

Gluconacetobacter diazotrophicus es una bacteria Gram-negativa que normalmente es endófito de plantas como la caña de azúcar, la piña, camote, pastos, entre otras. Sin embargo, también es posible detectarla en ambientes rizosféricos ricos en materia orgánica como el cafeto. Las cepas de *G. diazotrophicus* se caracterizan por tener la capacidad de fijar nitrógeno bajo condiciones donde la concentración de azúcar es elevada y el pH es muy bajo, por lo que se propuso como la bacteria clave que transfiere nitrógeno a la caña de azúcar. Adicionalmente, esta bacteria es capaz de estimular el crecimiento de plantas mediante mecanismos independientes a la fijación biológica de nitrógeno, por ejemplo mediante la producción de fitohormonas como el ácido indol acético. Otra propiedad interesante de *G. diazotrophicus* es que produce compuestos de tipo antimicrobiano que afectan al crecimiento de hongos fitopatógenos, por lo que se ha propuesto que esta bacteria podría hacer un biocontrol efectivo. Los estudios de interacción bacteria-planta muestran que el nitrógeno combinado afecta a la asociación de esta bacteria con las plantas, por lo que esta información debe considerarse si se requieren explotar sus beneficios. Ya han transcurrido 20 años desde su aislamiento y algunas patentes han sido publicadas con el objetivo de explotar sus atributos, no obstante aún no hay productos comerciales visibles en el mercado que contengan a este microorganismo.

Aplicaciones potenciales de *Gluconacetobacter diazotrophicus* para incrementar los rendimientos agrícolas

América Paulina Rivera-Urbalejo^{1,2}, Dalia Juárez-Hernández¹, Ana Laura Hernández-Tenorio¹, Yolanda Elizabeth Morales-García*^{1,3}

¹Grupo Supervivencia y Ecología de Microorganismos (GESM), Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), Instituto de Ciencias (IC), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Puebla, México. Edificio IC-11, Ciudad Universitaria, San Manuel, Puebla, México. C. P. 72570.

²Facultad de Estomatología, BUAP

³Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP

lissiamor@yahoo.com.mx

América Paulina Rivera-Urbalejo, Dalia Juárez-Hernández, Ana Laura Hernández-Tenorio, Yolanda Elizabeth Morales-García, Aplicaciones potenciales de *Gluconacetobacter diazotrophicus* para incrementar los rendimientos agrícolas

Alianzas y Tendencias-BUAP. 2019, 4 (13): 32-44.

Recibido: 23 febrero 2019.

Aceptado: 15 marzo 2019.



RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

Gluconacetobacter diazotrophicus is a Gram-negative endophytic bacterium isolated from plants such as sugar cane, pineapple, sweet potato, grasses, among others. However, it is also possible isolate this bacterium from rhizospheric environments rich in organic matter such as coffee plants. Strains of *G. diazotrophicus* have the capability to fix nitrogen under conditions where the concentration of sugar is high and the pH is very low, so it was proposed as the key bacterium that transfers nitrogen to sugarcane. Additionally, this bacterium is able of stimulate the plant growth by mechanisms independent of biological nitrogen fixation, for example by the production of phytohormones such as indole acetic acid. Another interesting property of *G. diazotrophicus* is that it produces antimicrobial compounds that affect the growth of phytopathogenic fungi, therefore it has been proposed that this bacterium could make an effective biocontrol. The bacteria-plant interaction studies show that combined nitrogen affects the association of this bacteria with plants, so this information must be considered if its benefits are to be exploited. It has already been 20 years since its isolation and some patents have been published with the aim of exploiting its attributes, however there are still no commercial products visible in the market that contain this microorganism.

