



Inoculación de plántulas micropropagadas de caña de azúcar con bacterias benéficas para potenciar su producción.

Inoculation of micropropagated sugarcane seedlings with beneficial bacteria to boost their production.

RESUMEN

La caña de azúcar es una planta de alta producción mundial, a partir de la cual se obtienen muchos productos, entre los que destacan el azúcar y el etanol. Una forma de elevar los rendimientos mundiales de esta planta es implementando formas alternativas de cultivo en las que se puede incluir: la micropropagación efectiva de plántulas, su inoculación con bacterias benéficas y la introducción de estas plantas inoculadas en campo. En esta revisión se muestra una alternativa eficiente para realizar la micropropagación efectiva de diferentes variedades de la caña de azúcar y se discuten las aplicaciones que podrían tener las plántulas obtenidas, enfatizando la incorporación de bacterias benéficas, estudios de colonización, estudios de promoción del crecimiento y el incremento del estado de salud de las plantas.

Palabras clave: Micropropagación, caña de azúcar, bacterias benéficas, inoculación, fitoestimulación.

ABSTRACT

Sugar cane is a plant of high world production, from which many products are obtained, among them sugar and ethanol. One way to raise the world yields of this plant is to implement alternative forms of cultivation which can include the effective micropropagation of seedlings, their inoculation with beneficial bacteria and the introduction of these inoculated plants in the field. This review shows an efficient alternative to carry out the effective micropropagation of different varieties of sugarcane and discusses the applications that the seedlings could have, highlighting the incorporation of beneficial bacteria, colonization and growth promotion studies, and the increment of the health plants state.

América Paulina Rivera Urbalejo¹
 Osvaldo Rodríguez Andrade¹
 Yolanda Elizabeth Morales García^{1,2}
 Verónica Quintero Hernández^{1,3}
 Julieta Mariana Muñoz Morales²
 Adriana Carbajal Armenta²
 Eric Romero Navarro²
 Ariana de Jesús Ramos²
 Jesús Muñoz Rojas^{1*}

¹Grupo Ecología y Supervivencia de Microorganismo, Universidad Autónoma de Puebla

²Biotecnología BUAP

³CONACYT-BUAP

*Autor correspondiente: joymerre@hotmail.com

Yolanda Elizabeth Morales García, Verónica Quintero Hernández, Julieta Mariana Muñoz Morales, Adriana Carbajal Armenta, Eric Romero Navarro, Ariana de Jesús Ramos, y Jesús Muñoz Rojas. Inoculación de plantas micropropagadas de caña de azúcar con bacterias benéficas para potenciar su producción.

Alianzas y Tendencias. 2017, 2 (7): 15-26.
 Recibido: 14 julio 2017. Aceptado: 25 agosto 2017.

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar es una planta de gran interés agrícola que se cultiva ampliamente en los países tropicales, siendo los países que más producen este cultivo: Brasil, India, China, Tailandia, Pakistán, México, Filipinas, Australia, Argentina, Indonesia y

Colombia (1). La mayor parte de la producción mundial de caña de azúcar es destinada para la obtención de azúcar. Sin embargo, diversos productos pueden obtenerse a partir de esta planta, entre los que destacan el etanol y butanol que son usados como bio-combustibles (2–4). Cabe destacar que éstos bio-combustibles son una fuente renovable y presentan ventajas frente a los combustibles fósiles, porque éstos son convertidos completamente a dióxido de carbono (CO₂) y agua (H₂O); productos que pueden considerarse inocuos para el medio ambiente. A partir de la caña de azúcar también se puede obtener papel, cemento furfural, celulosa microcristalina, conglomerado de fibra de caña de azúcar, alimento para animales, composta, dextrano, glucosa, sorbitol, biogás, entre otros productos (5,6).

Limitantes en la producción de caña de azúcar

Los factores que afectan la producción de caña de azúcar de forma general son aquellos que se relacionan con el medio o entorno geográfico, los que resultan de características climáticas y edafológicas naturales y los que resultan de la degradación del suelo por influencia antropogénica. Estos factores influyen directamente en el precio de los productos derivados de su procesamiento, como el azúcar, que han mostrado una tendencia creciente en los mercados nacionales e internacionales (7). En relación con el medio geográfico los factores que se consideran son: El clima, el relieve y el tipo de suelo. El clima interviene mediante las precipitaciones (cantidad y distribución), la temperatura y la radiación solar (8–11). La caña de azúcar es una de las gramíneas con más exigencia de radiación solar para realizar la fotosíntesis, razón por la cual los días nublados afectan directamente su productividad. El relieve es un elemento importante en la redistribución de la humedad y del calor, por lo que se debe considerar nivelar el área de cultivo de una forma que se permita la fluidez del agua para su correcta distribución (12), sin que se llegue al extremo de causar erosión del suelo debida a una fluidez excesiva. La caña de azúcar se adapta a casi todos los tipos de suelo, sin embargo, en suelos ricos en magnesio donde la relación calcio/magnesio (Ca/Mg) es muy baja, la productividad de cultivos es poco favorable (13,14). De la misma forma ocurre si el contenido en carbonato de calcio es alto.

La degradación del suelo está relacionada con la actividad y necesidades del humano. El desarrollo histórico-social y político de los pueblos conjuntamente con las necesidades económicas ha provocado el uso exagerado de la tierra para suplir las necesidades de alimentos; lo cual conduce al empobrecimiento de materia orgánica de los suelos

(15,16). Los suelos donde se cultiva continuamente a la caña de azúcar quedan desprovistos de materia orgánica, debido a que la planta demanda una elevada cantidad de nutrientes y en consecuencia el suelo puede ir sufriendo degradación lo que hace que en ciclos posteriores se apliquen cada vez mayores dosis de fertilizante para observar los mismos rendimientos. Por ejemplo en Hawaii se aplican en promedio 400 Kg de nitrógeno/hectárea (N/ha) para obtener los rendimientos adecuados. La caña de azúcar particularmente requiere de altas cantidades de fertilizante nitrogenado para cubrir sus necesidades fotosintéticas y desde el surgimiento de la revolución verde (17), se ha incrementado su uso, observando una aplicación promedio en México de 300 Kg de N/ha para obtener los rendimientos esperados (18). Sin embargo, es conocido que solo un porcentaje pequeño es absorbido por la plantas (25-40%) el restante se pierde por lixiviación hacia mantos acuíferos provocando la eutrofización de éstos (17). La influencia humana ha provocado también efectos adversos sobre los suelos como la salinización por uso excesivo de fertilizantes (ej. cloruro de potasio), destrucción de la estructura y compactación, contaminación por el uso de herbicidas y pesticidas (17).

