



# ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN *Gluconacetobacter diazotrophicus*-VIANDAS TROPICALES ESTABLECIDAS SOBRE SUELO FERRALÍTICO ROJO. II. DETERMINACIÓN DEL MÉTODO DE INOCULACIÓN MÁS EFICIENTE PARA LA INCORPORACIÓN DE *G. diazotrophicus* EN LOS CULTIVOS DE BONIATO, YUCA Y MALANGA

**Study of *Gluconacetobacter diazotrophicus*-tropical viands association established over Red Ferralitic soil. II. Determination of more effective inoculation method for *Gluconacetobacter diazotrophicus* incorporation to sweet potato, yucca and aurum crops**

**Bernardo Dibut Álvarez<sup>✉</sup>, Yoania Ríos Rocafull y Marisel Ortega García**

**ABSTRACT.** The work shows the inoculation strategy on tropical viands. This aspect except in sweet potato constitutes a first report. For the speciality and since agrobiological point of view it open new roads to commercial inoculants drawing that nowadays does not exist in the merchants for these crops benefice. That is why the scientific, technological and environmental impacts of the investigation. The experiment was made on INIFAT areas over Red Ferralitic soil using a Hazard Blocks Drawing and a block of 50 m<sup>2</sup> with four replicas by treatments. Final concentration of bioproduct was 3.5x10<sup>11</sup> UFCxmL<sup>-1</sup>. It was using by a dose of 0.2 mL/m<sup>2</sup>. The most effective method (foliar and soil inoculation) belong to obtained increases between 3 and 5 t/ha on sweet potato, yucca and aurum. This represents a average economic benefice of 720 MN/ha with roots and tubers of high commercial quality. It was also formulated a new medium (patent object). It was permit bioproduct application on reduce dose by surface unit and reduce fermentation time.

**Key words:** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, tropical viands, inoculation

**RESUMEN.** El trabajo ofrece la estrategia de inoculación de la bacteria en las viandas tropicales, aspecto este que, excepto en boniato, constituye un primer reporte para la especialidad. Desde el punto de vista agrobiológico, abre nuevos caminos al diseño de inoculantes comerciales que hoy no existen en el mercado para el beneficio de estos cultivos, de ahí los impactos científico, tecnológico y medio ambiental de la investigación. Los experimentos se desarrollaron en áreas del INIFAT sobre suelo Ferralítico Rojo, empleando un diseño de Bloques al Azar y un tamaño de parcela de 50 m<sup>2</sup> con cuatro réplicas por tratamiento. La concentración final del bioproducto fue de 3.5x10<sup>11</sup> UFCxmL<sup>-1</sup>. Se aplicó utilizando una dosis de 0.2 mL/m<sup>2</sup>. El método de inoculación más efectivo (aplicación foliar y al suelo) permite obtener incrementos en el rendimiento de entre 3 y 5 t/ha en plantaciones de yuca, boniato y malanga. Ello representa un beneficio económico promedio de 720 pesos por cada hectárea bacterizada, con la presencia de raíces y tubérculos de mayor calidad comercial. Se formula además un nuevo medio de cultivo (objeto de patente) que permite que el bioproducto se aplique a una dosis reducida por unidad de superficie y que disminuye el tiempo de fermentación.

**Palabras clave:** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, viandas tropicales, inoculación

Dr.C. Bernardo Dibut Álvarez, Investigador Titular; Yoania Ríos Rocafull, Investigadora Agregada; Marisel Ortega García, Aspirante Investigador, Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), calle 2 esq. a 1, Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba, CP 17200

✉ bdibut@inifat.co.cu

## INTRODUCCIÓN

*Gluconacetobacter diazotrophicus* es una bacteria endófitas descrita por primera vez en 1988 de tallos de caña de azúcar provenientes de Brasil (1). Pertenece al phylum Proteobacteria, sección  $\alpha$ -Proteobacteria, orden

*Rhodospirillales* y familia *Acetobacteraceae* (2). Es uno de los microorganismos endófitos utilizados como modelo para el estudio de interacciones planta no leguminosa-microorganismo (3, 4).

Dentro de su potencial metabólico se describe la posibilidad de fijar nitrógeno proveniente de la atmósfera, de producir fitohormonas como ácido Indol acético (AIA) y ácido giberélico (GA), la solubilización en condiciones *in vitro* de fósforo y zinc (5) y el biocontrol de fitopatógenos como *Colletotrichum falcatum*, *Xanthomonas albilineans* y el nematodo *Meloidogyne incognita* (6, 7). A ello se le une su probada presencia en diferentes cultivos incluyendo café, piña, millo, arroz (8, 9) y hortalizas (10).