Keywords: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, endofito, PGPR, fitoestimulación

Desde la emergencia de la revolución verde, se han usado cantidades elevadas de nitrógeno combinado en los campos de cultivo con el fin de incrementar los rendimientos, no obstante esta forma de fertilización ha tenido un impacto negativo en el medio ambiente, especialmente aumentando los niveles de lixiviación, eutrofización, incremento en los niveles de óxidos de nitrógeno (NO_x) y efectos sobre la capa de ozono en la estratósfera (1). Para aliviar el daño será necesario modificar las prácticas agrícolas por alternativas más amigables con el medio ambiente sin disminuir los rendimientos de los cultivos (2). Las bacterias benéficas podrían ser una alternativa excelente, debido a los múltiples mecanismos que ellas pueden proveer a sus plantas hospederas (3), por ejemplo, aporte de nitrógeno vía FBN, producción de fitohormonas, solubilización de fosfatos, solubilización de zinc, biocontrol y estimulación de la defensa en plantas (3,4). Los estudios de estas bacterias han permitido conocer a cuales podríamos usar en formulaciones para la inoculación de semillas o plantas, a esas formulaciones se les denomina "inoculantes" y se subclasifican en función del tipo de beneficio que aportan sobre las plantas; entre los que destacamos a los biofertilizantes, biocontroladores, biosolubilizantes, biodegradantes y los fitoestimulantes (5). En general las bacterias que están siendo usadas para promover el crecimiento de plantas son de tipo rizosférico, por su forma fácil de colonización en la raíz a partir de la semilla inoculada, por ejemplo una bacteria ampliamente

utilizada para las formulaciones comerciales es *Azospirillum brasilense* (3). Las bacterias endófitas promotoras del crecimiento de plantas también podrían explotarse aunque su forma de inoculación podría variar para que las bacterias colonicen el interior de las plantas. Una bacteria endófitas con potencial uso comercial es *Gluconacetobacter diazotrophicus* (6).

Fuentes de aislamiento de *G. diazotrophicus*.

Gluconacetobacter diazotrophicus es una bacteria que inicialmente fue aislada del interior de tejidos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (7) y a lo largo de los años se ha encontrado asociada como endófitas a diversas plantas como por ejemplo el camote (*Ipomoea batatas*) (8), el Ragi (9), arroz de humedal (*Oryza sativa*) (10), pasto (*P. purpureum* var. *Camerún*) (11), papaya (*Carica papaya*) (12), zanahoria (*Daucus carota* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.), betabel (*Beta vulgaris* L.) (13), la piña (*Ananas comosus*) (14) y del interior y rizósfera de cafeto (15). Son muy diferentes las características fisiológicas de las plantas con las que se asocia *G. diazotrophicus*, sin embargo muchas se caracterizan por acumular azúcar en su interior. En caña de azúcar se ha observado que algunos factores afectan fuertemente en el establecimiento de esta bacteria, entre los que se pueden destacar que la edad de la planta influye negativamente en la población de *G. diazotrophicus* (16). Los cambios fisiológicos que las plantas de caña de azúcar experimentan a lo largo de su desarrollo son diversos como por ejemplo cambios en las relaciones de agua en los tejidos (17) y la

acumulación de sacarosa también ocurre durante el crecimiento (18,19), pero aún se desconoce cuáles cambios son los que determinan la disminución de la población de *G. diazotrophicus*. Interesantemente, *G. diazotrophicus* ha sido aislado a partir de tallos de caña de azúcar de plantas adultas (20), lo que sugiere las poblaciones son recuperadas en periodos avanzados de la interacción. La diversidad de cepas de *G. diazotrophicus* que han sido aisladas de la caña de azúcar es limitada (21), pocos son los genotipos que interactúan con la caña de azúcar, no obstante, el genotipo de bacteria que interactúa con las plantas es determinante para que la interacción sea exitosa y las cepas del genotipo 3 son las que mejor interactúan con la caña de azúcar (16).

La variedad de caña de azúcar también influye fuertemente en la interacción y algunas variedades como la MEX 57-473 son mejores para interactuar con *G. diazotrophicus* ya que permiten un mejor establecimiento de la bacteria y por periodos más prolongados (16). Se ha reportado que algunas variedades de caña de azúcar muestran una mayor capacidad de nitrógeno (22), posiblemente porque estas variedades interactúan mejor con las bacterias fijadoras de nitrógeno.