El uso de azúcar de caña comparado con el uso de jarabe de maíz

Como se mencionó anteriormente uno de los principales problemas para producir a la caña de azúcar, es el elevado nivel de nitrógeno combinado (nitratos o compuestos de amonio) que la planta requiere para su desarrollo, lo cual se traduce en un elevado costo para la producción de azúcar (7). En la actualidad se prefiere usar jarabe de maíz como edulcorante, el cual contiene un alto contenido de fructosa y debido a que es más económico (19). Este jarabe se obtiene a partir de almidones de maíz, usando un proceso que involucra una hidrólisis del almidón hasta glucosa y su conversión a fructosa mediante una enzima llamada glucosa isomerasa (20). Actualmente casi todos los refrescos, jugos industriales y golosinas usan jarabe de alta fructosa en sus procesos de elaboración. Sin embargo, el uso de éste jarabe tiene el inconveniente de que puede resultar perjudicial para la salud de las personas ya que aparentemente causa obesidad (20,21). Esto ocurre principalmente debido a que la fructosa es una molécula energética que ingresa a las células humanas sin regulación por insulina, lo que hace que los sistemas metabólicos se encuentren activos y junto con una escasa actividad de ejercicio de los individuos se conduce a un almacenamiento de energía en forma de triacilglicéridos y/o lípidos (22). Incluso hay autores que relacionan el consumo de

bebidas y alimentos que contienen fructosa con el incremento de casos de diabetes (23).

Una alternativa para evitar el riesgo innecesario que conduce el consumo de alta fructosa, es volver a introducir azúcar de caña en las bebidas y alimentos, para ello se requiere estrategias que permitan el abaratamiento de la producción de azúcar, así como la disminución de los costos de producción de la caña de azúcar. En este escrito proponemos usar plantas que requieran un bajo nivel de fertilizante nitrogenado con rendimientos elevados de producción.

Caña de azúcar y la fijación biológica de nitrógeno

Recordemos que el nitrógeno combinado se obtiene mediante el proceso de Haber-Bosch, donde se requieren temperaturas muy elevadas; que se alcanzan consumiendo combustibles derivados de petróleo (17), razón por la que solo los países ricos en petróleo pueden disponer de fertilizantes a bajo costo. Brasil por mucho tiempo no tuvo la facilidad de adquirir estos productos (previo al descubrimiento de petróleo en ese país), por lo que tradicionalmente se usaron cantidades de fertilizante muy bajas (60 Kg de N/ha) (24,25), no obstante los rendimientos de caña de azúcar han sido similares a los obtenidos en otros países como México y Estados Unidos donde los cultivos son fertilizados con altas cantidades de nitrógeno (18). Además, en Brasil no se ha detectado disminución de las reservas de nitrógeno del suelo donde se cultiva caña de azúcar a pesar de décadas de cultivo y la cantidad de materia orgánica de sus cultivos se mantiene. Esto fue muy interesante a la vista de investigadores de todo el mundo ya que sugiere fuertemente que el proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) está ocurriendo en las plantas de caña de azúcar cultivadas en Brasil (24,26,27). La FBN es un proceso realizado por bacterias que son capaces de captar el nitrógeno de la atmósfera (N_2) y transformarlo a amonio (NH_4^+) mediante una enzima llamada nitrogenasa (28). Es un proceso natural y las plantas podrían tomar los derivados de amonio para realizar todas sus funciones metabólicas.

Cerca del año 1990 se demostró que la FBN se lleva a cabo en la caña de azúcar cultivada en Brasil y posteriormente también se demostró con cultivos de caña de azúcar en Filipinas y Japón (29–32). En estos trabajos se observó que algunas variedades obtienen hasta el 70% de nitrógeno a través de la FBN pero en otras no se observó contribución alguna mediante este proceso. Desde entonces se desencadenó una fiebre entre la comunidad científica para identificar a la bacteria responsable de llevar a cabo la FBN en asociación con la caña de azúcar (33–36). Sin

embargo, a pesar de que se han aislado muchas bacterias tanto de la rizósfera como endófitas de la caña de azúcar, no se conoce cuál de ellas podría contribuir con la mayor tasa de FBN. La rizósfera se define como la zona del suelo influenciada por los exudados de las raíces de las plantas y endófito se refiere a los microorganismos que viven en el interior de las plantas sin causar daño; principalmente en zonas vasculares, intercelulares y menos frecuentemente de forma intracelular (28). En 1992 Johana Döbereiner sugirió que las bacterias endófitas de la caña de azúcar contribuyen, de manera más significativa que las rizosféricas en el proceso de FBN, ya que este tipo de bacterias podría escapar a los efectos fisicoquímicos adversos del suelo, así como a la competencia con otros microorganismos y podrían recibir de una forma más directa los nutrientes necesarios para su multiplicación y para la expresión de la nitrogenasa para una FBN efectiva (35). En 1988 se dio a conocer una nueva bacteria con la capacidad de fijar nitrógeno y que fue aislada del interior de caña de azúcar (34), esta bacteria es conocida en la actualidad como *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Durante mucho tiempo se pensó que la bacteria *G. diazotrophicus* podría ser una de las especies que más contribuye con la tasa de FBN observada en este cultivo, ya que bajo condiciones *in vitro*, esta bacteria crece y fija nitrógeno de manera óptima en condiciones de acidez y concentraciones de sacarosa similares a las encontradas en el interior de fluidos de la caña de azúcar. Se sugirió también que *G. diazotrophicus* podría promover y aumentar el crecimiento de la caña de azúcar a través de efectos hormonales debido a su capacidad de producir ácido indol acético (IAA) y giberelinas (37,38).

