

Valoración de cepas silvestres de *Azospirillum* sp. y *Gluconacetobacter* sp. como promotoras de crecimiento vegetal*

Rating wild strains of *Azospirillum* sp. and *Gluconacetobacter* sp. as promoters of plant growth

Jesús Piña Guillén^{1§}, Virginia García Meneses¹, Humberto Herrera López¹ y Flores Torres Jesús Adolfo¹

Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros-Programa Educativo de Agrobiotecnología. Prolongación Reforma 168, Barrio de Santiago Mihucán C. P. 74420, Izúcar de Matamoros, Puebla. Tel: 01(243) 436 38 95. (disolga_2610@hotmail.com; humberto950@hotmail.com; jadolfoft18@hotmail.com). [§]Autor para correspondencia: fejepigu@hotmail.com.

Resumen

Los esquemas actuales de nutrición vegetal implican el uso extensivo de fertilizantes químicos que acarrear consigo numerosos efectos secundarios entre los cuales destacan la contaminación de los mantos freáticos y la progresiva erosión del suelo, lo cual refleja la imperiosa necesidad de alternativas que permita reemplazar de forma eficiente aquellos esquemas. La alternativa propuesta por este trabajo, desarrollado en las instalaciones de la Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros en 2013, es impulsar el uso de biofertilizantes elaborados a base de bacterias autóctonas de la región, para lo cual, se realizaron ensayos *in vitro* e *in planta* que demuestran su efecto como promotores de crecimiento vegetal por medio de mecanismos como la fijación biológica de nitrógeno (FBN) y la producción de reguladores de crecimiento. Se aislaron dos cepas empleando medios de cultivo carentes de nitrógeno, ambas caracterizadas de forma parcial, la primera de ellas pertenece al género *Azospirillum* denominada M1 aislada de raíces de *Jatropha*, la segunda del género *Gluconacetobacter* denominada G1 aislada de raíces de caña de azúcar. En los ensayos realizados en esquejes de pitahaya, plantas de maíz y caña de azúcar tanto *in vitro* como *in planta* se observó que ambas cepas poseen la capacidad de promover la formación de raíces laterales y que el número de estas es mayor en comparación con testigos no inoculados, del mismo modo,

Abstract

The current patterns of plant nutrition involve extensive use of chemical fertilizers that bring with it numerous side effects among which pollution of groundwater and progressive soil erosion, reflecting the urgent need for alternatives that allow replace efficiently those schemes. The proposal for this work alternative, developed in the facilities of the Technological University of Izúcar de Matamoros in 2013, is to promote the use of bio-fertilizers prepared from indigenous bacteria in the region, for which, were performed assays *in vitro* and *in planta* demonstrating its effect as plant growth promoters through mechanisms such as biological nitrogen fixation (FBN) and the production of growth regulators. Two strains were isolated using media lacking culture nitrogen, both characterized in part, the first of which belongs to the genus *Azospirillum* called M1 isolated from roots of *Jatropha*, the second genus *Gluconacetobacter* called G1 isolated from roots of sugar cane. In tests on cuttings of dragon fruit, corn plants and sugarcane both *in vitro* and *in planta* it was observed that both strains have the ability to promote the formation of lateral roots and that the number of these is higher compared to witnesses not it inoculated likewise, it was observed that the strain M1 has a similar effect on the G1 rhizogenesis strain and co-inoculation of both strains in these plant models.

* Recibido: abril de 2016
Aceptado: julio de 2016

se observó que la cepa M1 posee un efecto semejante en rizogénesis al de la cepa G1 y que la coinoculación de ambas cepas en estos modelos vegetales.

Palabras clave: autóctonas, bacterias, biofertilizantes.

Introducción

Para obtener rendimientos óptimos en cualquier cultivo de interés agronómico, se requieren cantidades importantes de fertilizantes químicos; sin embargo, su uso impacta negativamente en la rentabilidad del mismo, además de incrementar el problema de la salinidad debido a las características fisicoquímicas del suelo. Una alternativa al uso de fertilizantes químicos son los microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPR) denominados "bioestimulantes", "biofertilizantes" o "inoculantes" (Cárdenas *et al.*, 2010).

Los microorganismos más utilizados con este fin son las bacterias pertenecientes a los géneros, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter* y *Pseudomonas*, así como hongos micorrícicos del género *Glomus* que generalmente provienen de otras regiones lo cual limita su accionar afectando de este modo el proceso de producción (Hirsch *et al.*, 2001; Sevilla *et al.*, 2001). Así, los estudios sobre adaptación y eficiencia biofertilizante de nuevas cepas deberán conducirse en las regiones donde habrán de utilizarse. La inoculación con *Azospirillum brasilense* es altamente benéfica en gramíneas como maíz, caña de azúcar, pastos y sorgo, pues aporta de 30 a 50% de nitrógeno de dichos cultivos (Martínez *et al.*, 2003; Vivienne *et al.*, 2004). Además de fijar nitrógeno, esta bacteria es capaz de producir hormonas de crecimiento vegetal como ácido indol acético (AIA), generando un crecimiento importante del sistema radicular, incluyendo su mayor absorción y de los propios fertilizantes químicos aplicados (Aguilar *et al.*, 2008).

Gluconacetobacter diazotrophicus, microorganismo cuyo descubrimiento abrió un nuevo capítulo en la fijación de nitrógeno en plantas no leguminosas, potencial que se amplió cuando Fuentes *et al.* (1999) demostraron que libera hasta 50% del nitrógeno fijado y produce diversas auxinas, principalmente AIA y citocininas (Lee *et al.*, 2004; Madhaiyan *et al.*, 2006). Pertenece a la familia Acetobacteraceae, la que a su vez se inserta en la subclase α -proteobacteria. No obstante, es evidente que aún queda mucho por investigar en el campo

Keywords: bacteria, bio-fertilizers, native.

Introduction

For optimal performance in any crop agronomic interest, significant amounts of chemical fertilizers are required; however, use a negative impact on its profitability, and increase the problem of salinity due to the physicochemical characteristics of the soil. An alternative to the use of chemical fertilizers are promoters of plant growth or microorganisms (PGPR) called "bioestimulantes", "biofertilizers" "inoculants" (Cárdenas *et al.*, 2010).

