMS Microbiol Lett 251:1–7
- Glick BR, Penrose DM, Li J (1998) A model for lowering plant ethylene concentration by plant growth promoting rhizobacteria. J Theor Biol 190:63–68
- Goldstein AH, Krishnaraj PU (2007) Phosphate solubilizing microorganisms vs. phosphate mobilizing microorganisms: what separates a phenotype from a trait? In: Velazquez E, Rodri'guez-Barrueco C (eds) First international meeting on microbial phosphate solubilization. Springer, Dordrecht, pp 203–213
- Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ (2007) Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biol Biochem 39:1968–1977
- Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. Soil Biol Biochem 37:395–
- Guo JH, Qi HY, Guo YH, Ge HL, Gong LY, Zhang LX, Sun PH (2004) Biocontrol of 412.
- Griffiths BS, Ritz K, Ebbelwhite N, Dobson G (1999) Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. Soil Biol Biochem 31:145–153. doi: 10.1016/S0038-0717(98)00117-5
- Guo JH, Qi HY, Guo YH, Ge HL, Gong LY and Zhang LX (2002). Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Biolog control 29: 66-72.

- Hafeez FY, Yasmin S, Ariani D, Mehboob-ur-Rahman ZY, Malik KA (2006) Plant growthpromoting bacteria as biofertilizer. *Agron Sust Dev* 26:143–150
- Hallmann, J., Quadat-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., and Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43:895-914.
- Hameeda B, Harini G, Rupela OP, Wani SP, Reddy G (2008) Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol Res* 163:234–242
- Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W (2005) Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain Delftia tsuruhatensis HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst Appl Microbiol* 28(1):66–76
- Hernández, A.; J. M. Pérez; D. Bosh; Rivero. L; Camacho. E.; Ruíz. J; Jaimez. E; Marsán. R; Obregón. A; Torres. J. M; González. J. E; Orellana. Rosa; Paneque. J; Mesa. A; Fuentes. Emma; Duran. J. L; Pena. J; Cid. G; Ponce. D; Hernández. Mayda; Frómeta. E; Fernández. Libia; Garcés. N; Morales. Marisol; Suárez. Elbia; Martínez. E. y Ruiz. J. M., (1999). Nueva Clasificación Genética de suelos de Cuba. Instituto de suelos Ministerio de la Agricultura. La Habana, 64 p.
- Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237:173–195
- Huang XD, El-Alawi Y, Penrose DM, Glick BR, Greenberg BM (2004) Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environ Pollut* 130:453–63
- Idris, A., Labuschagne, N. and Korsten, L. (2009) Efficacy of rhizobacteria for growth promotion in sorghum under greenhouse conditions and selected modes of action studies. *Journal of Agricultural Science*, 147, 17–30.
- James EK, Olivares FL, de Oliveira ALM, dos Reis FB, da Silva LG, Reis VM (2001) Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J Exp Bot* 52:747–760

- James, E. K., and Olivares, F. B. (1997). Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17:77-119.
- Jing YD, He ZL, Yang XE (2007) Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *J Zhejiang Univ Sci* 8(3):192–207
- Kado, C. I. (1992). Plant pathogenic bacteria, p. 659–674. In A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, vol. I. Springer-Verlag, New York, N.Y.
- Kampfer P (2007) Taxonomy of phosphate solubilizing bacteria. In: Velazquez E, Rodriguez-Barrueco C (eds) *First international meeting on microbial phosphate solubilization*. Springer, Dordrecht, pp 101–106
- Karadeniz A, Topcuoglu SF, Inan S (2006) Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 22:1061–1064
- Karlidag H, Esitken A, Turan M, Sahin F (2007) Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. *Sci Hort* 114(1):16–20
- Kennedy IR, Choudhury ATMA, Kecske's ML (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol Biochem* 36:1229–1244
- Khalequzaman KM, Hossain I (2008) Effect of seed treatment with *Rhizobium* strains and biofertilizers on foot/root rot and yield of bushbean in *Fusarium oxysporum* infested soil. *J Agric Res* 46:55–64
- Khalid A, Arshad M, Zahir ZA (2004) Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J Appl Microbiol* 96:473–480
- Khalid A, Arshad M, Zahir ZA (2006) Phytohormones: microbial production and applications. In: Uphoff N et al (eds) *Biological approaches to sustainable soil systems*. Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, pp 207–220
- Khalid A, Tahir S, Arshad M, Zahir ZA (2004b) Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere vs. non-rhizosphere soil. *Aust J Soil Res* 42:921–926