El efecto positivo de su inoculación sobre el cultivo de la caña de azúcar, boniato, viandas tropicales (11, 12, 13), abre aún más las perspectivas de su empleo con fines agrícolas. No obstante, existen muchos aspectos que investigar para alcanzar mejores resultados con su inoculación.

Hasta estos momentos en la literatura se plantea que la bacteria se propaga junto al material vegetativo de la planta que coloniza de forma natural (14), aunque se ha sugerido que la dispersión del microorganismo pudiera ser a través de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares de los géneros *Glomus* y *Acaulospora* (15, 16); de hecho se ha demostrado experimentalmente que la introducción de la bacteria en boniato se ve favorecida por la co-inoculación de esporas de estos hongos (17).

A pesar de estos estudios no se han obtenido biopreparados comerciales a base de este microorganismo, por lo que no se describen métodos de inoculación en campo bajo condiciones de extensión agrícola. En el trabajo anterior de la serie se presentan los resultados de los ensayos y pruebas de extensión en relación a la selección de las cepas más eficientes en su efecto agrobiológico sobre estos cultivos, aspecto este muy importante si se tiene en cuenta muchos errores y fracasos en el diseño de inoculantes por falta de un proceso riguroso de selección cepa-cultivo.

En esta investigación se ha estudiado en detalle las dos vías consideradas más factibles para lograr la incorporación del endófito al sistema planta: la inoculación foliar y al suelo, y la inoculación sumergida o imbibición del vegetal en la suspensión bacteriana; igualmente indicadores indispensables en el manejo agronómico del microorganismo.

## MATERIALES Y METODOS

Los ensayos para determinar el método más efectivo de inoculación de la bacteria *G. diazotrophicus* sobre los cultivos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), boniato (*Ipomea batata*) y malanga (*Xanthosomas* spp.) fueron conducidos sobre suelo Ferralítico Rojo (18) (Tabla I) en áreas agrícolas del INIFAT, Santiago de Las Vegas, entre los años 2003-2005.

Se empleó un diseño experimental en bloques al azar con cuatro réplicas y un tamaño de parcela de 50 m<sup>2</sup>. Se incluyeron dos tratamientos: inoculación foliar y al suelo (comprende la aspersión de la bacteria de forma foliar junto a la superficie de suelo que rodea la planta) e inoculación sumergida. Los cultivos fueron atendidos de acuerdo a las normas técnicas establecidas en el instructivo técnico de cada uno de estos (19). Los ensayos en cada cultivo se repitieron dos veces en el tiempo (dos años) en la misma localidad.

El inóculo a partir del endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* se obtuvo sobre crecimiento de la cepa INIFAT Abn-1 en medio SG (14) bajo condiciones de agitador rotatorio regulado a 32°C de temperatura y 180 rpm de agitación, durante 72 horas. La aplicación del biopreparado, con una concentración entre 3.2-3.5x10<sup>11</sup> UFC/mL, se realizó a horas avanzadas de la tarde con ayuda de una mochila fitosanitaria al paso de un hombre a razón de 2 L/ha, dosis recomendada bajo estas condiciones de crecimiento de la bacteria en relación con la población que se alcanza en el sistema suelo-planta al ser aplicada (20).

Los datos experimentales fueron evaluados estadísticamente por prueba de Newman Keuls al 5 % de significación utilizando análisis de varianza para datos paramétricos, previa comprobación de la normalidad de las variables; considerando esta información, se aplicó una transformación raíz cuadrada de log x. El procesamiento de toda la información se realizó mediante el programa STAT. ICTF 4.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los tres clones de yuca estudiados, los indicadores relacionados con el rendimiento, como altura de la planta y el número y diámetro de los tubérculos por planta, se favorecen con la aplicación de la bacteria por aspersión, por lo que podemos afirmar que la inoculación en conjunto foliar y al suelo supera a la variante de imbibición de los cangres (fracción de semilla agámica), con la obtención de entre 3-5 t/ha adicionales (Tabla II).