Por otro lado, el nivel de nitrógeno combinado aplicado a los cultivos influye negativamente en la interacción de esta bacteria con la caña de azúcar (16,23,20). De hecho la frecuencia de aislamiento de *G. diazotrophicus* disminuye si los cultivos de

Mecanismos de *G. diazotrophicus* para promover el crecimiento de plantas

Fijación biológica de nitrógeno. Esta bacteria fue inicialmente aislada en medios semigelificados carentes de nitrógeno con el fin de capturar a la bacteria responsable de llevar a cabo la fijación de nitrógeno en plantas de caña de azúcar (7). Aunque la bacteria es capaz de fijar altas tasas de nitrógeno bajo condiciones in vitro (29), el aporte de nitrógeno a las plantas de caña de azúcar es muy bajo, por lo que la fijación de nitrógeno no es el mecanismo de promoción de crecimiento principal de esta bacteria (30).

Fitoestimulación por hormonas. Este es el mecanismo principal de estimulación de crecimiento de *G. diazotrophicus* en caña de azúcar (16). Hay varias fitohormonas que son producidas por estas bacterias y que regulan el crecimiento de plantas, por ejemplo: las giberelinas (31) y las auxinas como el ácido indol acético (AIA) (24). Una mutante derivada de la cepa PAI 5 de *G. diazotrophicus* denominada Mad10 resultó incapaz de sintetizar AIA (32). La mutante colonizó a las plantas de forma similar a la cepa silvestre, sin embargo, fue incapaz de estimular el crecimiento de estas en comparación a la cepa silvestre o una mutante nif- (cepa que no fija nitrógeno); sugiriendo que el AIA es el mecanismo principal de promoción de crecimiento para esta bacteria. Las plantas inoculadas con *G. diazotrophicus* muestran mayor tamaño de raíz comparado con las plantas control, en consecuencia estas plantas tienen un

caña de azúcar son fertilizados con dosis elevadas de nitrógeno combinado (23,24). Más recientemente, se observó que la disminución de la población de esta bacteria en presencia de nitrógeno combinado está relacionado con los cambios fisiológicos que sufre la planta y la alta fertilización provoca una disminución mayor de la bacteria cuando está asociada a plantas (25), sin embargo, algunos cambios pleomórficos sobre la bacteria han sido documentados en presencia de altos niveles de fertilización lo cual podría ser responsable también de la disminución de la población de esta bacteria cuando se asocia a las plantas (10,26). Es conocido que algunos cambios en la concentración de sacarosa y actividades enzimáticas ocurren en los tejidos de la caña de azúcar en dependencia de la forma de nitrógeno combinado aplicado a las plantas (18,19), será interesante conocer cuáles son los determinantes que desencadenen efectos negativos en la población de *G. diazotrophicus*. La influencia negativa del nitrógeno combinado sobre la población de otras bacterias endófitas ha sido también mostrada (27). Sin embargo, las poblaciones de algunas bacterias como *Herbaspirillum seropedicae* (26) y *Pseudomonas fluorescens* (28) no son afectadas en asociación con plantas cuando éstas se fertilizan con dosis elevadas de nitrógeno combinado, lo que sugiere que los cambios fisiológicos solo afectan a algunas especies bacterianas.

área incrementada para la absorción de nutrientes (16).

Solubilización de fosfatos. El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento de las plantas y en suelos este está comúnmente en una forma mineral (1). Uno de los mecanismos de promoción de crecimiento bastante promisorios para *G. diazotrophicus* es su capacidad para solubilizar fosfatos. Los ensayos cualitativos usando fosfato tricalcico como única fuente de fósforo han mostrado que esta bacteria solubiliza fosfatos solo cuando las aldosas fueron adicionadas como fuente de carbono (33). La oxidación extracelular de aldosas mediante la vía de una pirroloquinolin quinona unida a glucosa deshidrogenada (PQQ-GDH) es la vía metabólica principal de la glucosa para *G. diazotrophicus*. En una mutante PQQ-GDH de esta bacteria no fue posible observar la solubilización de fosfatos y tampoco la acidificación del medio de cultivo; sugiriendo la participación de los ácidos orgánicos en la solubilización. Usando una librería de mutantes obtenida mediante transposones se seleccionaron mutantes defectivas en la solubilización de fosfatos, la secuenciación de los genes implicados mostró que la producción de ácido glucónico es fundamental para la solubilización de los fosfatos (34).