Bacterias benéficas y plantas micropropagadas de caña de azúcar

Usando plantas de caña de azúcar micropropagadas (libres de bacterias), obtenidas mediante técnicas de cultivo de tejidos, ha sido posible comprobar que *G. diazotrophicus* es capaz de colonizar distintos tejidos de esta planta, así como también de estimular su crecimiento, predominantemente a través de mecanismos de tipo hormonal y en dependencia del genotipo bacteriano y la variedad de caña de azúcar (39,40). Aunque el cultivo de tejidos de la caña de azúcar fue propuesto y desarrollado por Heinz y Mee en 1969 con el propósito de preservar el germoplasma (41), en la actualidad la micropropagación vegetativa es una técnica adecuada para la obtención de cientos de plántulas con características idénticas y libres de bacterias (axénicas), que sirven para llevar a cabo experimentos de inoculación bacteriana, evaluar los sitios de colonización y sus efectos sobre la planta ya

sean benéficos o patogénicos (42). A pesar de los esfuerzos realizados, aún no se ha identificado a la bacteria responsable de la mayor tasa de FBN en caña de azúcar, posiblemente los consorcios de bacterias podrían ser los responsables de este fenómeno y no una bacteria sola.

La búsqueda de microorganismos que potencien el crecimiento de las plantas ha sido una tarea que se ha desarrollado desde principios del siglo XIX y que se ha incrementado alrededor de 1970 hasta nuestros días. Algunas bacterias como *Azospirillum brasilense*, *Enterobacter* sp., *Burkholderia unamae*, *Rhizobium* sp., tienen el potencial de promover el crecimiento de plantas (28,43,44). *Azospirillum brasilense* ha sido ampliamente usado como inoculante para incrementar el tamaño de plantas de tipo gramínea como el maíz (45). En caña de azúcar se han usado de forma exitosa especies de bacterias como *Herbaspirillum seropedicae* y *G. diazotrophicus* para incrementar los rendimientos de los cultivos; estas dos bacterias son endófitas de la caña de azúcar (39,46).

Aprovechando las investigaciones de los últimos años se pueden obtener plántulas de caña de azúcar mediante micropropagación de cultivo de tejidos, para inocularlas con bacterias benéficas. Debido a que estas plántulas están libres de bacterias (40), se puede asegurar la colonización y establecimiento de las bacterias inoculadas en la plántula (39,42). La introducción de estas plantas en la agricultura, aseguraría el éxito productivo, abaratando los costos de producción debido al efecto promotor que estas bacterias brindarían a las plantas. Se podrían incorporar diversos tipos de bacterias benéficas, por ejemplo; productoras de sustancias inhibitorias, degradadoras de compuestos tóxicos, solubilizadoras de fosfatos, fijadoras de nitrógeno, o con otro tipo de características obteniendo beneficios adicionales (46). Las bacterias productoras de sustancias inhibitorias pueden eliminar a microorganismos patógenos para plantas evitando que las plantas enfermen (44,47), las plantas pueden mantenerse sanas y en consecuencia la productividad se asegura evitando el uso de fungicidas y antibióticos. Un ejemplo de una bacteria que es productora de sustancias inhibitorias es *Pseudomonas* sp. (figura 1), que inhibe el crecimiento de la bacteria patógena de piña *Pantoea ananatis*. Por otro lado las bacterias degradadoras de compuestos tóxicos podrían disminuir los niveles de herbicidas y pesticidas que han sido usados durante años en la agricultura moderna mediante la remediación desarrollada en la rizósfera de las plantas (rizoremediación), lo que sería bastante deseable para una agricultura sana y cuyos productos no sean causantes de problemas en el humano por la acumulación de los tóxicos (17).

Por ejemplo *Sphingomonas* sp. realiza la rizoremediación de lindano y *Pseudomonas putida* KT2440 tiene el potencial de llevar a cabo la rizoremediación de suelos con naftaleno (48,49). La capacidad de estas bacterias para degradar compuestos tóxicos podría aprovecharse para ser integrada a plántulas propagadas por cultivo de tejidos y usar estas plántulas con propósitos de rizoremediación.



Figura 1. Halo de inhibición causado por *Pseudomonas* sp. (centro de la caja) contra el crecimiento de *Pantoea ananatis* (inicialmente estriada en toda la placa).

Micropropagación de caña de azúcar

Una manera exitosa para micropropagar diferentes variedades de caña de azúcar. Ejemplos de variedades micropropagadas mediante esta metodología son las siguientes: MY 5514 (MY=Mayari-Cuba), MEX 57473 (MEX=México), MEX 69290, CP 72-2086 (CP=Canal Point-Florida EUA), SP 701141 (SP=Sao Paulo-Brasil) y ZMEX 5532 (Tabla 1) (39). Las variedades de caña de azúcar micropropagadas, corresponden a variedades de sitios geográficos distintos, obtenidas en años diferentes y con características fenotípicas distintas. Esto sugiere que la metodología de micropropagación propuesta podría funcionar con cualquier variedad de caña de azúcar.

Tabla 1. Tiempo aproximado de obtención de callos de diferentes variedades de caña de azúcar, usando 15 mg de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Variedad de caña de azúcar	Aparición de callos (días)							
	5	10	15	20	25	30	35	40
MY 5514	-	-	+	+	++	+++	+++	+++
MEX57473	-	-	+	+	++	+++	+++	+++
MEX 69290	-	-	-	+	++	+++	+++	+++
CP 72-2086	-	-	-	-	+	+	++	+++
SP 70 1141	-	-	-	-	+	+	++	+++
ZMEX 5532	-	-	+	+	++	+++	+++	+++

+ Significa la aparición de callos y ++ ó +++ el nivel de propagación.