The most commonly used for this purpose microorganisms are bacteria belonging to the genera, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter* and *Pseudomonas*, as well as mycorrhizal fungi of the genus *Glomus* which generally come from other regions which limits their actions thereby affecting the process production (Hirsch *et al.*, 2001; Sevilla *et al.*, 2001). Thus, studies on adaptation and biofertilizer efficiency of new strains shall be conducted in the regions where they are to be used. Inoculation with *Azospirillum brasilense* is highly beneficial in grasses such as corn, sugar cane, grasses and sorghum, as it provides 30 to 50% nitrogen of these crops (Martínez *et al.*, 2003; Vivienne *et al.*, 2004). Besides fixing nitrogen, this bacterium is able to produce plant growth hormones such as indole acetic acid (AIA), generating significant root growth, including increased absorption and chemical fertilizers own applied (Aguilar *et al.*, 2008).

Gluconacetobacter diazotrophicus, microorganism whose discovery opened a new chapter in nitrogen fixation in non-leguminous plants, potential expanded when Fuentes *et al.* (1999) showed that releases up to 50% of fixed nitrogen and produces various auxins, cytokinins and mainly AIA (Lee *et al.*, 2004; Madhaiyan *et al.*, 2006). The Acetobacteraceae, belongs to the family, which in turn is inserted into the α -proteobacteria subclass. However, it is clear that there is still much research in the field of biofertilization, regarding the effect which can produce adequate incorporation of *G. diazotrophicus* the plant system, given the benefits and potential of this organism. The objective of this research is to isolate and characterize microorganisms of the genders *Azospirillum* and *Gluconacetobacter* as promoters of plant growth, promising for the production of bio-fertilizers which

de la biofertilización, con respecto al efecto que puede producir la adecuada incorporación de *G. diazotrophicus* al sistema planta, dadas las bondades y potencialidades de este microorganismo. El objetivo de esta investigación es aislar y caracterizar microorganismos de los géneros *Azospirillum* y *Gluconacetobacter* como promotores de crecimiento vegetal, promisorios para la elaboración de biofertilizantes que permitan disminuir los esquemas tradicionales de fertilización química y que a su vez generen un impacto positivo sobre el suelo donde son aplicados.

Materiales y métodos

Obtención de aislamientos de *Azospirillum* y *gluconacetobacter*. *Azospirillum* se aisló en medio de cultivo PY, adicionado con 20 µg mL⁻¹ de ácido nalidixico y 10 µg mL⁻¹ de tetraciclina (Caballero-Mellado *et al.* (1992). Para el caso de *Gluconacetobacter* se empleó el medio de cultivo LGI semisólido tomando cortes de raíces de 2 cm de longitud de *Jatropha* y de Caña de azúcar, se lavaron y esterilizaron en superficie con etanol al 70% por 5 min, enjuagadas en agua destilada estéril y transferidas a los medios de cultivo arriba mencionados, permaneciendo en incubación por espacio de 10 días a 30 °C (Reis *et al.*, 1994).

Caracterización de las cepas aisladas. Se seleccionaron los medios de cultivo con crecimiento positivo y se siguió la metodología descrita por Döbereiner *et al.* (1995) para la identificación de *Azospirillum* y por Collins y Lyne (1980) para *Gluconacetobacter*. En ambos casos se determinó también la capacidad para crecer en diferentes fuentes de carbono según la metodología propuesta por Barbosa (2006). Adicionalmente se desarrolló un protocolo de amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa de los genes DNAr 16S usando los iniciadores F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y R 5'-TACCTTGT TTTACGACTT-3' los cuales generan un amplificado descrito por Singh *et al.* (2013) de 1499 pb en *Azospirillum* sp. y AC 5'-CTGTTTCCCGCAAGGGAC-3' y D1 5'-GCGCCCCATT GCTGGGTT-3' que generan un amplificado descrito por Sievers *et al.* (1998) de 445 pb en *Gluconacetobacter* sp., adicionalmente se emplearon los iniciadores 1 440 5'-GTTGGCTTAGAAGCAGCC-3' y AD 5'-TGCGGCAA AAGCCGGAT-3' que generan un producto descrito por Kirchof *et al.* (1998) de 411 pb del gen ADNr 23S de *Gluconacetobacter diazotrophicus* y AzD 5' GTGAGTAACACGTGGGAACCTG 3' y AzR

would enable the traditional patterns of chemical fertilization and that in turn generate a positive impact on the ground where they are applied.

Materials and methods

Getting isolates of *Azospirillum* and *Gluconacetobacter*. *Azospirillum* was isolated in culture medium PY, supplemented with 20 µg mL⁻¹ nalidixic acid and 10 µg mL⁻¹ of tetracycline (Caballero-Mellado *et al.* (1992). In the case of *Gluconacetobacter* the culture medium was used LGI semisolid taking root cuttings 2 cm length of *Jatropha* and sugar cane, washed and surface sterilized with 70% ethanol for 5 min, rinsed in sterile distilled water and transferred to the media above culture remaining in incubation for 10 days at 30 °C (Reis *et al.*, 1994).

Characterization of isolates. Culture media were screened positive growth and the methodology described by Döbereiner *et al.* (1995) was followed for identifying *Azospirillum* and by Collins and Lyne (1980) for *Gluconacetobacter*. In both cases the ability to grow in different carbon sources according to the methodology proposed by Barbosa (2006) was also determined. Additionally an amplification protocol developed by polymerase chain reaction of the DNAr 16S gene using the primers F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and R 5'-TACCTTGT TTTACGACTT-3' which generate an amplified described by Singh *et al.* (2013) of 1499 pb in *Azospirillum* sp. and AC 5'-CTGTTTCCCGCAAGGGAC-3' and D1 5'-GCGCCCCATT GCTGGGTT-3' generating an amplified described by Sievers *et al.* (1998) of 445 pb in *Gluconacetobacter* sp., additionally were used primers 1 440 5'-GTTGGCTTAGAAGCAGCC-3' and AD 5'-TGCGGCAA AAGCCGGAT-3' generating a product described by Kirchof *et al.* (1998) of 411 pb of gene ADNr 23S of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and AzD 5' GTGAGTAACACGTGGGAACCTG 3' and AzR 5' GCTTCCACTTAGACCTCATGCT 3' that generate an amplified of 780 pb of gene DNAr 16S of *Azospirillum brasilense*.