- Khan AG (2005) Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *J Trace Elem Med Biol* 18:355–364
- Khan MS, Zaidi A, Wani PA (2007) Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: a review. *Agron Sustain Dev* 27:29–43
- Khan, M.S.; Zaidi, A.; Ahemad, M.; Oves, M.; Wani, P.A. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. *Arch Agron Soil Scien*, 56(1): 73–98.
- Kloepper JW, Gutierrez-Estrada A, McInroy JA (2007) Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol* 53(2):159–167
- Kobayashi, D. Y., Palumbo J. D. (2000). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture, p. 199–233. In C. W. Bacon and J. F. White (ed.), *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Kohler J, Hernández JA, Caravaca F, Roldán A (2009) Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. *Environ Exp Bot* 65:245–252
- Koide, R.T.(1991). Nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. Nutrient supply. *New Phytol.*, No 117, p. 365-386.
- Kumar B, Trivedi P, Pandey A (2007) *Pseudomonas corrugata*: a suitable bacterial inoculant for maize grown under rainfed conditions of Himalayan region. *Soil Biol Biochem* 39:3093–3100
- Lebeau T, Braud A, Je´ze´quel K (2008) Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environ Pollut* 153:497–522
- Lorenzo, A, L (2004). Efecto de la Biofertilización con ECOMIC en el cultivo del Sorgo de grano. (*Sorghum bicolor* L.) cv UDJ 110.
- Lucy M, Reed E, Glick BR (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86:1–25

- Mantelin S, Touraine B (2004) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J Exp Bot* 55:27–34. doi: 10.1093/jxb/erh010
- Marschner, h y B Dell. (1994). Nutrient Uptake in mycorrhizal Simbiosis, plant and soil, Vol.159, p 89-102.
- Martín, D. S., Saucedo, O. M., y G. y I, s Valdés. (1994). Comportamiento de híbridos experimentales de sorgo de la FAUNL, México en Santa Clara, Cuba. 110 Congreso Latinoamericano de Genética (Área vegetal) y XV congreso de Fitogenetica. Memorias. Nuevo León 400p.
- Martín, D.; O. Saucedo y A. Castillo. (1993). “UDG-110.Variedad de sorgo de grano blanco con adaptación tropical,” revista *Centro Agrícola* 20(2): 90,
- Martín, D.S., Saucedo, O.M., Y A Castillo. (1992). U. G. 110variedadde sorgo de grano blanco con adaptación tropical, apta para el consumo humano, alimentación animal y su tecnología de cultivo en Cuba. Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP). P 30.
- Martínez, L. (1996). Estudio de un grupo de variedades prometedoras de sorgo con vistas a su explotación en la provincia de Villa Clara. Trabajo de Diploma. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UCLV. Santa Clara. Cuba.
- McCully ME (2001) Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Aust J Plant Physiol* 28:983–990
- Mehnaz S, Lazarovits G (2006) Inoculation effects of *Pseudomonas putida* *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb Ecol* 51(3):326–335
- Minorsky PV (2008) On the inside. *Plant Physiol* 146:323–324
- Muchovej RMC, Muchovej JJ, Alvarez VH (1989) Temporal relations of phosphorus fractions in an oxisol amended with rock phosphate and *Thiobacillus thiooxidans*. *Soil Sci Soc Am J* 53:1096–1100
- Nakkeeran S, Fernando WGD, Siddiqui ZA (2005) Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. In: Siddiqui ZA (ed) *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Springer, Dordrecht, pp 257–296

- Nandakumar R, Babu S, Viswanathan R, Sheela J, Raguchander T, Samiyappan R (2001) A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice. *Biocontrol* 46(4):493–510. doi: 10.1023/A:1014131131808
- Ngoma, L., Mogatlanyane, K. y Oluranti, O. (2014). Screening of Endophytic Bacteria towards the Development of Cottage Industry: An in Vitro Study. *J Hum Ecol*, 47(1): 45-63.
- Oliveira CA et al. (2008) Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biol Biochem* doi:10.1016/j. soilbio.2008.01.012
- Oramas, G., Lourdes Valdés, L. Hernández, O. Queri, Nancy García, M. Sánchez y Albis González.(2005). ISIAP Dorado, primera variedad de sorgo de grano blanco para consumo humano en Cuba. [Consultado 05/11/05]. Disponible en la World Wide Web:<[http://www.inca.edu.cu/otras_web/revista/CT23 \(4\), %202002-htm](http://www.inca.edu.cu/otras_web/revista/CT23(4),%202002-htm)>.
- Patten, C.L. and Glick, B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in *Microbiol* 42: 207-220.
- Pengnoo A, Kusongwiriawong C, Nilratana L, Kanjanamaneesathian M (2000) Greenhouse and field trials of the bacterial antagonists in pellet formulations to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani* . *Biocontrol* 45(2):245–256. doi: 10.1023/A:1009948404423
- Pérez, FR., Cupull, R., Alvarado, Y., Diaz, B., Torres, R. 2010. Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias endófitas en sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Centro Agrícola*, 37(3):61-66; julio-sept.
- Praveen Kumar G, Desai S, Leo Daniel Amalraj E, Mir Hassan Ahmed SK, Reddy G (2012) Plant Growth Promoting *Pseudomonas* spp. from Diverse Agro-Ecosystems of India for *Sorghum bicolor* L. *J Biofert Biopest* S7:001. doi:10.4172/2155-6202.S7-001
- Puente, Mayra y C. Rodríguez. (1995) “Estudio de líneas de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) introducidas”, *Centro Agrícola* 22(2): 10-14.
- Raj SN, Deepak SA, Basavaraju P, Shetty HS, Reddy MS, Kloepper JW (2003) Comparative performance of formulations of plant growth promoting rhizobacteria