Obtención del meristemo apical

El meristemo apical de la caña de azúcar contiene la célula germinal; cuya característica principal es que tiene la capacidad de reproducirse y diferenciarse a células especializadas para la generación de una plántula (41). Para obtener el meristemo apical se prefieren plantas de entre 5-8 meses de edad. Los tallos deben ser cortados y deshojados parcialmente, dejando los entrenudos superiores sin deshojar con un extremo de punta (hoja). Estos tallos que contienen el meristemo apical deben etiquetarse para no confundirlos y transportarlos, con agua en la base de los tallos, hasta el laboratorio. Una vez en el laboratorio, los tallos deben ser nuevamente deshojados y cortados en ambos extremos hasta obtener un tallo con hoja de aproximadamente 20 cm de longitud (Fig. 2A). Estos pequeños tallos podrán colocarse en botellas Pyrex de 1 L de capacidad, y se lavarán durante 60 segundos con una solución de etanol al 70% con dos gotas de tween 20, para la desinfección del material (Fig. 2B). Posteriormente la solución deberá decantarse y a los tallos contenidos en el frasco se le aplicarán dos lavados extra con agua destilada estéril (Fig. 2C). A continuación los tallos serán sometidos a esterilización química, llenando la botella con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % y agitando suavemente durante 20 minutos (Fig. 2D). El hipoclorito de sodio será decantado y el exceso deberá ser enjuagado, realizando 5 lavados de 5 minutos cada uno, con agua destilada estéril, bajo condiciones de flujo laminar (área estéril). Los tallos esterilizados serán manipulados con pinzas y material estéril en el resto del desarrollo del explante. Cuidando la orientación de los tallos, estos deben deshojarse con mucho cuidado usando bisturís estériles (Fig. 2E). Cada vez el tamaño de los esquejes se irá haciendo más pequeño, simulando a una pirámide (Fig. 2F y 2G). Una vez que se haya observado la ubicación del meristemo apical (cúspide de la pirámide), se procederá a cortar en finas rodajas al delgado tallo (Fig. 2H), dentro de una solución de citrato de sodio al 1%. El citrato de sodio impide el proceso de oxidación el cual es una limitante en el proceso de la obtención de un explante. Debe de tenerse mucho cuidado en el manejo de las rodajas, ya que es muy importante no perder la dirección correcta de éstas, pues células colocadas en dirección incorrecta no generarán callo. Una vez obtenidas las rodajas, estas deben colocarse sobre medios de cultivo “Murashigue and Skoog” (MS) (50), suplementado con 10% de agua de coco, conteniendo además 2 hormonas: 1 mg de cinetina y 15 mg de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 D) (dosis alta de esta hormona) (Fig. 2I, 2J y 2K) (39). Nota: a) Si la

dirección de la rodaja fue perdida, entonces ésta se colocará perpendicularmente al medio. b) El tiempo que transcurre desde que el tallo es esterilizado y enjuagado hasta que se colocan las rodajas en el medio MS, no debe superar los 15 minutos. Tiempos superiores pueden disminuir la eficiencia de la obtención de callos.

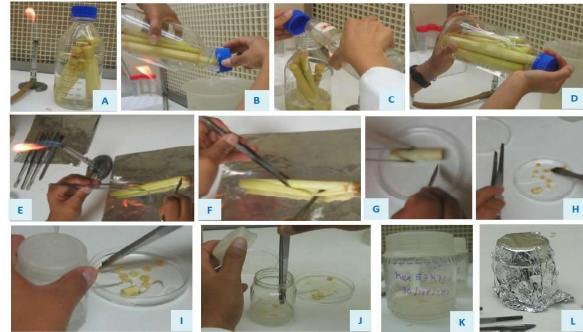


Figura 2. Pasos fundamentales realizados para obtener el meristemo apical de la caña de azúcar.

Obtención de callos

Los frascos conteniendo los explantes realizados deben cubrirse con papel aluminio para evitar el paso de luz; ya que genera oxidación en las células (Fig. 2L) y posteriormente se deben colocar en una cámara de incubación que oscilaba entre 25-28°C. Los explantes colocados en MS-hormona (15 mg de 2,4-D) deben dejarse en oscuridad durante 5 días y después deben ser pasados a medios MS sin hormonas hasta la aparición de callos. Es importante resaltar que los explantes sufren un efecto de oxidación generado posiblemente por la presencia del exceso de hormona. Los explantes deben dejarse en oscuridad hasta la aparición de los primeros callos.

Mediante metodologías donde solo se usan 3 mg de 2,4-D en los medios de cultivo de tejido, los callos de algunas variedades de caña de azúcar se obtienen en un tiempo de aproximadamente 30 días, no obstante, algunas variedades como la MY 5514, CP 72-2086 y la SP 70 1141 sufren oxidación en el transcurso de los días y no es posible obtener callo. Sin embargo, cuando se usa una dosis elevada de 2,4-D (15 mg), se observa que a los 5 días todos los explantes muestran la aparición de zonas cafés (inicio de oxidación); pero cuando los explantes son transvasados a medios sin hormona las zonas cafés retornaron a un color “beige” y comienzan a generar callo entre los 10 a 20 días posteriores dependiendo de la variedad de caña de azúcar, ganando tiempo en la obtención de plántulas (Tabla 1). Usando una dosis tóxica de 2,4D y transvasando el explante a frascos sin hormona, es posible obtener callo de diversas variedades de caña de azúcar (Figura 3).



Figura 3. Callos de caña de azúcar obtenidos por micropropagación de cultivo de tejidos. A) Callos en oscuridad, B) Callos expuestos a la luz.

Diferenciación a plántulas

Los frascos con callos deben transferirse a cámaras con un fotoperiodo de luz/oscuridad 16/8, provisto por una lámpara fluorescente fría ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), entre $25\text{-}28^\circ\text{C}$, donde comienzan a pigmentarse de verde (Fig. 3B). En esta etapa las células sufren diferenciación a plántulas, observando la aparición de puntos verdes en los callos de los cuales derivarán cientos de plántulas. Los brotes verdes deben ser transferidos a medios MS nuevos sin hormonas (Fig. 4A y B) e incubarse bajo las mismas condiciones de fotoperiodo y temperatura.

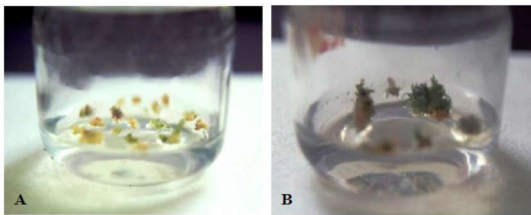


Figura 4. Diferenciación de callos a plántulas (A) y trasplante a medios nuevos donde las plántulas comienzan a desarrollarse (B).

Individualización

La diferenciación a plántulas desde que los callos son expuestos a la luz hasta la obtención de una planta individualizada ocurre en un periodo aproximado de 90 días. La aparición de zonas verdes en los callos ocurre desde los 5 días posteriores a la exposición de la luz. Estas zonas se incrementan con el tiempo (Figura 4A). Cada punto verde se diferenciará hasta formar plántulas pequeñas (Fig. 4B) que crecerán en forma de macollos (Fig. 5A). Estos macollos deben ser periódicamente limpiados de las zonas de oxidación (zonas negras), bajo condiciones de esterilidad, y divididos en macollos más pequeños (Fig. 5B).

Las plantas diferenciadas, una vez que han enraizado, deben ser separadas bajo condiciones de esterilidad y trasplantadas en tubos de 2.5 de ancho X 20 cm de largo tipo Pyrex, conteniendo 10 ml de medio MS sin hormonas. Cabe señalar que los tubos deben taparse con algodón estéril, ya que éste permite el paso constante de aire pero mantiene la esterilidad; lo cual permite una mejor adaptación de las plantas cuando

son transferidas a macetas a condiciones de invernadero. Las plántulas se dejan crecer bajo las condiciones previamente descritas hasta que alcanzan el borde superior del tubo (40 días aproximadamente).