Solubilización de zinc. El zinc es un elemento que se requiere en bajas cantidades, sin embargo es de gran relevancia para el funcionamiento de las plantas (35), sin embargo este elemento tampoco está en forma biodisponible en los suelos. El potencial solubilizador de zinc ha sido evaluado

para *G. diazotrophicus* usando glucosa y sacarosa como fuentes de carbono (36). La capacidad de solubilizar zinc es variable en función de la cepa explorada y la cepa PAI 5 solubilizó eficientemente los compuestos de zinc ensayados siendo el ZnO mejor solubilizado en comparación con ZnCO₃ ó Zn(PO₄)₂. La solubilización de zinc también está influenciada por los ácidos orgánicos y el ácido glucónico es clave para dicha función (34).

Control Biológico. *G. diazotrophicus* ha sido explorado en su capacidad para inhibir patógenos de plantas por ejemplo, esta bacteria inhibe el crecimiento de *Colletotrichum falcatum*, un Moho causal de la podredumbre roja de la caña de azúcar (37). También inhibe el crecimiento de *Xanthomonas albilineans*, una bacteria que produce escaldamiento de las hojas debido a un daño vascular y aparentemente esta inhibición ocurre a través de una molécula de tipo bacteriocina (38). Aunque estos trabajos han sido desarrollados en condiciones de laboratorio, se sugiere que la inhibición de patógenos podría ocurrir en asociación con plantas. De hecho se ha demostrado que *G. diazotrophicus* es capaz de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* cuando se asocia al camote (39). *F. oxysporum* afecta el crecimiento de diversas plantas por lo que su biocontrol por esta bacteria es de gran relevancia. Los compuestos implicados en el biocontrol de *F. oxysporum* por *G. diazotrophicus* son la pioluterina y algunos compuestos de tipo volátil (39). Recientemente una formulación que contiene una mezcla de tres bacterias entre las que destaca *G. diazotrophicus*

fue diseñada para eliminar hongos durante el desarrollo de plántulas de papa (40). La competitividad de las cepas bacterianas está ligada a la producción de sustancias inhibitorias y las cepas del genotipo 3 de *G. diazotrophicus* producen una sustancia similar a las bacteriocinas que les permiten predominar en sus ambientes (41); inhibiendo el crecimiento de otros genotipos de la misma bacteria, será interesante evaluar en el futuro si esta característica está ligada a la inhibición de patógenos. Interesantemente se ha descrito que algunos patógenos como *Xanthomonas albilineans* también pueden ser suprimidos tras la inducción de la respuesta de defensa de las plantas por *G. diazotrophicus* (42), de esta forma una alternativa para el control de patógenos podría ser el uso de esta bacteria como protector anticipado en las plantas.

Formulación de inoculantes con *G. diazotrophicus*

Los esfuerzos para conocer más acerca de las potencialidades de esta bacteria benéfica siguen realizándose y es importante destacar que ya se cuenta con genomas completos secuenciados y anotados (43,44), así como también estudios globales realizados mediante proteómica para conocer a las proteínas que se expresan durante la interacción de *G. diazotrophicus* con la caña de azúcar (45). El conocimiento generado será a base para el diseño de inoculantes efectivos que se destinen para potenciar la producción agrícola. Diferentes son los estudios que se han realizado con el fin de conocer el efecto de la inoculación de

G. diazotrophicus en plantas de interés agrícola y se ha observado que esta bacteria propicia un mayor tamaño de plantas, peso seco e incluso mayor número de frutos (Tabla 1).

Tabla 1. Efectos de la inoculación de *G. diazotrophicus* en plantas de interés agrícola e incrementos de producción de cultivos

	Log. No UFC/g peso fresco	Característica principal de su promoción de crecimiento	Cepas usadas	Referencia
Tomate	4.0	Incrementó número y peso de frutos	PAL 5 and UAP 5541/pRGS561	(46)
Maiz	5.0	Incremento el crecimiento de plantas, solo en presencia de nitrógeno combinado	PAL 5	(47)
Trigo	2.0-5.0	No hay promoción del crecimiento	PAL 5, UAP 5541/pRGS561, cepa Delta-Nilo	(48,49)
Caña de azúcar	5.0-6.0	Mayor peso fresco, peso seco y altura	PAL 5, UAP 5560	(16,30)
Papa y Yuca	No determinado	Mayor número de tuberculos y mayor tamaño y biomasa	No especificado	(12)