- in growth promotion and suppression of downy mildew in pearl millet. *Crop Prot* 22:579–88
- Rana, B. S. (1984). "Breeding optimum plant types in *Sorghum*", *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 44(3): 385,
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (1998). Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17:29-54.
- Remans, R. (2007). Searching for nitrogen under phosphorus deficiency: the interplay between common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Rhizobium* and plant growth-promoting rhizobacteria. PhD thesis, KULeuven. Belgium.
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305–339. doi:10.1007/s11104-009-9895-2
- Romkens P, Bouwman L, Japenga J, Draaisma C (2002) Potentials and drawbacks of chelate-enhanced phytoremediation of soils. *Environ Pollut* 116:109–121
- Rodríguez, F, C, Arredondo, Q, I y Martínez, M, L (2007). Variedades de sorgo granífero n (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) para una agricultura de bajos insumos I. Estudio comparativo del rendimiento y otros caracteres de las variedades Varieties of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) to agriculture of low resource. I. Comparative study of the yield and other characters of the varieties. *Centro Agrícola*, 34(1): 57-61; enero-marzo, 2007. ISSN: 0253-5785 CE: 57,06 CF: cag081071528
- Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS (2007) Perspectives of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J Indust Microbiol Biotechnol* 34:635–648
- Sang, J., Mayank, A, Se-Chul, Ch. (2013) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiol* (In press), <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.003>
- Saravanakumar D, Samiyappan R (2007) ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogaea*) plants. *J Appl Microbiol* 102(5):1283–1292

- Saucedo, O. (2005). Cultivos: sorgo granifero. UDG-110 variedad de sorgo de grano blanco con adaptación tropical. Centro Agrícola, año 2005, no. 2, mayo-agosto, 90.
- Senthilkumar M, Madhaiyan M, Sundaram SP, Kannaiyan S (2009) Intercellular colonization and growth promoting effects of *Methylobacterium* sp. with plant-growth regulators on rice (*Oryza sativa* L. Cv CO-43). *Microbiol Res* 164:92–104
- Serdyuk OP, Smolygina LD, Muzafarov EN, Adanin VM, Arinbasarov MU (1995) 4-Hydroxyphenethyl alcohol – a new cytokinin-like substance from the phototrophic purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* 1R. *FEBS Lett* 365:10–12
- Sessitsch A, Coenye T, Sturz AV, Vandamme P, Barka E, Wang-Pruski G, Faure D, Reiter B, Glick BR, Nowak J (2005) *Burkholderia phytofirmans* sp. Nov., a novel plant-associated bacterium with plant beneficial properties. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:1187–1192
- Shaharoona B, Arshad M, Khalid A (2007a) Differential response of etiolated pea seedling to 1- aminocyclopropane-1-carboxylate and/or L-methionine utilizing rhizobacteria. *J Microbiol* 45:15–20
- Shaharoona B, Arshad M, Zahir ZA (2006b) Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation of mungbean (*Vigna radiata*). *Lett Appl Microbiol* 42:155–159
- Shaharoona B, Arshad M, Zahir ZA, Khalid A (2006a) Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biol Biochem* 38:2971–2975
- Shaharoona B, Jamro GM, Zahir ZA, Arshad M, Memon KS (2007b) Effectiveness of various *Pseudomonas* spp. and *Burkholderia caryophylli* containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Microbiol Biotechnol* 17:1300–1307
- Shaharoona B, Naveed M, Arshad M, Zahir ZA (2008) Fertilizer dependent efficiency of *Pseudomonads* containing ACC-deaminase for improving growth, yield and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Appl Microbiol Biotechnol* 79:147–155