Figura 5. A) Macollo de plántulas diferenciadas a partir de callos después de 70 días de exposición a la luz. B) Macollo dividido a partir de otro como en A y después de eliminar las zonas de oxidación. C y D) Plántulas individualizadas a partir de macollo (B) 90 días después de la exposición a la luz.

Las plántulas obtenidas son clasificadas de acuerdo al tamaño, para homogenizar los experimentos posteriores. Las plántulas son finalmente individualizadas en tubos independientes en donde se crecen hasta alcanzar el tamaño adecuado (Figs. 5C y 5D) para llevar a cabo la inoculación con bacterias benéficas.

Evaluación de contaminación de callos y plántulas

La contaminación en callos y en plántulas de caña de azúcar es visible de forma macroscópica, por ejemplo algunos callos contaminados con hongos cambian inmediatamente su color “beige” a color negro, además los hongos terminan invadiendo y creciendo por encima de los callos. En el caso de contaminación por bacterias, estas crecen como colonias sobre el medio MS; en la periferia de los callos o las plántulas. Sin embargo, se ha cuestionado si los callos y plántulas donde no se percibe contaminación a la vista humana, podrían contener bacterias en estado de dormancia y que posteriormente pueden regresar de un estado “viable no cultivable” a un estado cultivable. Para evaluar la presencia de

contaminación en callos y plántulas, se toman muestras al azar de callos ó plántulas, que son maceradas en morteros estériles (dilución 1:10 peso/volumen) y se cultivan sobre diferentes medios. Se sugiere usar tanto medios mínimos como ricos, por ejemplo se podrían usar: medio MM9-glucosa, Rojo Congo, MacConkey, LB (Luria Bertani), PY, LGI y MESMA. Los callos y los lotes de plántulas que resulten con crecimiento positivo de bacterias u hongos deben ser descartados, para evitar que las plántulas enfermen y para contar con plántulas axénicas en caso de requerirlas para experimentos de inoculación (51).

Inoculación de plántulas

Una vez que se cuenta con plántulas individualizadas, estas pueden ser inoculadas con bacterias benéficas de interés o bien directamente pasar a la etapa de adaptación; en caso de solo querer propagarlas.

Para el caso de inoculación con bacterias benéficas, se deben elegir plántulas individualizadas de tamaño similar para evaluar la colonización de éstas, su potencial promotor de crecimiento o bien el impacto en la bioremediación de bacterias acopladas a las plantas (39). Las plantas micropropagadas, listas para llevar a cabo la inoculación, son obtenidas en un periodo de 4 meses desde el explante. Un ejemplo de cómo se puede realizar la inoculación de bacterias en plántulas se da a continuación.

La inoculación de *G. diazotrophicus* en caña de azúcar se realiza colocando la raíz de las plántulas micropropagadas en una suspensión bacteriana durante una hora (Fig. 6A y 6B) (51), posteriormente estas deben colocarse en macetas que contienen vermiculita estéril, se riegan con una solución que contiene las sales necesarias y una proporción basal de nitrato de amonio (10 mg). Las plantas posteriormente se colocan bajo condiciones de invernadero (Fig. 6C y 6D). En el invernadero las plantas son regadas con agua estéril de forma periódica y se evalúan los parámetros experimentales que se requieran, en los tiempos requeridos en días posteriores a la inoculación (dpi). En la actualidad se conocen bacterias que promueven el crecimiento de la caña de azúcar y estas pueden ser usadas para incrementar los rendimientos (26,39,40), por esta razón las plántulas inoculadas con bacterias benéficas podrían ser utilizadas para sembrarlas en campo después del periodo de adaptación (15 días en maceta) con el fin de incrementar los rendimientos de los cultivos (46).

En nuestra experiencia las plántulas de caña de azúcar pueden ser colonizadas muy bien por bacterias benéficas usando la estrategia de sumergirlas durante una hora en una suspensión bacteriana (1×10^8

Unidades Formadoras de Colonia/ml). Por ejemplo se ha explorado la capacidad de diferentes cepas de *G. diazotrophicus* (PAI 3, PAI 5^T, UAP 5560 y UAP 5541 portando el plásmido pRGS561), para colonizar a las plántulas micropropagadas (39,51,52).

Previo a la maniobra de inoculación debemos preparar la suspensión bacteriana, para lo cual se recomienda que las cepas crezcan en su medio de cultivo hasta la fase estacionaria. En el caso de las cepas de *G. diazotrophicus*, éstas se crecen durante 48 horas en medio líquido MESMA a 30°C y luego se inoculan en medios nuevos y se crecen hasta una densidad óptica 0.8 a 450 nm (10^8 UFC/ml) (52). Las células son centrifugadas y lavadas 2 veces con una solución de MgSO₄ 10 mM. Finalmente las células deben ser resuspendidas en el mismo volumen inicial y la suspensión final puede ser usada para inocular a las plántulas.

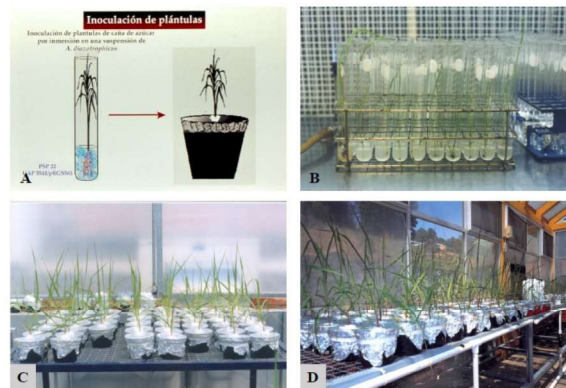


Fig. 6. A) Esquema de inoculación de plántulas de caña de azúcar y trasplante posterior en macetas conteniendo vermiculita estéril. Las plántulas trasplantadas posteriormente deben ser regadas con la solución de MS modificada y un nivel adecuado de nitrógeno. Los experimentos en el invernadero se llevan a cabo bajo condiciones de esterilidad. B) Inoculación de plántulas micropropagadas de caña de azúcar con *G. diazotrophicus*. La raíz fue sumergida durante una hora en una suspensión bacteriana (1×10^8 UFC/ml). Fig. 6C y D. Plantas de 30 dpi (días posteriores a la inoculación) en condiciones de invernadero.