En la actualidad se han propuesto diversas formulaciones que contienen a *G. diazotrophicus*, por ejemplo un inoculante multiespecies que contiene a la bacteria potencia el crecimiento de caña de azúcar (50). Otra formulación

CONCLUSIÓN

G. diazotrophicus es una especie bacteriana que ha sido aislada a partir del interior de plantas ricas en sacarosa y también de la rizósfera de plantas ricas en materia orgánica. Esta bacteria promueve el crecimiento de plantas diversas a través de diversos mecanismos entre los que destaca la fijación biológica de nitrógeno, la producción de fitohormonas, la solubilización de fósforo y zinc, el biocontrol de patógenos y la estimulación de la defensa de plantas. Cada vez hay mayor investigación sobre esta bacteria y el número de patentes está incrementando, por lo que se predice que en un futuro cercano se usarán formulaciones que contengan a esta bacteria para potenciar el rendimiento de los cultivos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Pazos-rojas LA, Marín-cevada V, Elizabeth Y, García M, Baez A. Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. *Rev Iberoam Ciencias*. 2016;3(7):72–85.

[2] Baez-Rogelio A, Morales-García YE, Quintero-Hernández V, Muñoz-Rojas J. Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. *Microb Biotechnol* [Internet]. 2017;10(1):19–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12448>

multiespecies también conteniendo esta bacteria estimula el crecimiento de maíz, papa, jitomate y otros cultivos (40,51). El número de patentes publicadas que contemplan a *G. diazotrophicus* es muy pequeño, sin embargo, se ha incrementado en los últimos dos años (Fig. 1). El país con mayor número de patentes en este campo es Reino Unido (12 patentes) seguido por México (2 patentes), otros países contribuyen con una patente (Brasil, India y Corea del Sur). En cuanto a formulaciones comerciales, aun no existen formulaciones comerciales que contengan a esta bacteria, no obstante dado su potencial elevado para promover el crecimiento de plantas, su compatibilidad con el medio ambiente y su capacidad de proteger a las plantas contra los patógenos, se puede pronosticar que será una bacteria que se usará con fines de inoculación bacteriana dentro de formulaciones de segunda generación (2,5).