The reaction mixture consisted of 5 µL of genomic DNA, 2.5 µL of enzyme Buffer 10X, 3 µL of MgCl₂ 50 mM, 1.25 µL of mixture of dNTPs, 1.25 µL of each primer, 0.2 µL of Taq Polymerase and water free DNase to a 25 µL volume. The reaction was performed in a BioRad® thermocycler Mycycler of and programmed as follows: Initial denaturation 94 °C

5' GCTTCCACTTAGACCTCATGCT 3' que generan un amplificado de 780 pb del gen DNAr 16S de *Azospirillum brasilense*.

La mezcla de reacción constó de 5 µL de DNA genómico, 2.5 µL de Buffer enzimático 10X, 3 µL de MgCl₂ 50mM, 1.25 µL de mezcla de dNTPs, 1.25 µL de cada iniciador, 0.2 µL de Taq Polimerasa y agua libre de DNAsas hasta un volumen de 25 µL. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mycycler de BioRad® y programado de la siguiente manera: Desnaturalización inicial 94 °C 5 min, seguida de 30 ciclos con un paso de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento 71 °C, 66 °C, 61 °C y 60 °C por 1 min para F-R, AC-D1, 1440-AD y AzD-AzR respectivamente, Extensión de 73 °C por 1 min para AC-D1, 1440-AD y AzD-AzR, de 2 minutos para F-R, con una Extensión final a 73 °C de 10 min para todos los casos. Todos los amplificados fueron corridos en geles de agarosa al 0.7% teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo un sistema UV de documentación de geles GelDocXR+ de BioRad®.

Cuantificación de AIA. Las cepas aisladas se desarrollaron en medio líquido Luria-Bertani (LB) adicionado con triptona de caseína como fuente de triptófano, con incubación a 30 °C y 150 rpm de agitación constante. Además de cuantificar el AIA producido por cada cepa, se determinaron factores que podrían afectar la producción de este metabolito secundario, las variables a evaluar son la concentración de triptona en LB (2, 4 y 8 g L⁻¹), el pH (4, 5, 6 y 7) y la actividad de agua (0.01M, 0.1M y 1M de NaCl y 20% y 30% de sacarosa) ésta última cuantificada en medio mínimo con sacarosa como fuente de carbono y adicionado con 0.5 g/L de triptófano. Se colectaron alícuotas de 1 mL del cultivo a las 24, 48, 72 y 96 horas de incubación y se centrifugaron a 9000 rpm por 5 min, el sobrenadante se mezcló con 3 ml del reactivo de Salkowski preparado según Glickman y Dessaux (1994) y se midió en un espectrofotómetro UV-VIS Jenway® a 535 nm tomando como referencia una curva patrón de AIA comercial sigma-aldrich®.

Cuantificación de nitrógeno amoniacal. Para cuantificar el nitrógeno fijado se inocularon 50 µL de cada suspensión bacteriana en 5 mL de caldo extracto de suelo 10% y en 5ml de Medio Mínimo incubando a 30 °C durante 72 h a 120 rpm. Se tomaron 700 µL de cultivo y se agregaron 1.5 mL de KCl 2M, los tubos se agitaron durante 5 minutos y luego se dejaron en reposo durante 1 h adicional. Posteriormente se añadieron 150 µL de solución alcohólica de fenol 10%, 150 µL de nitroprusiato de sodio 0.5 % y 700 µL de solución

5 min, followed by 30 cycles with a denaturation step at 95 °C for 1 min, 71 °C alignment, 66 °C, 61 °C and 60 °C for 1 min for F-R, AC-D1, 1440-AD and AzD-AzR respectively, extension 73 °C for 1 min for AC-D1, 1440-AD and AzD-AzR, FR 2 minutes with a final extension at 73 °C for 10 min all cases. All amplicons were run on agarose gels stained with 0.7% ethidium bromide and visualized under a system UV documentation of gel GelDocXR+ from BioRad®.

Quantification of AIA. Isolates were grown in liquid Luria-Bertani (LB) supplemented with tryptone casein as a source of tryptophan, with incubation at 30 °C and 150 rpm constant shaking. In addition to quantifying the AIA produced by each strain, factors that could affect the production of the secondary metabolite were determined, the variables to be evaluated are the concentration of tryptone in LB (2, 4 and 8 g L⁻¹), the pH (4, 5, 6 and 7) and water activity (0.01M, 0.1M and 1M NaCl and 20% and 30% sucrose) quantized latter in minimal medium with sucrose as carbon source and supplemented with 0.5 g/L tryptophan. The 1 mL aliquots of culture were collected at 24, 48, 72 and 96 hours incubation and centrifuged at 9 000 rpm for 5 min, the supernatant mixed with 3 ml of reagent Salkowski prepared according Glickman and Dessaux (1994) and it was measured in a UV-VIS spectrophotometer Jenway® at 535 nm with reference to a standard curve of AIA comercial sigma-aldrich®.

Quantification of ammonia nitrogen. To quantify the fixed nitrogen 50 µL of each bacterial suspension was inoculated into 5 mL of soil extract broth 10% and 5ml minimal medium incubating at 30 °C for 72 h at 120 rpm. 700 µL of culture was taken and added 1.5 mL of KCl 2M, the tubes were vortexed for 5 minutes and then allowed to stand for an additional 1 h. Subsequently was added 150 mL of an alcoholic solution of phenol 10%, 150 µL of 0.5% sodium nitroprusside and 700 µL of oxidant solution. It stirs to mix and then rested for 1 hour blue coloration was observed, making reading spectrophotometer at 633nm. Concentrations were calculated on a calibration curve obtained with serial dilutions of a solution of 100 ppm of ammonium chloride (García *et al.*, 2010).

Effect of inoculation in corn, sugar cane and pitahaya. The effect of inoculating as determined the strains in vitro assays in maize seeds germinated on agar water plates for 48 h inoculated with 1X10⁷ UFC of M1 and G1 grown Döbereiner *et al.* (1995) in LB liquid medium supplemented with 8 g L⁻¹ tryptone, incubated for 72 h at 30 °C and 150 rpm constant stirring, once germinated seeds were placed in

oxidante. Se agitó para mezclar y luego de 1 h de reposo se observó una coloración azul, realizando la lectura en espectrofotómetro a 633 nm. Las concentraciones se calcularon en una recta patrón obtenida con diluciones sucesivas de una solución de 100 ppm de cloruro de amonio (García *et al.*, 2010).