Colonización

La colonización de la bacteria inoculada en la caña de azúcar podría ser evaluada mediante microscopía electrónica (42) y además contabilizando el número de bacterias presentes en rizósfera o como endófitas de raíz y tallo (39). Los resultados reportados a la fecha han sido muy similares por ambas metodologías. Una metodología reciente ha facilitado la cuantificación masiva de bacterias asociadas a las plantas (53).

La colonización de bacterias se ha evaluado entre los 15 y 30 dpi. Este tiempo es suficiente para que la bacteria entre a la planta y se establezca en el interior de la raíz y tallo. El No. UFC/g de planta de *G.*

diazotrophicus que se establece en raíz a los 30 dpi oscila entre 10^4 y 10^5 dependiendo de la variedad de caña de azúcar y el fenotipo de bacteria analizada (39,53).

Discusión

Diferentes han sido las metodologías desarrolladas para micropropagar a la caña de azúcar (39–41,46). En general ha sido observado que dependiendo de la variedad de caña de azúcar se requiere de cierta concentración de hormonas (Cinetina y 2,4-D) para conseguir la obtención de callos (54). Sin embargo, si se usa una dosis elevada de 2,4-D (15 mg), se presupone que los explantes tomarán la proporción de hormona suficiente para su desarrollo y cuando son transferidas a un medio MS sin hormona, la cantidad de hormona tomada será suficiente para inducir la formación de callo; lo cual ocurre en las distintas variedades de caña de azúcar. La diferenciación a plántulas mediante la intoxicación con 2,4-D es muy similar en todas las variedades (alrededor de 90 días) y no es una limitante en la micropropagación de la caña de azúcar.

En acuerdo con Heinz y Mee (41) mediante micropropagación vegetativa se obtienen cientos de plántulas de tamaño uniforme, que podrían usarse para una gran diversidad de experimentos u objetivos. Por ejemplo, ha sido demostrado que la propagación vegetativa tiene beneficios grandes para obtener líneas estables de plantas altamente heterocigóticas (55,56), así como los genotipos de papaya donde la forma tradicional de propagación ha fallado para producirlas. La micropropagación ha sido usada también para la multiplicación rápida durante la liberación de una nueva variedad antes de su propagación por métodos convencionales, por ejemplo, con la piña y la fresa (57,58). La micropropagación provee un medio de almacenaje de germoplasma para mantener un stock libre de enfermedades, en condiciones de medioambiente controladas (59,60) y a largo plazo por medio de la cryo-preservación a temperaturas bajas (-70°C). Además, las plantas micropropagadas también pueden usarse para evaluar la colonización de bacterias y la localización de bacterias endófitas, así como los efectos de inoculación bacteriana. Por ejemplo la colonización de *G. diazotrophicus* en la caña de azúcar se demostró con el uso de plantas axénicas obtenidas por micropropagación vegetativa, cuando éstas se sumergen durante una hora en una suspensión bacteriana. Además, *G. diazotrophicus* es capaz de establecerse en el interior de la planta en números similares a los reportados en plantas de caña de azúcar cultivadas en campo. Por otro lado, los callos generados en la micropropagación pueden ser usados para la transformación de células con ADN de

interés (61). Algunas ventajas adicionales de contar con plantas micropropagadas de caña de azúcar son: A) se cuenta con una proporción suficiente de caña destinada como semilla, cuando el área destinada para la producción del cultivo de caña de azúcar es grande y la densidad de plantas de la variedad que se desea sembrar es muy baja. B) La micropropagación de caña de azúcar es mucho más rápida que la propagación natural, así que un cultivar nuevo se puede diseminar rápidamente (62). C) Se eliminan patógenos que normalmente se transmiten vía esqueje (63).

Aun cuando ha sido planteado que podría generarse variación somaclonal en plantas derivadas de cultivo de tejido (61), los resultados de colonización de *G. diazotrophicus* observados, en plantas obtenidas por micropropagación son muy uniformes en cada variedad, mostrando que las plantas tienen características muy similares dentro de la misma variedad de caña de azúcar y que sus características principales para realizar una interacción con bacterias benéficas son mantenidas (39,51). Las plántulas de caña de azúcar micropropagadas por cultivo de tejidos pueden usarse para buscar a la mejor bacteria benéfica o grupos de bacterias benéficas (fijadoras de nitrógeno, estimuladoras de crecimiento, productoras de sustancias antagonistas de patógenos y bacterias bioremediadoras) que se asocian con las plantas. Con esas mejores asociaciones se podría aumentar la productividad de la caña de azúcar y se pueden disminuir los costos de producción beneficiando a la industria azucarera y a la producción de biocombustible (etanol); lo cual a su vez podría tener un impacto positivo en el medioambiente, debido a que éste tipo de combustibles no contaminan el medio ambiente y porque algunas bacterias podrían degradar los compuestos tóxicos usados en agricultura. Otros esfuerzos también se están realizando para disminuir los costos de producción de la caña de azúcar, por ejemplo, se están investigando el mecanismo de acumulación de sacarosa de éste tipo de plantas, para en un futuro poder contar con linajes de caña de azúcar que acumulen una mayor proporción de sacarosa y con mayor rentabilidad (64). La parte más costosa de la micropropagación de caña de azúcar es la división y trasplante de las plántulas. Sin embargo, Okamoto y col., (65) diseñaron un sistema robotizado para la automatización de la división y el trasplante de plántulas de caña de azúcar micropropagadas. La automatización de la micropropagación de la caña de azúcar, desencadenará sin duda una disminución en los costos de producción de éste tipo de material biológico (66).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En general ha sido observado que dependiendo de la variedad de caña de azúcar se requiere de cierta concentración de hormonas (Cinetina y 2,4-D) para conseguir la obtención de callos. Sin embargo, con base a nuestra experiencia, cuando se usan 15 mg de 2,4-D, aparentemente los explantes toman la proporción de hormona suficiente para su desarrollo y cuando se transfirieren a un medio MS libre de hormonas, la cantidad previa adquirida por el tejido fue adecuada para inducir la formación de callo en todas las variedades de caña de azúcar exploradas.