**Tabla I. Características químicas del suelo utilizado en los ensayos**

Tipo de suelo	MO (%)	N total (ppm)	pH (H <sub>2</sub> O)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)	K <sub>2</sub> O	Ca (cmol <sup>+</sup> .kg <sup>-1</sup> )	Mg
Ferralítico Rojo	3.25	59	7.3	51	64	9.1	3.7

**Tabla II. Efecto de los métodos de inoculación de *G.diazotrophicus* sobre tres clones de yuca sembrados sobre suelo Ferralítico Rojo (Santiago de las Vegas, 2003-2004)**

Clones	Método de inoculación	Rendimiento (t/ha)		Largo de la planta (m)		Número de tubérculos por planta		Diámetro de tubérculo/planta (mm)		Por ciento de raíces no comerciales		Producción no comercial (t/ha)	
		I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
INIFAT-2	Testigo	30.50	c	2.40	c	8.53	c	40.82	c	35.27	a	3.45	a
	I. sumergida	33.25	b	2.46	b	8.98	b	42.25	b	20.90	b	2.20	b
	I. foliar+suelo	36.00	a	2.55	a	9.42	a	48.60	a	11.20	c	1.70	c
CMC-40	Testigo	43.25	c	2.61	c	6.18	c	63.20	c	20.42	a	2.15	a
	I. sumergida	45.50	b	2.66	b	6.91	b	69.80	b	15.10	b	1.73	b
	I. foliar + suelo	51.83	a	2.73	a	8.85	a	74.63	a	8.68	c	0.90	c
CEMSA-725	Testigo	26.50	c	1.66	c	5.12	c	45.82	c	34.80	a	2.30	a
	I. sumergida	32.06	b	1.69	b	6.90	b	49.50	b	20.38	b	1.80	b
	I. foliar + suelo	40.78	a	1.77	a	9.10	a	52.83	a	12.87	c	1.20	c
Es x		1.35		0.04		0.37		1.84		1.55		0.12	
CV (%)		3.60		1.9		4.8		3.4		7.8		12.4	

Medias con letras no comunes difieren significativamente entre si por prueba de Anova y Test de Newman Keuls con  $p < 5\%$

La cantidad de raíces no comerciales, y como consecuencia la producción no comercializable en cada clon, se ve altamente favorecida por la actividad del microorganismo; resultando nuevamente, para este indicador, la aplicación foliar y al suelo el método más efectivo en relación con la economía del cultivo, por lo que se debe tener en cuenta este aspecto, tanto para el consumo como para la industria. En trabajos realizados sobre la asociación *G. diazotrophicus-Manihot esculenta*, Crantz igualmente se muestran incrementos en los indicadores de crecimiento, desarrollo y rendimientos evaluados (14), aunque en este estudio no se valoran diferentes métodos de incorporación de la bacteria, por lo que no se pueden hacer comparaciones más precisas sobre el comportamiento detectado.

En otro ensayo realizado solamente con el empleo del clon CMC-40 durante dos campañas (Tabla III), se ratifican los resultados. Todos los indicadores evaluados fueron mayormente favorecidos con la inoculación foliar, aunque la inoculación sumergida también supera al testigo sin inocular con aumentos entre 4-22 %, dejando claro que resulta un método mucho más engorroso al aplicar grandes extensiones.

Una observación de interés que se pudo constatar en todos los ensayos efectuados fue el cierre de las plantaciones en un tiempo menor cuando se bacterizaron las plantas, el que podemos enmarcar entre cuatro-seis días antes (al cierre) en comparación con las parcelas testigos. No se detectaron grandes diferencias entre ambos métodos de aplicación del microorganismo, aunque estuvo favorecida la inoculación foliar y al suelo. Resulta muy ventajoso este comportamiento ya que en etapas iniciales del desarrollo de las plantaciones se realizan varias limpiezas, en la mayoría de los casos de forma manual.

En un inicio se llegó a considerar que el imbibir el cangre de yuca en la solución del biopreparado era más favorable para la penetración de la bacteria por la flagelación que caracteriza al microorganismo, siendo esta la vía para que penetrara a los vasos xilemáticos. Al parecer se necesita de otra vía de penetración extra para lograr movilizar al microorganismo hacia el interior de la semilla. En este sentido, se podría estudiar el efecto de una baja presión de vacío con ayuda de un sistema diseñado para tales fines.