Efecto de la inoculación en maíz, caña de azúcar y pitahaya. Se determinó el efecto de la inoculación de las cepas aisladas en ensayos *in vitro* en semillas de maíz germinadas en placas de agar agua por 48 h inoculadas con 1×10^7 UFC de M1 y G1 crecidas según Döbereiner *et al.* (1995) en medio líquido LB adicionado con 8 g L^{-1} de triptona, incubado durante 72 h a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y 150 rpm de agitación constante, una vez germinadas, las semillas fueron colocadas en solución nutritiva y se realizaron inoculaciones simples de cada modelo bacteriano y coinoculación, las semillas inoculadas se dejaron en incubación por espacio de 10 días y se valoró su efecto midiendo la masa radicular y el número de raíces. Adicionalmente se realizaron ensayos *in situ* en caña de azúcar variedad ATE MEX 9640 la cual se inoculó 10 días después de germinación con suspensiones bacterianas que contenían 1×10^{11} UFC/mL (Cuadro 1), los tratamientos fueron distribuidos en bloques completamente al azar con 5 repeticiones, las variables a medir fueron grosor de tallo, altura, peso y número de brotes a los 12 meses después de siembra (Dibut *et al.*, 2005). Finalmente se valoraron los mismos modelos microbianos en Pitahaya propagada *ex vitro* a través de esquejes los cuales fueron inoculados 20 días después de trasplante con 50 mL de una solución que contenía 1×10^8 UFC mL^{-1} , empleando como referencia un control - no inoculado y un control + con enraizador Radix 1500®, en este caso se midió la masa radicular y el número de raíces a los 60 días pos inoculación.

Análisis estadístico. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los datos fueron sometidos a un análisis estadístico de varianza y de comparación de medias de Tukey a un nivel de significancia $p \leq 0.05$ utilizando el paquete SAS (Statistical Analysis System).

Resultados y discusión

Se obtuvieron cepas en cada uno de los medios de cultivo con morfología colonial y características fenotípicas sugerentes de los géneros *Azospirillum* la cual fue denominada M1 y *Gluconacetobacter* denominada G1 descritas por Hynes *et*

nutrient solution and simple inoculations of each bacterial model were performed and co-inoculation, the inoculated seeds were allowed to incubate for 10 days and its effect was assessed by measuring the root mass and number of roots. Further field tests were conducted in sugarcane variety ATE MEX 9640 which was inoculated 10 days after germination with bacterial suspensions containing 1×10^{11} UFC/mL (Table 1), treatments were distributed in a randomized complete block design with 5 replications, the were measured variables stem thickness, height, weight and number of sprouts at 12 months after planting (Dibut *et al.*, 2005). Finally the same microbial models in pitahayas propagated *ex vitro* through cuttings which were inoculated 20 days after transplantation with 50 mL of a solution containing 1×10^8 UFC mL^{-1} using as reference control were assessed - uninoculated and control + with Radix rooting 1500®, in this case the root mass and number of roots at 60 days post inoculation was measured.

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en caña de azúcar.

Table 1. Treatments evaluated in sugar cane.

Número	Tratamiento
1	G1* (200 mL/bloque)
2	M1(200 mL/bloque)
3	G1(100 mL/bloque) + M1 (100 mL/bloque)
4	FQ
5	Testigo

*G1= *Gluconacetobacter* sp., M1= *Azospirillum* sp., G1-M1= coinoculación *Gluconacetobacter* sp. y *Azospirillum* sp., FQ= fertilización química al 100% (220-80-80) con nitrato de potasio, fosfato diamónico y cloruro de potasio. El testigo y los tratamientos 1, 2 y 3 tuvieron fertilización química al 30%.

Statistical analysis. All assays were performed in triplicate and data were subjected to statistical analysis of variance and mean comparison Tukey at a significance level of $p \leq 0.05$ using the SAS package (Statistical Analysis System).

Results and discussion

The strains were obtained in each of the culture media and colony morphology suggestive phenotypic characteristics of *Azospirillum* genus which was called the M1 and *Gluconacetobacter* called G1 described by Hynes *et al.* (2008); Cavalcante *et al.* (1988), isolated from root samples of jatropha and sugar cane respectively (Table 2). Additionally it observed microscopically that the M1

al. (2008); Cavalcante *et al.* (1988), aisladas de muestras de raíz de *Jatropha* y de caña de azúcar respectivamente (Cuadro 2). Adicionalmente se observa al microscopio que la cepa M1 posee movilidad en espiral y forma ovoide, en medio Nfb con rojo congo se observan colonias rojo escarlata con bordes redondeados y ligeramente mucoides de acuerdo a Pérez y Casas (2005), para la cepa G1 se observan colonias anaranjadas mucoides de forma irregular con producción de ácido en medio LGI y colonias café-marrón en agar papa dextrosa, con capacidad de tolerar concentraciones de sacarosa de hasta 30% y con producción de ácido acético (Fuentes *et al.*, 2001).

Cuadro 2. Caracterización bioquímica y uso de fuentes de carbono de las cepas M1 y G1.

Table 2. Biochemical characterization and use of carbon sources M1 and G1 strains.

Cepa	Gram	Cat *	Ox	Mov	Sac	Glc	Lac	Cit	Xil	Man	Mal
			Et	Gli	Ino	Ac					
M1	B (-)	++++	-	+++++	-	+++++	-	++++			
G1	B (-)	+ -	+++++	+/-	+++++	+/-	++++				

*Cat= catalasa; Ox= oxidasa; Mov= movilidad; Sac= sacarosa; Glc= glucosa; Lac= lactosa; Cit= citrato; Man= manitol; Mal= maltosa; Et= etanol; Gli= glicerol; Ino= inocitol; Ac= acetato sódico, (+) crecimiento abundante, (-) sin crecimiento, (+/-) crecimiento ligero.

Los resultados de caracterización bioquímica y morfológica para las cepas M1 y G1 coinciden con las descripciones del manual de clasificación de bacterias de Bergey para los géneros *Azospirillum* y *Gluconacetobacter* respectivamente (Holt *et al.*, 1994).

El protocolo de PCR del gen DNAr 16S de las cepas M1 y G1 amplifican productos de 1.5 Kb y 450 pb respectivamente (Figura 1), en concordancia a lo reportado por Singh *et al.* (2013) y Sievers *et al.* (1998). La amplificación del gen DNAr 23S para la cepa G1 generó un producto estimado de 410 pb reportado para especies del género *Gluconacetobacter* (Kirchhof *et al.*, 1998).