La diferenciación a plántulas fue muy similar en todas las variedades (alrededor de 90 días) y no fue una limitante en la micropropagación de la caña de azúcar. Cientos de plántulas de tamaño uniforme son obtenidas, que podrían usarse para una gran diversidad de experimentos u objetivos. Una de las aplicaciones poco exploradas es la incorporación de bacterias benéficas a las plántulas micropropagadas para asegurar su éxito en el campo. Las plantas micropropagadas también pueden usarse para evaluar la colonización de bacterias y la localización de bacterias endófitas, así como los efectos de inoculación bacteriana. Por ejemplo, *G. diazotrophicus* es capaz de colonizar a las plántulas de caña de azúcar micropropagadas, cuando éstas se sumergen durante una hora en una suspensión bacteriana. Las plántulas de caña de azúcar micropropagadas por cultivo de tejidos podrían usarse para buscar a la mejor bacteria benéfica o grupos de bacterias benéficas (fijadoras de nitrógeno, estimuladoras de crecimiento, productoras de sustancias antagonistas de patógenos) que se asocian con las plantas. Con esas mejores asociaciones se podría aumentar la productividad de la caña de azúcar y se pueden disminuir los costos de producción beneficiando a la industria azucarera y a la producción de biocombustible (etanol); lo cual a su vez podría tener un impacto positivo en el medioambiente, debido a que éste tipo de combustibles no contaminan el medio ambiente.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores no tienen ningún conflicto de interés.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrados por el apoyo que otorgan para desarrollar la investigación del grupo Supervivencia de Microorganismos del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana (Proyectos 598, XXX y XXX). América Paulina Rivera Urbalejo es becaria Posdoctoral PRODEP-SEP, Osvaldo Rodríguez Andrade es becario CONACYT y Verónica Quintero-

Hernández es Investigadora Cátedras CONACYT, por lo que agradecemos el apoyo de dichas instituciones.

REFERENCIAS

1. Senties-Herrera, HE, Gómez-Merino, FC, Loyo-Joachin R. El mejoramiento genético de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en México: una historia de éxito con nuevos desafíos. *Agroproductividad*. 2016;9(7):10–5.
2. Pereira LG, Dias MOS, Junqueira TL, Pavanello LG, Chagas MF, Cavalett O, et al. Butanol production in a sugarcane biorefinery using ethanol as feedstock. Part II: Integration to a second generation sugarcane distillery. *Chem Eng Res Des*. 2014;92(8):1452–62.
3. Kim M, Day DF. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011;38(7):803–7.
4. Boddey RM, Soares LHDB, Alves BJR, Urquiaga S. Bio-ethanol production in Brazil. In: *Biofuels, Solar and Wind as Renewable Energy Systems: Benefits and Risks*. 2008. p. 321–56.
5. Almazan O, Gonzalez L, Galvez L. The sugar cane, its by-products and co-products. *Proceedings of the Third Annual Meeting of Agricultural Scientists, Réduit, Mauritius, 17-18 November 1998*. Réduit: Food and Agricultural Research Council; 1999. p. xiii–xxv.
6. Sindhu R, Gnansounou E, Binod P, Pandey A. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products - An overview. *Renew Energy*. 2016;98:203–15.
7. Vergara R, Ángel M, Carreño D. El mercado del azúcar en México. *Rev Trimest Análisis Coyunt Económica*. 2010;3(1):17–9.
8. Glaz B, Edme SJ, Miller JD, Milligan SB, Holder DG. Sugarcane cultivar response to high summer water tables in the everglades. *Agron J* [Internet]. 2002;94(3):624–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.2134/agronj2002.6240>
9. Inman-Bamber NG. Temperature and seasonal effects on canopy development and light interception of sugarcane. *F Crop Res* [Internet]. 1994;36(1):41–51. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378429094900515>
10. Keating BA, Robertson MJ, Muchow RC, Huth NI. Modelling sugarcane production systems I.

- Development and performance of the sugarcane module. *F Crop Res.* 1999;61(3):253–71.
11. Ebrahim MK, Zingsheim O, El-Shourbagy MN, Moore PH, Komor E. Growth and sugar storage in sugarcane grown at temperatures below and above optimum. *J Plant Physiol* [Internet]. 1998;153(5–6):593–602. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161798802095>
 12. Menezes de Souza Z, Marques Junior J, Tadeu Pereira G, Mazza Barbieri D. Small relief shape variations influence spatial variability of soil chemical parameters. *Sci Agric.* 2006;63(2):161–8.
 13. Salgado García S, Núñez Escobar R, Bucio Alanis L. Determinación de la dosis óptima económica de la fertilización en la caña de azúcar. *Terra Latinoam.* 1982;21(2):267–72.
 14. Wagner de Oliveira M, Trivelin PCO, Boaretto AE, Muraoka T, Mortatti J. Leaching of nitrogen, potassium, calcium and magnesium in a sandy soil cultivated with sugarcane. *Pesqui Agropecu Bras.* 2002;37(6):861–8.
 15. Dominy C, Haynes R, van Antwerpen R. Loss of soil organic matter and related soil properties under long-term sugarcane production on two contrasting soils. *Biol Fertil Soils* [Internet]. 2002;36(5):350–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-002-0538-5>
 16. Sparovek G, Schnug E. Temporal erosion-induced soil degradation and yield loss. *Soil Sci Soc Am J* [Internet]. 2001;65(5):1479–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.2136/sssaj2001.6551479x>
 17. 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.
 18. Caballero-Mellado J, Fuentes-Ramirez LE, Reis VM, Martínez-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> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1388556>
 19. Vuilleumier S. Worldwide production of high-fructose syrup and crystalline fructose. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1993 Nov 1;58(5):733S–736S. Available from: <http://ajcn.nutrition.org/content/58/5/733S.abstract>
 20. Parker K, Salas M, Nwosu VC. High fructose corn syrup: Production, uses and public health concerns. *Biotechnol Mol Biol Rev* [Internet]. 2010;5(5):71–8. Available from: <http://www.academicjournals.org/journal/BMBR/article-abstract/41CAC0411547>
 21. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:537–43.
 22. Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM, Hoebel BG. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2010;97(1):101–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2010.02.012>
 23. Welsh JA, Dietz W. Sugar-sweetened beverage consumption is associated with weight gain and incidence of type 2 diabetes. *Clin Diabetes.* 2005;23(4):150–2.
 24. Baldani JJ, 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>
 25. Boddey R. “Green” energy from sugar cane. *Chem Ind.* 1993;(No. 10):355–8.
 26. Baldani J, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR, Döbereiner J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol Biochem* [Internet]. 1997;29(5):911–22. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S038071796002180>
 27. Boddey RM, de Oliveira OC, Urquiaga S, Reis VM, de Olivares FL, Baldani VLD, et al. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. Laha JK, Peoples MB, editors. *Plant Soil* [Internet]. 1995;174(1–2):195–209. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-94-011-0053-3_9
 28. 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
 29. Lima E, Boddey RM, Döbereiner J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ¹⁵N aided nitrogen balance. *Soil Biol Biochem* [Internet].