**Tabla III. Efecto del método de inoculación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre el cultivo de la yuca, clon CMC-40. Campañas 2003-2004 (I) y 2004-2005 (II)**

Método de inoculación	Rendimiento (t/ha)		Largo de la planta (cm)		Número de tubérculos por plantas		Diámetro de tubérculos por planta (mm)		Por ciento de raíces no comerciales		Producción no comercial (t/ha)	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
	Testigo	41.10c	42.23 c	2.16 c	2.37 c	5.94 c	6.09 c	62.18 c	67.09 c	21.30a	19.1 a	2.43 a
Inoculación sumergida	43.25 b	44.19 b	2.59 b	2.80 b	6.83 b	7.14 b	70.15 b	71.58 b	16.65 b	17.3 b	1.58 b	1.67 b
Inoculación foliar + suelo	50.29 a	51.34 a	2.74 a	2.97a	9.01 a	10.24 a	75.23 a	76.00 a	7.41 c	7.60 c	0.76 c	0.82c
Esx	0.92	1.10	0.10	0.09	0.26	0.30	0.50	0.42	1.03	0.75	0.34	0.49
CV %	9.23	11.21	2.15	2.33	4.60	5.19	2.83	3.09	8.21	7.34	9.55	7.63

Medias con letras no comunes difieren significativamente entre si por prueba de Anova y Test de Newman Keuls con  $p < 5\%$

Esta variante constituye objeto de futuras investigaciones no solo para esta especie, sino para el resto de las viandas, ya que las semillas agámicas del boniato (esquejes) y de malanga (secciones del tubérculo), también pueden tratarse con un sistema como el antes mencionado, y así poder comercializar la semilla ya inoculada.

En el cultivo del boniato la inoculación foliar superó en 2 t/ha a la inoculación sumergida (Tabla IV), por lo que se pone de manifiesto la misma tendencia mostrada en el cultivo de la yuca.

**Tabla IV. Respuesta del boniato (clon INIVIT B-88) a diferentes métodos de inoculación de la bacteria. Años 2003 (I) y 2004 (II)**

Año	Tratamiento	Rendimiento (t/ha)
I	Testigo	34.19 c
	Inoculación sumergida	38.06 b
	Inoculación foliar + suelo	40.21 a
	Esx	0.98
	CV (%)	11.04
II	Testigo	31.97 c
	Inoculación sumergida	36.29 b
	Inoculación foliar + suelo	42.50 a
	Esx	1.13
	CV (%)	9.70

Medias con letras no comunes difieren significativamente entre sí por prueba de Anova y Test de Newman Keuls con  $p < 5\%$

Esta especie vegetal, a diferencia de la yuca y la malanga, ha sido estudiada por otros autores. En estos reportes se plantea que la bacteria es aplicada solamente sobre el suelo que rodea a la planta para así facilitar su penetración a través de las esporas de hongos micorrizógenos arbusculares que en un principio portan la bacteria y que después, al germinar, la conducen hacia el interior de las raíces de la planta a través de las hifas que colonizan el tejido vegetal, con una población promedio de 11 esporas por gramo de raíces (14).

Es por esto que aquí se plantea estudiar la aplicación foliar y al suelo, ya que además de explotar la ventaja de los hongos micorrizógenos arbusculares, se facilita otra vía de penetración como son los estomas del tejido vegetal, que cuando abren a través del proceso de intercambio gaseoso, pueden incorporar en su interior el microorganismo, y ya este después se multiplica en el interior del tejido foliar.

En varios estudios se ha reportado las ganancias en el contenido de nitrógeno en los órganos aéreos en más de un cultivo al inocular la bacteria vía foliar, donde se ha comprobado que logra fijar di nitrógeno derivado del aire a expensas del contenido de carbohidratos que transporta el tejido foliar como fuente de energía (12-13).

El hecho de aplicar este biopreparado en horas avanzadas de la tarde, igualmente facilita la penetración por vía estomática, ya que ha estas horas las plantas, una vez abastecidas de abundante agua, facilitan la apertura que sucede al cierre de los estomas en horas del mediodía.

Por otra parte, otra ventaja que presenta la especie *Ipomeoa batata* Lam es su arquitectura de cultivo rastrero, caracterizado por un elevado número de hojas con similar disposición de área foliar en correspondencia con el bajo volumen de relación peciolo/tallo que presenta, a diferencia de otras viandas tropicales como la yuca y la malanga. Esta condición facilita, al asperjar el follaje, una mejor homogenización de la suspensión bacteriana que llega a la hoja y, por tanto, del número de bacterias que se adhieren por unidad de superficie foliar.

En un segundo año de experimentación, se comprueba nuevamente el mayor efecto agrobiológico de *G. diazotrophicus* a favor de la inoculación foliar con un 16% de aumento en el rendimiento agrícola en comparación con la inoculación sumergida de la semilla agámica del boniato, la que a su vez superó al control sin inocular (testigo) en un 35%, con un aumento en productividad correspondiente a 10.53 t/ha.