Cuantificación de AIA. En la cuantificación de este regulador de crecimiento se encontró que la producción máxima de AIA ocurre a concentraciones de 0.01 M de NaCl tanto para M1 como para G1 a las 96 horas de incubación (Figura 2) con valores de 19.19 y 27.28 mg L⁻¹ respectivamente, del mismo modo se observa que la concentración de AIA disminuye de manera considerable para ambas cepas conforme el estrés osmótico es más severo (Spaepen *et al.*, 2007). Finalmente se encontró que G1 continua presentando buen crecimiento

strain has mobility spirally ovoid, amid Nfb with congo red observed scarlet red colonies with rounded and slightly mucoid edges according to Pérez and Casas (2005), for the G1 strain observed orange mucoid colonies of irregular shape with acid production in the middle LGI and coffee-brown potato dextrose agar colony, able to tolerate sucrose concentrations up to 30% and production of acetic acid (Fuentes *et al.*, 2001).

The results of biochemical and morphological characterization for M1 and G1 strains match the descriptions of manual classification of bacteria Bergey for the genders *Azospirillum* and *Gluconacetobacter* respectively (Holt *et al.*, 1994).

The PCR protocol of rDNA 16S gene M1 and G1 strains amplified products 1.5 Kb and 450 pb respectively (Figure 1), according to what reported by Singh *et al.* (2013) and Sievers *et al.* (1998). The gene amplification DNAr 23S for G1 strain generated a 410 pb product estimated reported for species of the genus *Gluconacetobacter* (Kirchhof *et al.*, 1998).

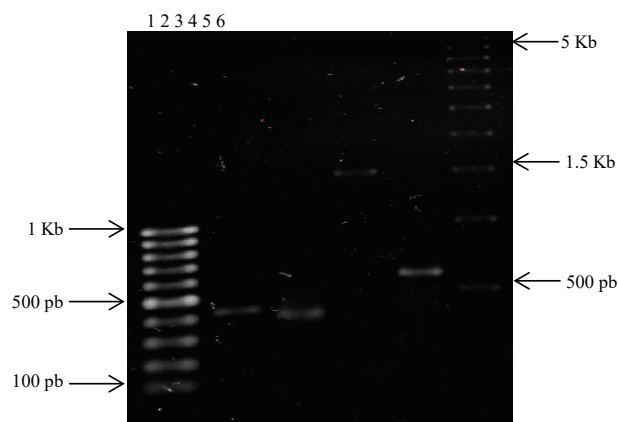


Figura 1. Productos de amplificación por PCR de los genes DNAr 16S de G1 y M1 y DNAr23S de G1. Carril 1 MPM 100 pb, carril 2 DNAr 16S de G1, carril 3 DNAr 23S de G1, carril 4 DNAr 16S M1 iniciadores F-R, carriles 5 DNAr 16S M1 iniciadores AzD-AzR, carril 6 MPM 500 pb.

Figure 1. The PCR amplification products of DNAr 16S of G1 and M1 and DNAr23S genes of G1. Lane 1 MPM 100 pb, lane 2 DNAr 16S of G1, lane 3 DNAr 23S of G1, lane 4 DNAr 16S M1 primers F-R, lanes 5 DNAr 16S M1 primers AzD-AzR, lane 6 MPM 500 pb.

Quantification of AIA. In quantifying this growth regulator it found that the maximum production of AIA occurs at concentrations of 0.01 M of NaCl both M1 to G1 at 96 hours

y produciendo este compuesto, a concentraciones menores, aun a 20 y 30% de Sacarosa (6.24 y 7.46 mg L^{-1} de AIA respectivamente) lo cual nos habla de su capacidad para tolerar altas concentraciones del carbohidrato contrario a M1 cuya producción se reduce hasta 0.8 y 1.1 mg L^{-1} a las mismas concentraciones de sacarosa, probablemente debido a una disminución en su crecimiento bajo éstas condiciones.

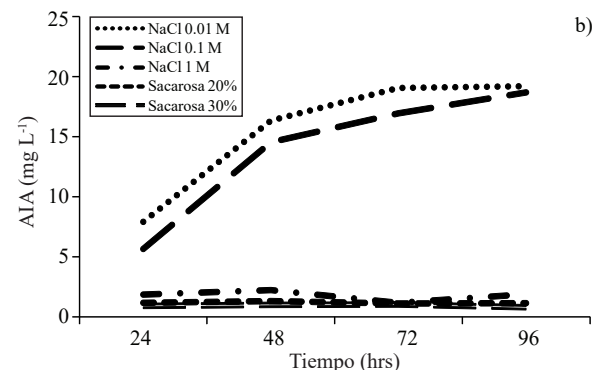
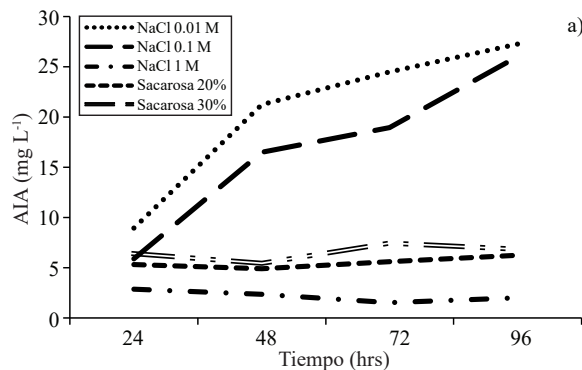


Figura 2. Producción de ácido indol acético con estrés osmótico inducido por diferentes concentraciones de NaCl y sacarosa en medio mínimo a) cepa G1; y b) cepa M1.

Figure 2. Production of indole acetic acid with osmotic stress induced by different concentrations of NaCl and sucrose in minimal medium a) strain G1; and b) strain M1.

Se encontró que el pH óptimo para la producción de AIA es de 7 tanto para M1 como para G1 (Cuadro 3) y que ambas cepas ven afectada la producción de este metabolito a valores de pH inferiores, semejante a lo reportado por Sahasrabudhe (2011), cabe resaltar que G1 presenta mayor tolerancia y por ende mayor producción de AIA que M1 a valores inferiores de pH. También se observa que la concentración de triptona influye de manera directa en la producción de este compuesto, de forma que concentraciones elevadas de esta proteína incrementan de manera considerable la cantidad de triptófano y la producción de AIA en ambas cepas, lo cual indica la posibilidad de que la síntesis de este metabolito secundario siga rutas dependientes de triptófano (Aguilar *et al.*, 2008). Según se observa en el Cuadro 2, G1 es capaz de producir una cantidad significativamente mayor del regulador de crecimiento en comparación con M1 y la co-inoculación no presenta incremento estadísticamente significativo en cada valor de pH cuando se compara con G1, estos resultados coinciden con lo reportado por Lara *et al.* (2012) y Cheang *et al.* (2005) en relación a la cantidad de AIA producido por cepas de *Azospirillum* y *Gluconacetobacter*.