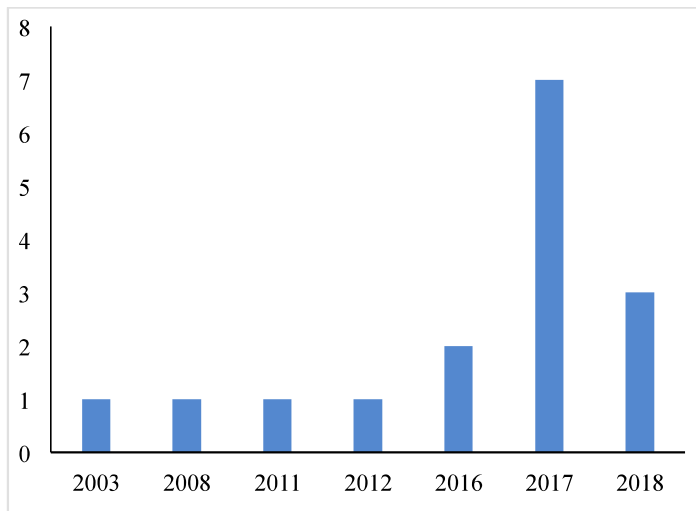


Figura 1. Número de patentes por año publicadas sobre *G. diazotrophicus*

- [3] Molina-Romero D, Bustillos-Cristales M del R, Rodríguez-Andrade O, Morales-García YE, Santiago-Saenz Y, Castañeda-Lucio M, et al. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias , aislamientos en América y potencial biotecnológico. *Biológicas*. 2015;17(2):24–34.
- [4] Sarathambal C, Thangaraju M, Paulraj C, Gomathy M. Assessing the Zinc solubilization ability of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in maize rhizosphere using labelled 65Zn compounds. *Indian J Microbiol* [Internet]. 2010;50(1):103–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12088-010-0066-1>
- [5] Vivanco-Calixto R, Molina-Romero D, Y.E. M-G, V. Q-H, A. M-H, A. B-R, et al. Reto agrobiotecnológico: inoculantes bacterianos de segunda generación. *Alianzas y Tendencias* [Internet]. 2016;1(April):9–19. Available from: https://www.researchgate.net/publication/307540839_Reto_agrobiotecnologico_inoculantes_bacterianos_de_segunda_generacion
- [6] Pallavi, Chandra D, Sharma AK. Commercial microbial products: Exploiting beneficial plant-microbe interaction. In: Singh DP, Singh HB, Prabha R, editors. *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives: Volume 2: Microbial Interactions and Agro-Ecological Impacts* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2017. p. 607–26. Available from: https://doi.org/10.1007/978-981-10-6593-4_25
- [7] Cavalcante VA, Döbereiner J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* [Internet]. 1988;108(1):23–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02370096>
- [8] Dibut B, Martínez-Viera C, Ortega M, Ríos Y, Planas L, Rodríguez J, et al. Situación actual y perspectiva de las relaciones endófitas planta-bacteria. Estudio de caso *Gluconacetobacter diazotrophicus*-cultivos de importancia económica. *Cultiv Trop*. 2009;30(4):16–23.
- [9] Loganathan P, Sunita R, Parida AK, Nair S. Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. *J Appl Microbiol* [Internet]. 1999 Jul 1;87(1):167–72. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00804.x>
- [10] Muthukumarasamy R, Cleenwerck I, Revathi G, Vadivelu M, Janssens D, Hoste B, et al. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Syst Appl Microbiol* [Internet]. 2005;28(3):277–86. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202005000287>
- [11] Döbereiner J, Reis VM, Paula MA, Olivares F. *Endophytic diazotrophs* in sugar cane, cereals and tuber plants. In: Palacios R, Mora J, Newton WE, editors. *New Horizons in Nitrogen Fixation: Proceedings of the 9th International Congress on Nitrogen Fixation, Cancún, Mexico* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 1993. p. 671–6. Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-017-2416-6_55

[12] Dibut B, Martínez R, Ortega M, Ríos Y, Fey L. Presencia y uso de microorganismos endófitos en plantas como perspectiva para el mejoramiento de la producción vegetal. *Cultiv Trop* [Internet]. 2004;25(2):13–7. Available from: <https://www.redalyc.org/html/1932/193217832002/>

[13] Madhaiyan M, Saravanan VS, Jovi DBSS, Lee H, Thenmozhi R, Hari K, et al. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiol Res* [Internet]. 2004;159(3):233–43. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450130400031X>

[14] Tapia-Hernández A, Bustillos-Cristales MR, Jiménez-Salgado T, Caballero-Mellado J, Fuentes-Ramírez LE. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microb Ecol* [Internet]. 2000;39(1):49–55. Available from: <https://doi.org/10.1007/s002489900190>

[15] Jimenez-Salgado T, Fuentes-Ramirez LE, Tapia-Hernandez A, Mascarua-Esparza MA, Martinez-Romero E, Caballero-Mellado J. *Coffea arabica* L ., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* , and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1997;63(9):3676–83. Available from: <http://aem.asm.org/content/63/9/3676.full.pdf+html>

[16] Muñoz-Rojas J, Caballero-Mellado J. Population dynamics of *Gluconacetobacter*

diazotrophicus in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microb Ecol*. 2003;46(4):454–64.

[17] Moore PH, Botha FC. *Sugarcane Physiology Biochemistry & Functional Biology*. World in Agriculture Series. 2014. 693 p.

[18] Chaughule RS, Ranade SS, Shah NC. Magnetic resonance imaging (MRI) of *Saccharum officinarum* L . (sugarcane) during its growth for sucrose content. *Indian J Exp Biol*. 2000;38(October):1062–5.