El valor correspondiente al aumento de los rendimientos que se logran es muy alto para un tratamiento (biofertilización) que solo contribuye a la mejora de la productividad y no a la alteración del sistema planta, lo cual se explica por la continua degradación genética de los clones existentes de viandas y el empobrecimiento de los suelos en los últimos años en el país, a pesar de que los ensayos fueron atendidos (fertilizados) de acuerdo a las recomendaciones establecidas en las cartas tecnológicas de cada uno de los cultivos.

En otros informes sobre el efecto de la bacteria bajo las condiciones edafoclimáticas del Brasil y aplicada de forma foliar a razón de 15 mL.pl<sup>-1</sup> se han obtenido aumentos similares, aunque con menores valores de incremento del rendimiento (14,16), lo cual puede deberse a que en los ensayos realizados en Cuba predominan las condiciones del trópico húmedo, caracterizadas por mayores valores promedios de temperatura, precipitaciones y nivel de radiación solar, parámetros estos que influyen notablemente sobre el desarrollo y la fisiología de los cultivos (11-12).

Al estudiar estas variantes de inoculación sobre *Xanthosomas spp.*, se pudo comprobar la mayor efectividad de la bacteria endófito cuando esta fue aplicada de forma foliar, promediando más de cuatro toneladas por hectárea en comparación con el método de aplicación sumergida (Tabla V), a pesar de que la imbibición en agua favorece el establecimiento y desarrollo de este cultivo bajo condiciones de campo (21). En relación con esta condición, la solución final de trabajo donde se suspende el microorganismo es acuosa, o sea, tiene más de un 98% del preciado líquido y, sin embargo, la respuesta encontrada no supera al procedimiento de aspersión.

Desde el punto de vista agrotécnico el hecho de que en estos cultivos la imbibición no resulte el método indicado para incorporar la bacteria sobre las plantas es ventajoso ya que el volumen por hectárea a emplear de semilla agámica en cualquiera de ellos es elevado y por tanto se torna muy complejo lograr diseñar un módulo de maquinaria y sistema manual, semirústico, u otro, que



pueda contener y manipular cientos de kilogramos de raíces y tubérculos para posteriormente ser incorporados al camellón de los surcos en el campo; aspecto este que con la aplicación foliar + suelo queda resuelto al cargar con el producto y asperjar, con ayuda de una máquina fumigadora, la superficie cultivable.

**Tabla V. Efecto de diferentes métodos de inoculación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre el rendimiento de malanga *Xanthosoma* (clon México 1). Años 2003 (I) y 2004 (II)**

Año	Tratamiento	Rendimiento (t/ha)
I	Testigo	31.07 c
	Inoculación sumergida	35.40 b
	Inoculación foliar + suelo	39.82 a
	Esx	0.91
	CV (%)	13.15
II	Testigo	29.54 c
	Inoculación sumergida	35.82 b
	Inoculación foliar + suelo	38.70 a
	Esx	0.78
	CV (%)	10.61

Medias con letras no comunes difieren significativamente entre sí por prueba de Anova y Test de Newman Keuls con  $p < 5\%$

Para este cultivo tampoco se encuentran reportes sobre el establecimiento de *G. diazotrophicus*, por lo que no se pueden comparar los resultados con otros ensayos de formas de inocular la bacteria; aunque, sí es de destacar el efecto estimulador provocado por el microorganismo. En estos dos experimentos solo se presentan los rendimientos por unidad de superficie, pero es de interés señalar que aunque no se evaluaron otros indicadores de crecimiento y desarrollo de las plantas, sí se observó en todo momento la superioridad de estas a favor de la bacterización, en un orden similar al que se manifiesta el efecto del microorganismo sobre el rendimiento agrícola.

En general, en los tres cultivos y en los varios años de experimentación, se evidencia como la inoculación del microorganismo foliar + suelo es la forma más efectiva de inoculación, lográndose los mayores valores de estimulación en las diferentes variables de crecimiento y desarrollo de las plantas en los diferentes cultivos estudiados, así como en el rendimiento agrícola y la calidad de los productos de cosecha.

En este sentido, y teniendo en cuenta el principio de la fertilización biorganomineral bajo un enfoque de Manejo Integrado de la Nutrición en el agro ecosistema (11), la mayor cantidad de biomasa vegetal que se logra con la inoculación y el aumento en los productos de cosecha, sin dudas lleva a una mayor extracción de macro y micro nutrientes, por lo que se hace imprescindible, más aún en las relaciones endófitas (mayor expresión del potencial de la asociación planta-microorganismo) realizar los respectivos estudios de balance nutricional del sistema

para poder recomendar los tenores requeridos de fertilización orgánica y mineral al suelo para evitar su degradación y empobrecimiento gradual; resultado de la superexplotación (múltiples cosechas) en tiempo y espacio, sin cumplir las medidas establecidas de conservación y manejo.