Cuantificación de nitrógeno amoniacal. En la determinación de amonio se observa que tanto M1 como G1 son capaces de fijar nitrógeno (Cuadro 4), se muestra que en caldo extracto de suelo la cepa M1 produce cantidades significativamente

of incubation (Figure 2) with values of 19.19 and 27.28 mg L^{-1} respectively, just as it is observed that the concentration of AIA decreases significantly for both strains under osmotic stress it is more severe (Spaepen *et al.*, 2007). Finally it was found that G1 continues to present good growth and producing this compound, at lower concentrations, even at 20 and 30% sucrose (6.24 and 7.46 mg L^{-1} of AIA

respectively) which speaks of its ability to tolerate high concentrations of carbohydrate contrary to M1 whose production is reduced to 0.8 and 1.1 mg L^{-1} at the same concentrations of sucrose, probably due to a decrease in their growth under these conditions.

It was found that the optimum pH for the production of AIA is 7 for both M1 to G1 (Table 3) and both strains are affected production of this metabolite to lower pH values, such as reported by Sahasrabudhe (2011), it should be noted that G1 has greater tolerance and thus increased production of AIA M1 at lower pH values. It is also noted that the concentration of tryptone directly affects the production of this compound, so that high concentrations of this protein increase considerably the amount of tryptophan and production of AIA in both strains, indicating the possibility of that the synthesis of the secondary metabolite follow dependent pathways of tryptophan (Aguilar *et al.*, 2008). As shown in Table 2, G1 is able to produce significantly more growth regulator compared to M1 and co-inoculation no statistically significant increase in each pH value when compared with G1, these results are consistent with reported by Lara *et al.* (2012) and Cheang *et al.* (2005) in relation to the amount of AIA strains produced by *Azospirillum* and *Gluconacetobacter*.

mayores (14.74 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a las producidas por G1 (5.17 $\mu\text{mol L}^{-1}$) y las generadas por la co-inoculación de ambas cepas (11.21 $\mu\text{mol L}^{-1}$), también se observan concentraciones mayores de amonio para ambas cepas en caldo extracto de suelo en comparación con medio mínimo. Las concentraciones de amonio encontradas en este ensayo concuerdan con las reportadas previamente para cepas de *Azospirillum* sp. (García *et al.*, 2010).

Cuadro 3. Producción de AIA a diferentes valores de pH y concentraciones de triptona.

Table 3. Production of AIA at different pH values and concentrations tryptone

Cepa	pH	Triptona
4	5	6
7	2	4
8	gr L ⁻¹	8
gr L ⁻¹		gr L ⁻¹
G1	3.44 e	* 9.09 c
	8.55 cd	30.06 a
	9.67 d	19.21 b
	30.06 a	
M1	0.08 f	1.91 e
	7.22 d	19.72 b
	3.81 e	9.13 c
	19.72 b	
M1-G1	2.91 e	8.87 cd
	8.91 cd	28.71 a
	7.03 d	17.56 b
	28.71 a	

*Concentración de AIA en mg/L, valores con la misma letra son estadísticamente iguales para $p \leq 0.05$.

Efecto de M1 y G1 en maíz, caña de azúcar y pitahaya. En la valoración de la inoculación de M1 y G1 en distintos modelos vegetales se observa que ambas cepas poseen efectos positivos en esquejes de Pitahaya tanto en masa radicular como en número de raíces pues presentan valores estadísticamente iguales al control + para ambas variables (Cuadro 5), los efectos positivos de la inoculación de cepas del género *Azospirillum* en diversos cultivos se han atribuido principalmente al mejoramiento en el desarrollo de la raíz (Fallik y Okon, 1996; Burdman *et al.*, 1997; Döbbelaere *et al.*, 2002).

Asimismo, en caña de azúcar para las variables altura, número de brotes y peso se observa que la inoculación de G1 presenta valores estadísticamente iguales al control + en concordancia con lo reportado por Sevilla *et al.* (1998) quienes observaron un incremento considerable en la biomasa de plantas de caña de azúcar inoculadas con promotores de crecimiento vegetal en comparación con plantas no inoculadas, del mismo modo se encontró en esta investigación que el efecto de su inoculación es mayor en comparación con los controles negativos empleados para cada modelo vegetal (Muñoz y Caballero, 2003). También puede observarse que la coinoculación no posee mayores efectos que la inoculación simple de M1 y G1 en las variables medidas para cada modelo vegetal (Cuadro 5). La producción de ácido indol acético, y la alta sensibilidad de las raíces a dicha hormona son fundamentales, en la respuesta a la inoculación de *Azospirillum* donde se observa frecuentemente un mayor

Quantification of ammonia nitrogen. In determining ammonium notes that both M1 and G1 are capable of fixing nitrogen (Table 4), shows that extract broth soil strain M1 produces significantly greater amounts (14.74 $\mu\text{mol L}^{-1}$) to those produced by G1 (5.17 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and generated by co-inoculation of both strains (11.21 $\mu\text{mol L}^{-1}$), higher concentrations of ammonium for both strains are also observed in soil extract broth compared to minimal medium. The ammonium concentrations found in this study are consistent with those previously reported for strains of *Azospirillum* sp. (García *et al.*, 2010).

Cuadro 4. Cuantificación de nitrógeno amoniacal en diferentes medios de cultivo.

Table 4. Quantification of ammoniacal nitrogen in different culture media.

N ₂ amoniacal ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Cepa
Caldo extracto de suelo
Medio mínimo
G1
5.17 cd*
3.21 d
M1
14.74 a
6.89 c
M1-G1
11.21 b
3.73 d

*Valores con la misma letra son estadísticamente iguales para $p \leq 0.05$.

Effect of M1 and G1 in corn, sugar cane and pitahaya. In assessing the inoculation of M1 and G1 in different plant models it shows that both strains have positive effects on cuttings pitahaya both root mass and number of roots as they present statistically equal values at + control for both variables (Table 5), the positive effects of inoculation of strains of the genus *Azospirillum* in various crops have been attributed mainly to the improvement in the development of the root (Fallik and Okon, 1996; Burdman *et al.*, 1997; Döbbelaere *et al.*, 2002).

Cuadro 5. Efecto de la inoculación de M1 y G1 sobre pitahaya y caña de azúcar.

Table 5. Effect of inoculation of M1 and G1 on pitahaya and sugar cane.

Cepa	Pitahaya	Caña de azúcar
Masa radicular *	# raíces	Altura**
Grosor de tallo #	brotes	Peso ***
G1	21.2 ab	39.1 ab
	121.2 a	3.7 a
	4.1 a	2.598 ab
M1	25.3 a	43.1 a
	110.1 bc	3.5 a
	3.3 ab	2.456 b
M1-G1	19.4 b	37.6 bc
	119.5 ab	3.6 a
	3.9 a	2.504 ab
Control +	22.1 a	42.2 a
	118.3 ab	3.5 a
	3.9 a	2.812 a
Control -	17.2 c	34.3 c
	100.4 c	3.4 a
	2.9 b	2.167 c

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales para $p \leq 0.05$. *masa radicular medida en gramos, ** Altura medida en centímetros, *** peso medido en kilogramos.

desarrollo radical, que se traduce en mayor superficie de absorción de nutrientes, y así, un mayor desarrollo de la parte aérea de la planta (Cholula, 2005).

La inoculación sobre semillas de maíz muestra que M1 posee efectos mayores en comparación con G1 en volumen radicular (Figura 3), se puede apreciar que la coinoculación de ambos modelos bacterianos resulta en un efecto semejante al mostrado por M1 y que los tratamientos inoculados poseen mayor volumen radicular que el testigo no inoculado (Ilyas *et al.*, 2012). Estos resultados ponen de manifiesto la potencialidad de los modelos microbianos aislados como promotores de crecimiento vegetal.

Conclusiones

De acuerdo a los resultados observados en cada uno de los ensayos se demuestra que las cepas aisladas son promotoras de crecimiento vegetal caracterizadas de forma parcial como *Azospirillum* sp. (G1) y *Gluconacetobacter* sp. (M1). Ambos modelos microbianos son capaces de sintetizar AIA con una producción mayor por parte de G1, por otro lado, M1 demuestra mayor capacidad de producción de nitrógeno amoniacal. Se encontró que tanto la concentración de Triptona, como el pH y el estrés osmótico son factores que inciden de manera directa en la producción de AIA. Finalmente se puede afirmar que no existe un efecto mayor en planta generado por la co-inoculación de ambas cepas en comparación con los esquemas de inoculación simple en los tres modelos vegetales empleados y finalmente que tanto G1 como M1 inoculadas a razón de 200 mL/36 m² con concentración de 1X10¹¹ UFC mL⁻¹ logran disminuciones de hasta del 70% en los esquemas de fertilización química en Caña de azúcar obteniendo variables de rendimiento semejantes al control+, por lo que estos modelos microbianos pueden ser considerados promisorios en la elaboración de biofertilizantes en esta región.

Agradecimientos

El desarrollo experimental de este trabajo fue logrado gracias al financiamiento otorgado por el Programa Para el Desarrollo Profesional Docente y por la Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros.

Also, sugar cane for the variables height, weight and number of outbreaks observed that inoculation of G1 presented statistically equal to the control values + in accordance with those reported by Sevilla *et al.* (1998) who observed a significant increase in plant biomass sugar cane inoculated with promoters of plant growth compared to uninoculated plants, likewise found in this investigation that the effect of inoculation is larger compared to negative controls used for each model plant (Muñoz and Caballero, 2003). It can also be seen that co-inoculation has no greater effect than the simple inoculation of M1 and G1 in the variables measured for each plant model (Table 5). The production of indole acetic acid, and the high sensitivity of the roots to the hormone are fundamental, in response to inoculation of *Azospirillum* where is often observe more radical development, which results in higher surface absorption of nutrients, and so, further development of the aerial part of the plant (Cholula, 2005).

The inoculation of maize seeds shows that M1 has higher effects compared to G1 in root volume (Figure 3), we can see that the co-inoculation of both bacterial models results in a similar to that shown by M1 effect and the inoculated treatments have greater root volume than the uninoculated (Ilyas *et al.*, 2012). These results demonstrate the potential of microbial models isolated as plant growth promoters.

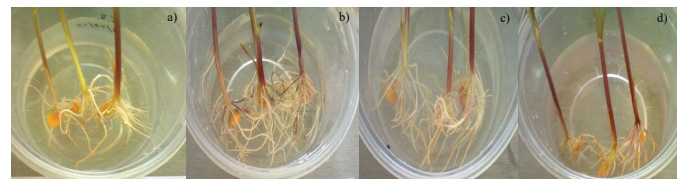


Figura 3. Efecto de M1 y G1 sobre semillas de maíz germinadas en agar agua, a) semillas inoculadas con G1; b) semillas inoculadas con M1; c) semillas inoculadas G1-M1; y d) semillas no inoculadas.

Figure 3. Effect of M1 and G1 germinated corn seeds on agar water, a) seeds inoculated with G1; b) seed inoculated with M1; c) seed inoculated G1-M1; and d) non-inoculated seeds.

Conclusions

According to the results observed in each of the tests it demonstrated that isolates are promoting plant growth partially characterized as *Azospirillum* sp. (G1) and *Gluconacetobacter* sp. (M1). Both microbial models are capable of synthesizing