- Shahzad MS, Khalid A, Arshad M, Khalid M, Mehboob I (2008) Integrated use of plant growth promoting bacteria and P-enriched compost for improving growth, yield and nodulation of chickpea. *Pak J Bot* 40:1735–1744
- Simo, J. E (2003). Uso y manejo de las asociaciones micorrizicas para las hortalizas en un suelo pardo con carbonato. Tesis de presentación en opción al titulo de Master en agricultura Sostenible. UCLV.p.81
- Singh, B. K., Munro, S., Potts, J.M. and Millard, P. (2007). Influence of grass species and soil type on rhizosphere microbial community structure in grassland soils. *Applied Soil Ecology* 36, 147–155.
- Spaepen S, Vanderleyden J and Remans R (2008). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31: 425-448.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. In: Uden F (ed) *FEMS microbiol rev*. Blackwell Publishing Ltd., New York pp 1–24. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x
- Stamford NP, Santos PR, Santos CES, Freitas ADS, Dias SHL, Lira MA Jr (2007) Agronomic effectiveness of biofertilizers with phosphate rock, sulphur and *Acidithiobacillus* for yam bean grown on a Brazilian tableland acidic soil. *Biores Technol* 98:1311–1318
- Steenhoudt O, Vanderleyden J (2000) *Azospirillum* , a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev* 24:487–506
- Stiens M, Schneiker S, Keller M, Kuhn S, Puhler A, Schluter A (2006) Sequence analysis of the 144-kilobase accessory plasmid psmesm11a, isolated from a dominant *Sinorhizobium meliloti* strain identified during a long-term field release experiment. *Appl Environ Microbiol* 72:3662–3672 that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Sci* 175:178–189
- Suzuki, S., He, Y. And Oyaizy, H. (2004). Indole-3-acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. *Current Microbiology* 47, 138–143.

- Swain MR, Naskar SK, Ray RC (2007) Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Pol J Microbiol* 56:103–110
- Torres, S y Vázquez, Edith. (1997). *Fisiología Vegetal*. Editora Pueblo y Educación. 451 pp.
- Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG, Netrusov AL (2007) Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol Res* 162:69–76
- Tuomi T, Rosenquist H (1995) Detection of abscisic, gibberellic and indole-3-acetic acid from plant and microbes. *Plant Physiol Biochem* 33:725–734
- Van Loon LC (2007) Plant response to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:243–254- Van Loon LC, Glick BR (2004) Increased plant fitness by rhizobacteria. In: Sandermann H (Ed) *Molecular ecotoxicology of plants*. Springer, Berlin, pp 178–205
- Van Loon LC, Glick BR (2004) Increased plant fitness by rhizobacteria. In: Sandermann H (ed) *Molecular ecotoxicology of plants*. Springer, Berlin, pp 178–2
- Verma SC, Ladha JK & Tripathi AK (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J Biotechnol* 91: 127–141.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571–586
- Wan, J. H. C.; H. Wong. (2004). Effects of earthworm activity and P-solubilizing bacteria on P availability in soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 167: 209-213.
- Wani PA, Khan MS, Zaidi A (2007) Co-inoculation of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria to promote growth yield and nutrient uptake in chickpea. *Acta Agron Hung* 55: 315–323
- Weingart H, Volksch B, Ullrich MS (1999) Comparison of ethylene production by *Pseudomonas syringae* and *Ralstonia aolanacearum*. *Phytopathology* 89:360–365
- Whitelaw MA (2000) Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Adv Agron* 69:99–151. doi:10.1016/S0065-2113(08)60948-7

- Wu SC, Caob ZH, Lib ZG, Cheunga KC, Wonga MH (2005) Effects of biofertilizer containing Nfixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125:155–166
- Zahir ZA, Arshad M, Frankenberger WT (2004) Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Adv Agron* 81:96–168
- Zaidi, A.; Khan, M. S.; Ahemad, M.; Oves, M. and Wani, P. A. (Editors). (2009). Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: Mohammad Saghir Khan; Almas Zaidi and Javed Musarrat (Editors). *Microbial strategies for crop improvement*. Springer-Verlag, Berlin. 23-50 pp.
- Zehnder GW, Murphy JF, Sikora EJ, Kloepper JW (2001) Application of rhizobacteria for induced resistance. *Eur J Plant Pathol* 107:39–50
- Zhuang X, Chen J, Shim H, Bai Z (2007) New advances in plant growth promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ Int* 33:406–413
<http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/T0818S/T0818S02.h tm>. Alimentación y Nutrición No. 27) ISBN 92-5-303381-9. [Consultado 25/10/05].