- 1987;19(2):165–70. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0038071787900770>
30. Urquiaga S, Cruz KHS, Boddey RM. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Sci Soc Am J* [Internet]. 1992;56(1):105–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.2136/sssaj1992.0361599500560010017x>
31. 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>
32. Yoneyama T, Muraoka T, Kim TH, Dacanay E V, Nakanishi Y. The natural ^{15}N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). *Plant Soil* [Internet]. 1997;189(2):239–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1004288008199>
33. Asis CAJ, Kubota M, Chebotar VK, Ohta H, Arima Y, Nishiyama K, et al. Endophytic bacterial population in Philippine sugarcane cultivars and isolation of nitrogen-fixing strains. *Microbes Environ.* 2000;15(4):209–16.
34. Cavalcante VA, Dobereiner 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>
35. Dobereiner J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. Vol. v. 13, *Symbiosis*. 1992. p. 1–13.
36. Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JJ, Döbereiner J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biol Fertil Soils* [Internet]. 1996;21(3):197–200. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00335935>
37. 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>
38. Fuentes-Ramirez LE, Jimenez-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>
39. 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.
40. Sevilla M, Burris RH, Gunapala N, Kennedy C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and nif^- mutant strains. *Mol Plant-Microbe Interact* [Internet]. 2001;14(3):358–66. Available from: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPML.2001.14.3.358>
41. Heinz DJ, Mee GWP. Plant differentiation from callus tissue of *Saccharum* Species. *Crop Sci* [Internet]. 1969;9(3):346–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1969.0011183X000900030030x>
42. James EK, Olivares FL, de Oliveira a L, dos Reis FB, da Silva LG, Reis VM. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J Exp Bot.* 2001;52(357):747–60.
43. Morales YE, Juárez D, Aragón C, Mascarua MA, Bustillos MR, Fuentes LE, et al. Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Rev Argent Microbiol.* 2011;43:287–93.
44. 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.
45. Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, et al. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Funct Plant Biol* [Internet]. 2001 Sep 26;28(9):871–9. Available from: <https://doi.org/10.1071/PP01074>
46. de Oliveira ALM, de Canuto EL, Urquiaga S, Reis VM, Baldani JJ. 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>

47. Matilla MA, Krell T. Bacterias rizosféricas como fuente de antibióticos. *Alianzas y Tendencias*. 2017;2(1):14–21.
48. Böltner D, Godoy P, Muñoz-Rojas J, Duque E, Moreno-Morillas S, Sánchez L, et al. Rhizoremediation of lindane by root-colonizing *Sphingomonas*. *Microb Biotechnol*. 2008;1(1):87–93.
49. Fernández M, Niqui-Arroyo JL, Conde S, Ramos JL, Duque E. Enhanced tolerance to naphthalene and enhanced rhizoremediation performance for *Pseudomonas putida* KT2440 via the NAH7 catabolic plasmid. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(15):5104–10.
50. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* [Internet]. 1962;15(3):473–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
51. 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>
52. Muñoz-Rojas J, Fuentes-Ramírez LE, Caballero-Mellado J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Microbiol Ecol*. 2005 Sep 1;54(1):57–66.
53. Morales-García YE, Corral-Lugo A, Pazos-Rojas LA, Martínez-Contreras RD, Muñoz-Rojas J, Ramírez-Valverde A. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo” [Internet]. Vol. 14, *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2012. p. 147–56. Available from: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/37416/40417>
54. Lozano-Rojas A. Micropropagación de cuatro variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) efecto de la refrigeración sobre callos. Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 1985.
55. Drew RA. Rapid clonal propagation of papaya in vitro from mature field-grown trees. *HortScience* (USA). 1988;23(3):609–11.
56. Drew R. Improved techniques for in vitro propagation and germplasm storage of papaya. *Hortscience*. 1992;27(10):1122–4.
57. Damiano C, Faedi W, Cobianchi D. Nursery runner plant production, fruiting and behaviour of micropropagated strawberry plants [Internet]. *Acta Horticulturae* (Netherlands). ISHS; 1983. Available from: http://www.actahort.org/books/131/131_21.htm
58. Drew RA. Pineapple tissue culture unequalled for rapid multiplication. *Queensl Agric J*. 1980;106(5):447–51.
59. Withers LA, Brown AHD (ed.), Frankel OH (ed.), Marshall DR (ed.), Williams JT (ed.). *In vitro* conservation and germplasm utilisation. Cambridge (UK) Cambridge Univ. Press; 1989.
60. Wilkins CP, Dodds JH. The application of tissue culture techniques to plant genetic conservation. *Sci Prog* (1933-) [Internet]. 1983;68(270):259–84. Available from: <http://www.jstor.org/stable/43420565>
61. Drew RA. Application of biotechnology to fruit and nut species. In: *Sixth Conf Aust Counc on tree and nut crops*, Inc Lismore, NSW,(Sept 11-15, 1995), Australia. 1995.
62. Taba Y, Miyama Y, Ikeda K, Kamezawa N, Sawada K. Production of sugarcane mericlone plants. In: *Proceedings of the Research Society of Japan Sugar Refineries Technologists*. 1998. p. 29–34.
63. Hoy JW, Bischoff KP, Milligan SB, Gravois KA. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. *Euphytica* [Internet]. 2003;129(2):237–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1021928823445>
64. Gutierrez MFA, Arias CC, Dendooven L, Mendez SR, Rodríguez MMA, Ochoa AN, et al. Enzymatic regulation in the saccharose accumulation in sugarcane (*Saccharum* spp.) plants. *Agrociencia*. 2002;36:411–9.
65. Okamoto T, Zhao CS, Miyama Y, Torii T, Imou K. Robotic sugar cane seedling propagation system in tissue culture. *J Japanese Soc Agric Mach*. 1998;60(6):71–7.
66. Kaizu Y, Tsuguo Okamoto, Imou K. Shape recognition and growth measurement of micropropagated sugarcane shoots. *Agric Eng Int CIGR J*. 2002;IV(October):1–16.