[19] Lingle SE. Sugar metabolism during growth and development in sugarcane internodes. *Crop Sci* [Internet]. 1999;39:480–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183X0039000200030x>

[20] Caballero-Mellado J, Fuentes-Ramirez LE, Reis VM, Martinez-Romero E. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1995;61(8):3008–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16535102%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1388556>

[21] Fuentes-Ramirez LE, Caballero-Mellado J. Bacterial Biofertilizers. In: Siddiqui ZA, editor. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2006. p. 143–72. Available from: https://doi.org/10.1007/1-4020-4152-7_5

[22] Urquiaga S, Xavier RP, de Morais RF, Batista RB, Schultz N, Leite JM, et al. Evidence from field nitrogen balance and ^{15}N natural abundance data for the contribution of biological N_2 fixation to Brazilian sugarcane varieties. *Plant Soil* [Internet]. 2012;356(1):5–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-011-1016-3>

[23] Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J, Sepúlveda J, Martínez-Romero E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 1999 Jun 1;29(2):117–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00603.x>

[24] Fuentes-Ramírez LE, Jiménez-Salgado T, Abarca-Ocampo IR, Caballero-Mellado J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant Soil* [Internet]. 1993;154(2):145–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00012519>

[25] Rodríguez-Andrade O, Fuentes-Ramírez LE, Morales-García YE, Molina-Romero D, Bustillos-Cristales MR, Martínez-Contreras RD, et al. The decrease in the population of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane after nitrogen fertilization is related to plant physiology in split root experiments. *Rev Argentina Microbiol* [Internet]. 2015;47(4):335–43. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S032575411500125X>

[26] Muthukumarasamy R, Revathi G, Lakshminarasimhan C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum spp.* from Indian sugarcane varieties. *Biol Fertil Soils* [Internet]. 1999;29(2):157–64. Available from: <https://doi.org/10.1007/s003740050539>

[27] Kirchhof G, Reis VM, Baldani JI, Eckert B, Döbereiner J, Hartmann A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. In: Ladha JK, de Bruijn FJ, Malik KA, editors. *Opportunities for Biological Nitrogen Fixation in Rice and Other Non-Legumes: Papers presented at the Second Working Group Meeting of the Frontier Project on Nitrogen Fixation in Rice held at the National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 1997. p. 45–55. Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-011-7113-7_6

[28] Marschner P, Gerendás J, Sattelmacher B. Effect of N concentration and N source on root colonization by *Pseudomonas fluorescens* 2-79RLI. *Plant Soil* [Internet]. 1999;215(2):135–41. Available from: <https://doi.org/10.1023/A:1004373007606>

[29] Baldani JI, Reis VM, Baldani VLD, Döbereiner J. Review: A brief story of nitrogen fixation in sugarcane; reasons for success in Brazil. *Funct Plant Biol* [Internet]. 2002 Apr 19;29(4):417–23. Available from: <https://doi.org/10.1071/PP01083>

[30] Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15 N 2 Incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and nif⁻ mutant strains. Mol Plant-Microbe Interact [Internet]. 2001;14(3):358–66. Available from:

<http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI.2001.14.3.358>

[31] Bastián F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Bottini* R, Baraldi R, et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. Plant Growth Regul [Internet]. 1998;24(1):7–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1005964031159>

[32] Lee S, Flores-Encarnación M, Contreras-Zentella M, Garcia-Flores L, Escamilla JE, Kennedy C. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome biogenesis genes. J Bacteriol [Internet]. 2004 Aug 15;186(16):5384 LP-5391. Available from: <http://jb.asm.org/content/186/16/5384.abstract>

[33] Crespo JM, Boiardi JL, Luna MF. Mineral phosphate solubilization activity of *gluconacetobacter diazotrophicus* under P-limitation and plant root environment. Agric Sci. 2011;2(1):16–22.