Es necesario aclarar que en estos ensayos fue imposible, por concepto de recursos técnicos, estudiar la apertura estomática en relación con la incorporación de la bacteria en estas estructuras, pero será objeto de futuras investigaciones, ya que resulta muy interesante profundizar en el conocimiento de esta vía de penetración del endófito. Por otra parte, en Cuba, los hongos micorrizógenos por lo general están presentes en todos los suelos cultivables (21), por lo que independientemente de su eficiencia en función del efecto que sean capaces de provocar sobre el rendimiento de los cultivos, lo cual se logra con cepas convenientemente seleccionadas, estos microorganismos se comportan como vehículo para lograr una efectiva penetración de *G. diazotrophicus* a través de sus hifas colonizadoras de las raíces de las plantas (2).

En estudios de asociación planta-microorganismos se han elucidado los genes del operón Nif (30.5 kb) en caña de azúcar, y después de secuenciados y analizados, queda claro que corresponde a especies diazotróficas con aceptable potencial nitro fijador, que además pueden sintetizar sustancias activas como AIA y citoquininas de forma constitutiva pero en el interior del vegetal y en estrecho intercambio con el metabolismo de la planta a partir de diferentes señales que actúan como elicitores, por lo que conociendo su presencia en número de células por gramo de tejido fresco en diferentes órganos de la planta (tallo, raíz, hojas) se puede considerar el efecto de estos metabolitos sobre la estimulación del crecimiento y desarrollo de los cultivos tratados, como se evidencia claramente en trabajos anteriores realizados por este grupo de trabajo para estas viandas cultivadas igualmente sobre suelo Ferralítico Rojo (22-23).

En relación a la condición de la presencia o no del microorganismo distribuido en el sistema planta se ha demostrado que esta asociación es natural y necesaria para la planta. Hasta ahora en estudios realizados a partir de vitroplantas ha quedado claro que cuando el tejido vegetal en el proceso de desinfección pierde la bacteria que está asociada de forma autóctona se afecta notablemente el crecimiento y desarrollo en plántulas de boniato y piña (22-24).

En el orden agronómico este microorganismo no ha sido utilizado en estudios agrobiológicos en experimentos de gran extensión, por ejemplo en maíz y sorgo se han realizado en Australia ensayos bajo condiciones de casa de cristal en macetas o en muy pequeñas parcelas de campo, y aún así no se ha estudiado momentos y métodos de inoculación (25-26), solo en boniato se ha aplicado la bacteria asperjando la planta en el momento de la siembra (16); de ahí la novedad de los estudios realizados en este trabajo. En Brasil y Estados Unidos, igualmente se

han ejecutado ensayos en maíz a niveles controlados de experimentación y se ha demostrado el efecto estimulador sobre el crecimiento de las plantas, pero no se determinó esquemas de diseño de momento y métodos de inoculación, simplemente se asperjó una cepa de la bacteria sobre la planta (25-27).

En una amplia revisión efectuada no se encontró otros datos de formas de inoculación de este microorganismo sobre cultivos económicos (28) y hasta ahora no se han reportado otros avances. En este sentido, más del 95 % de la información científica disponible de esta bacteria clasifica en estudios genético moleculares vinculados a la fijación del dinitrógeno y la taxonomía, no se ha tratado de forma práctica las bondades como biofertilizante de las plantas.

Como se ha podido comprobar en los estudios efectuados, la aplicación foliar + al suelo resulta la vía más idónea para introducir el endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* en el sistema planta, y por consiguiente, obtener el efecto agrobiológico deseado sobre los cultivos de yuca, boniato y malanga. Esta forma de inoculación ocupa un mayor espectro de acción en cuanto a la arquitectura de la planta y la superficie de suelo que la rodea, donde además existen las poblaciones nativas de hongos micorrizógenos arbusculares, fundamentalmente los géneros *Glomus* y *Acaulospora* en poblaciones entre cuatro-seis esporas por gramo de suelo (2-15-16) y que actúan como portadores de la bacteria, no solo facilitando su penetración a la planta, sino igualmente protegiendo al microorganismo de las condiciones adversas del ambiente (2-3-9-29-30).

Teniendo en consideración estos resultados, todo parece indicar que este comportamiento no se logra con el otro método ensayado (inoculación sumergida), resultando una vía menos efectiva para lograr un efecto marcado de la asociación del microorganismo endófito con las viandas tropicales.

## REFERENCIAS

1. Cavalcante, V. A. y Döbereiner, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 1988, vol. 108, no. 1, p. 23-31.
2. Kersters, K.; Lidisyanti, P.; Komagata, K. y Swung, J. The Family Acetobacteraceae: the genera Acetobacter, Acidomonas, Asaia, Gluconacetobacter, Gluconobacter and Kozakia. En: Dworkin, M., Falkos, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH, Stackebrandt, E (Eds). *The Prokaryotes* (3<sup>rd</sup> Edn). A hand-book on the Biology of Bacteria: Protobacteria: Alpha and Beta sub classes vol 5, Springer, New York, 2006, p. 163-200.
3. Cocking, E. C.; Stone, P. J. y Davey, M. R. Intracellular colonization of roots of Arabidopsis and crop plants by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *In Vitro Cell Dev Biol. Plat.*, 2006, vol. 42, p. 74-82.
4. Fischer, K. y Newton, W. E. Nitrogenase proteins from *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane-colonizing bacterium. *Biochim. Biophys. ACTA*, 2005, vol. 1750, p. 154-165.
5. Saravanan, V. S.; Madhaiyan, M. y Thangaraju, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*, 2007, vol. 66, p. 1794-1798.
6. Muñoz-Rojas, J.; Fuentes-Ramírez, L. E. y Caballero-Mellado, J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2005, vol. 54, p. 57-66.
7. Saravanan, V. S.; Kalaiarasan, P.; Madhaiyan, M. y Thangaraju, M. Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn<sup>2+</sup>) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Lett Appl. Microbiol.*, 2007, vol. 44, p. 235-241.
8. Savavanan, V. S.; Madhaiyan, M.; Osborne, J.; Thangaraj, M. y Sa, T. M. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen fixing *Acetobacteraceae* Members their possible role in plant growth promotion. *Microbial Ecology*, 2008, vol. 55, p. 130-140.
9. Muthukumarasamy, R.; Kang, U. G.; Park, K. D.; Jeon, W. T.; Park, C. Y.; Cho, Y. S.; Kwon, S. W.; Song, J.; Roh, D. H. y Revathi, G. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, vol. 102, p. 981-991.
10. Madhaiyan, M.; Saravanan, V. S.; Bhakiya Silba Sandal Jovi, D.; Lee, H.; Thenmozhi, R.; Haris, K y Sa, T. M. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Gahts, India. *Microbiol. Res.*, 2004, vol. 159 p. 233-243.
11. Dibut, B.; Ríos, Y.; Ortega, M. y Fey, L. Estudio de la asociación *Gluconacetobacter diazotrophicus*-viandas tropicales establecidas sobre suelo ferralítico rojo. I. Selección de las cepas efectivas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* para la biofertilización efectiva de boniato, yuca y malanga. *Cultivos Tropicales*, 2010, vol 31, no. 4, p. 3-7.
12. Muñoz-Rojas, J. y Caballero-Mellado, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial Ecology*, 2003, vol. 46 p. 454-464.
13. Anand Kumar, S. P.; Sobhakumari, V. P.; Loganathan, P. y Vimal Venkatesh, M. Improved *in vitro* Culture Methodology in Sugarcane by Introducing *Azospirillum* sp and *Gluconacetobacter* sp., *Sugar Tech.*, 2004, vol. 6, no. 1 y 2, p. 69-72.
14. Döbereiner, J.; Reis, V. M.; Paula, M. A y Olivares, F. Endophytic diazotroph in sugarcane, cereals and tuber plants. In: *New Horizons in Nitrogen Fixation*. R. Palacio, J. Mora y W.E. Newton, Eds. *Klumer Academic Publisher, Notherlands*, 1993, p. 671-676.
15. Isopi, R.; Fabbri, P.; Gallo, M. de y Puppi, G. Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L.). *Moench* spp. *bicolor* with vesicular arbuscular mycorrhizas and *Acetobacter diazotrophicus*. *Symbiosis*, 1995, vol. 18, p. 43-55.
16. Paula, M. A.; Urquiaga, S.; Siqueira, J. O. y Döbereiner, J. Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato (*Ipomea batatas*). *Biol. Fert. Soils*, 1992, vol. 14, p. 61-66.

17. Instituto de Suelos. Nueva versión de la Clasificación Genética de los Suelos de Cuba, Ed AGROINFOR, La Habana, 2000, 64 p.
18. Ministerio de la Agricultura. Evaluación de los resultados de año 1999-Grupo de Cultivo Varios, Ciudad de la Habana, 2000, 17 p.
19. Dibut Álvarez, B. Biofertilizantes como insumos en Agricultura Sostenible. HUMUWORM S.P.R.de R. L. México, 2005, 107 p.
20. Ríos, Y. Efecto de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre el crecimiento, desarrollo y rendimiento del cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) var. CMC-40. (Tesis de Maestría). Universidad de la Habana, 2007, 57 p.
21. Ruiz, L. Efectividad de las asociaciones micorrízicas en especies vegetales de raíces y tubérculos en suelos Pardos con Carbonatos y Ferralíticos Rojos de la región central de Cuba. En: Tesis para optar por el Grado Científico de Doctor en Ciencias agrícolas, La Habana, 2001, 105 p.
22. Dibut Alvarez, B.; Martínez, R.; Ortega, M.; Ríos, Yoania; Tejeda, G.; Planas, Liuba y Rodríguez, J. Utilización actual y perspectivas de la relación endófitas plantas-bacterias. Estudio de caso *G.diazotrophicus*-cultivos de importancia económica. *Cultivos Tropicales*, 2009, vol. 30, no. 4, p. 16-23.
23. Martínez, R. y Dibut, B. Utilización de nuevos paradigmas que permitan profundizar los conocimientos sobre las relaciones suelo-planta en condiciones tropicales. *Cultivos Tropicales*, 2009, vol. 30, no. 4, p. 7-12.
24. González, R.; Laudat, T.; Arzola, M.; Menéndez, R.; Marrero, P.; Pulido, L.; Dibut, B. y Lorenzo J. C. Effect of *A.chroococcum* on *in vitro* pineapple plants growth during acclimatization. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant.*, 2010, vol. 27, no. 2, p. 7-10.
25. Carneiro, R.; Martins, M. A.; Freitas, M.; Detmamm, S. M. y Vasquez, H. M. Inoculacao micorrizica arbuscular e dosis de fósforo na producao do capim-andropogon em sustrato nao esteril. *Rev. Bras.Cien.Agr.*, 2007, vol. 2, no. 3 p. 212-218.
26. Labidi, S.; Nars, H.; Zouaghi, M. y Wallander, H. Effects of compost addition on extraradical growth of arbuscular mycorrhizal fungi in *Acacia Tortilis* ssp. *Appl.Soil.Ecol.*, 2007, vol. 35, no. 1, p. 184-192.
27. Dibut, B.; Martínez, R.; Ortega, M.; Ríos, Y.; García, R.; Tejeda, G.; Fey Govín, L.; Rodríguez, J.; Simanca, M. E.; Soca, U.; Jiménez, K. y López, G. Avances de la asociación *G. diazotrophicus*-plantas cultivables. Interés agronómico y comercial. *Agrotecnia de Cuba*, 2007, vol. 31, no. 2, p. 18-23.
28. Ríos, Y. y Dibut, B. *G.diazotrophicus*: Un microorganismo promisorio en la elaboración de biopreparados. *Cultivos Tropicales*, 2007, vol. 28, no. 4, p. 19-24.
29. Martínez, R.; Dibut, B. y Ríos, Yoania. Efecto de la integración en la aplicación agrícola de biofertilizantes y fertilizantes minerales sobre las relaciones suelo-plantas. *Cultivos Tropicales*, 2010, vol 31, no. 3, p. 27-31.
30. Dibut Alvarez, B. Los biofertilizantes como complemento en la nutrición de los cultivos en el sistema de la Agricultura Urbana. *Agrotecnia de Cuba*, 2008, vol. 32, no. 2, p. 1-7.

Recibido: 13 de septiembre de 2010

Aceptado: 23 de mayo de 2011

#### ¿Cómo citar?

Dibut Álvarez, Bernardo; Ríos Rocafull, Yoania; Ortega García, Marisel y Fey Govín, Luis. Estudio de la asociación *Gluconacetobacter diazotrophicus*-viandas tropicales establecidas sobre suelo Ferralítico Rojo. II. Determinación del método de inoculación más eficiente para la incorporación de *G. diazotrophicus* en los cultivos de boniato, yuca y malanga. *Cultivos Tropicales*, 2011, vol. 32, no. 4, p. 20-26. ISSN 0258-5936