Literatura citada

- Aguilar, P. J.; Xiqui, V. M.; García, G. S. and Baca, B. E. 2008. Producción del ácido indol 3- acético en *Azospirillum brasilense*. Rev. Latinoam. Microbiol. 50(1-2):29-37.
- Barbosa, E. A.; Perin, L. y Reis, V. M. 2006. Uso de fuentes de carbono por *G. diazotrophicus* aislados de plantas de cana-de-açúcar. Pesq. Agropec Bras. 41:827-833.
- Burdman, S.; Kigel, J. and Okon Y. 1997. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Soil Biol. Biochem. 29:923-929
- Caballero, M. J.; Carcaño, M. G. and Mascarúa, E. A. 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. Symbiosis 13(1-3):243-253.
- Caballero, M. J.; López, R. L. y Bustillos, C. R. 1999. Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett. 178(2):283-288.
- Cárdenas, D. M.; Garrido, M. F.; Bonilla, R. R. y Baldani V. L. 2010. Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum* sp. en pasto guinea (*Panicum maximum* Jacq.) del Valle del Cesar. Pastos y Forrajes. 33(3):67-76.
- Cavalcante, V. A. and Döbereiner, J. A. 1988. New acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. Plant Soil. 108:23-31.
- Cholula, L. P. 2005. Estudio de la producción de poli β -hidroxibutirato (PHB) en *Azospirillum brasilense* Sp7. Centro de Biotecnología Genómica IPN Tamaulipas, México. 42-82 pp.
- Manzano, J. and Heydrich, M. 2005. Physiological characterization of sugarcane's endophytic microbial community. Rev. Colomb. Biotecnol. 7(1):66-75.
- Collins, C. H. and Lyne, P. M. 1980. Microbiological methods. Butterworth and Co. (Publishers) Ltd., London. 272-273 pp.
- Dibut, B.; Ortega, M.; Martínez, R.; Fey, L. y Ríos, Y. 2005. Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para Cuba. Cultivos Tropicales. 26(2):5-10.
- Döbbelaere, S.; Croonenborghs, A.; Thys, A.; Ptacek, D.; Okon, Y. and Vanderleyden, J. 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. Biol. Fertil. Soils 36:284-297.
- Döbereiner, J. 1995. Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. In: methods in applied soil microbiology and biochemistry. Editado por Kassem Alef y Paolo Nannipieri. Academic Press Limited. London, Great Britain. 134-139 pp.
- Fallik, E. and Okon, Y. 1996. Inoculations of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. Soil Biol. Biochem. 28:123-126.
- Fuentes, R. L. E.; Caballero, M. J.; Sepúlveda, J. and Martínez, R. E. 1999. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus*, and indolacetic is inhibited by high N-fertilization. FEMS. Microbiol. Ecol. 29:117-128.
- Fuentes, R. L. E.; Bustillos, R.; Tapia, A.; Jiménez, S. T.; Wang, E. T., Martínez, R. E. and Caballero, M. J. 2001. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johanna* sp. nov., and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1305-1314.
- AIA with increased production by G1, on the other hand, M1 shows increased production capacity of ammonia nitrogen. It was found that both the concentration of Tryptone, such as pH and osmotic stress are factors that directly affect production in AIA. Finally we can say that there is no greater effect on plant generated by co-inoculation of both strains compared with schemes simple inoculation in three plant models used and finally that both G1 and M1 inoculated at a rate of 200 mL/36 m² with concentration of 1X10¹¹ UFC mL⁻¹ achieve reductions of up to 70% in the schemes of chemical fertilizer in sugar cane obtaining variables such performance control +, so these microbial models can be considered promising in the development of bio-fertilizers in this region.

End of the English version



- García, F.; Muñoz, H.; Carreño, C. and Mendoza, G. 2010. Characterization of native strains of *Azospirillum* spp. and its effect on growth of *Oryza sativa* L. "rice" in Lambayeque. Scientia Agropecuaria. 1:107-116.
- Glickman, E. and Dessaux, Y. 1994. A critical examination of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Am. Soc. Microbiol. 61(2):793-796.
- Hirsch, A. M.; Lum, M. R. and Downie, J. A. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? Plant Physiol. 127:1484-1492.
- Holt, J.; Bergey, D. and Krieg, N. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. In: Sneath, Staley, J. and Williams, S. 9th (Ed.). Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 56 p.
- Hynes, R. K.; Leung, G. C.; Hirkala, Y. and Nelson, L. M. 2008. Isolation, selection, and characterization of beneficial rhizobacteria from pea, lentil, and chickpea grown in western Canada. Can. J. Microbiol. 54:248-258.
- Ilyas, N.; Bano, A.; Iqbal, S. and Iqbal, N. 2012. Physiological, biochemical and molecular characterization of *Azospirillum* spp. isolated from maize under water stress. Pak. J. Bot. 44:71-80.
- Kirchhof, G.; Baldani, J. I.; Reis, V. M. and Hartmann, A. 1998. Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. Can. J. Microbiol. 44:12-19.
- Lara, C.; Oviedo, L. and Alemán, A. 2012. Strain native with potential in the indol acetic acid production to improve the agriculture. Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial. 9(1):17-23.
- Lee, S.; Flores, E. M.; Contreras, Z. M.; García, F. L.; Escamilla, J. E. and Kennedy, C. 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. J. Bacteriol. 186:5384-5391.
- Madhaiyan, M.; Poonguzhali, S.; Hari, K.; Saravanan, U. S. and Sa, T. 2006. Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Pesticide Biochem. Physiol. 84:143-154.

- Martínez, M. L. J.; Soto, U. L.; Baca, B. E. and Sánchez, J. A. 2003. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett. 228(2):167-173.
- Muñoz, R. J. and Caballero, M. J. 2003. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. Microbial Ecol. 46:454-464.
- Pérez, J. y Casas, M. 2005. Estudio de la interacción planta-*Azospirillum* en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum* sp.). INICA. Boyeros, Cuba. Cultivos tropicales. 26(4):13-19.
- Reis, V. M.; Olivares, F. L. and Döbereiner, J. 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic hábitat. World J. Microbiol. Biotech. 10:401-405.
- Sahasrabudhe, M. 2011. Screening of rhizobia for indole acetic acid production. Ann. Biological Res. 2(4):460-468.
- Sevilla, M.; De Oliveira, A.; Baldani, I. and Kennedy, C. 1998. Contributions of the bacterial endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition. A preliminary study. Symbiosis 25:181-191.
- Sevilla, M.; Burris, R. H.; Gunapala, N. and Kennedy, C. 2001. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif mutant strains. Mol. Plan-Microbe Int. 14:358-366.
- Sievers, M.; Schlegel, H. G.; Caballero, M. J.; Döbereiner, J. and Ludwig, W. 1998. Phylogenetic identification of two major nitrogen-fixing bacteria associated with sugarcane. System. Appl. Microbiol. 21:505-508.
- Singh, D.; Sharma, A. and Kaur, G. 2013. Biochemical and molecular characterization of the bacterial endophytes from native sugarcane varieties of Himalayan region. Biotech. 3:205-212.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganisms-plant signaling. FEMS Microbiol. Rev. 31:425-448.
- Vivienne, N.; Matiru, F. D. and Dakora, S. 2004. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. Afr. J. Biotechnol. 3(1):1-7.