[34] Intorne AC, de Oliveira MV V, Lima ML, da Silva JF, Olivares FL, de Souza Filho GA. Identification and characterization of

Gluconacetobacter diazotrophicus mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. Arch Microbiol [Internet]. 2009;191(5):477–83. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0472-0>

[35] Saravanan VS, Kalaiarasan P, Madhaiyan M, Thangaraju M. Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn²⁺) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. Lett Appl Microbiol [Internet]. 2007 Mar 1;44(3):235–41. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02079.x>

[36] Saravanan VS, Madhaiyan M, Thangaraju M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Chemosphere [Internet]. 2007;66(9):1794–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653506010125>

[37] Muthukumarasamy R, Revathi G, Vadivelu M. Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal organism of red-rot of sugarcane. Curr Sci [Internet]. 2000;78(9):1063–5. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20001007709>

[38] Piñón D, Casas M, Blanch M, Fontaniella B, Blanco Y, Vicente C, et al. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas*

albilineans, a sugar cane pathogen. Res Microbiol [Internet]. 2002;153(6):345–51. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250802013360>

[39] Logeshwarn P, Thangaraju M, Rajasundari K. Antagonistic potential of *Gluconacetobacter diazotrophicus* against *Fusarium oxysporum* in sweet potato (*Ipomea batatas*). Arch Phytopathol Plant Prot [Internet]. 2011 Feb 1;44(3):216–23. Available from: <https://doi.org/10.1080/03235400902952707>

[40] Olovaldo Y, Saenz S, Laura ANA, Tenorio H, Morales YE, Laura ANA, et al. Method for obtaining potato plants from the extraction of induced sprouts in controlled conditions. [Internet]. Vol. 2015014804. Mexico: Instituto Mexicano de Propiedad Industrial; MX2015014804 (A), 2017. p. 1–25. Available from: https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?II=0&ND=3&adjacent=true&locale=en_EP&FT=D&date=20170420&CC=MX&NR=2015014804A&KC=A#

[41] Muñoz-Rojas J, Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. FEMS Microbiol Ecol [Internet]. 2005 Sep;54(1):57–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16329972>

[42] Arencibia AD, Vinagre F, Estevez Y, Bernal A, Perez J, Cavalcanti J, et al. *Gluconoacetobacter diazotrophicus* elicitate a sugarcane defense

response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. Plant Signal Behav [Internet]. 2006 Sep 1;1(5):265–73. Available from: <https://doi.org/10.4161/psb.1.5.3390>

[43] Bertalan M, Albano R, de Pádua V, Rouws L, Rojas C, Hemerly A, et al. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pa15. BMC Genomics [Internet]. 2009;10(1):450. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-450>

[44] Giongo A, Tyler HL, Zipperer UN, Triplett EW. Two genome sequences of the same bacterial strain, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA1 5, suggest a new standard in genome sequence submission. Stand Genomic Sci [Internet]. 2010;2(3):309–17. Available from: <https://doi.org/10.4056/sigs.972221>

[45] dos Santos MF, Muniz de Pádua VL, de Matos Nogueira E, Hemerly AS, Domont GB. Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. J Proteomics [Internet]. 2010;73(5):917–31. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391909003510>

[46] Luna MF, Aprea J, Crespo JM, Boiardi JL. Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Appl Soil Ecol [Internet]. 2012;61:225–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139311001971>

https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=MX&NR=2013007978A&KC=A&FT=D&ND=3&date=20150108&DB=EPODOC&locale=en_EP#

[47] Riggs PJ, Chelius MK, Iniguez AL, Kaeppler SM, Triplett EW. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Funct Plant Biol* [Internet]. 2001 Sep 26;28(9):829–36. Available from: <https://doi.org/10.1071/PP01045>

[48] Luna MF, Galar ML, Aprea J, Molinari ML, Boiardi JL. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biotechnol Lett* [Internet]. 2010;32(8):1071–6. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0256-2>

[49] Youssef HH, Fayez M, Monib M, Hegazi N. *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a natural endophytic diazotroph of Nile Delta sugarcane capable of establishing an endophytic association with wheat. *Biol Fertil Soils* [Internet]. 2004;39(6):391–7. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00374-004-0728-4>

[50] de Oliveira ALM, de Canuto EL, Urquiaga S, Reis VM, Baldani JI. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant Soil* [Internet]. 2006;284(1):23–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-006-0025-0>

51. Morales-García YE, Juárez-Hernández D, Fuentes-Ramírez LE, Munive-Hernández A, Muñoz-Rojas J. Formulación de un inoculante multiespecies para potenciar el crecimiento de plantas [Internet]. Mexico: MX/E/2013/048220; MX/a/2013/007978, 2013. p. 1–36. Available from: