

# NUEVOS AISLADOS DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* EN CULTIVOS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA PARA CUBA

B. Dibut<sup>✉</sup>, Marisel Ortega, R. Martínez, L. Fey y Yoania Ríos

**ABSTRACT.** In recent years, soil microbiologists have studied endophytic microorganisms associated with higher plants with benefits over the crops. This report offers the results concerning the isolation and distribution of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in economically important crops for Cuba. The bacteria was isolated by filtrates and over different vegetal organ sections laid out on LGI-P culture medium, proving the growing characteristics after 96 hours of incubation at 32°C. Finally, 22 isolates from 10 different plant species were obtained. Populational dynamic experiments developed under greenhouse conditions by means of a randomized complete design allowed to quantify the bacteria in leaves, stems and roots of maize, sweet potato, cassava, taro and sugarcane with populations between  $1.8 \times 10^2$ - $2.3 \times 10^7$  cells per fresh tissue gram. The highest cell populations were detected in leaves, followed by stems and finally in roots or tubers. The favorable response from eight crops to bacterial inoculation, this time grown in SG culture medium and incubated at 32°C for 72 h, enabled to affirm the potentiality this microorganism has as biofertilizer. *Gluconacetobacter diazotrophicus* appears for the first time in five plant species that belong to different botanical families.

**Key words:** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, biodiversity, crops

**RESUMEN.** En los últimos años, un llamado importante para los microbiólogos del suelo ha sido el estudio de microorganismos endófitos que se asocian con plantas superiores, con el consiguiente beneficio sobre los cultivos. En este trabajo, se ofrecen los resultados sobre el aislamiento y la distribución de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para Cuba. La bacteria se aisló a partir de filtrados y secciones de diferentes órganos del vegetal dispuestos sobre medios de cultivo LGI-P, donde se comprobó el crecimiento característico a las 96 h de incubación a 32°C de temperatura, obteniéndose finalmente 22 aislados a partir de diez especies cultivables. Experimentos de dinámica poblacional desarrollados en condiciones de invernadero mediante diseño completamente aleatorizado permitieron cuantificar el microorganismo en hojas, tallos y raíces de maíz, boniato, yuca, malanga y caña de azúcar, con poblaciones que oscilan entre  $1.8 \times 10^2$ - $2.3 \times 10^7$  células por gramo de tejido fresco. Las poblaciones celulares más altas se detectaron en las hojas, seguido de los tallos y por último las raíces o tubérculos. La respuesta favorable de ocho cultivos a la inoculación de la bacteria, esta vez crecida en medio de cultivo SG e incubada a 32°C durante 72 h, permite plantear la potencialidad que este microorganismo presenta como biofertilizante. Se informa por primera vez la presencia de la *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cinco especies de plantas pertenecientes cada una a diferentes familias botánicas.

**Palabras clave:** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, biodiversidad, cultivos

## INTRODUCCIÓN

Los microorganismos endófitos comprenden a hongos y bacterias, que viven sin causar daño en el interior de células o tejidos vegetales de plantas superiores durante un período considerable de su ciclo de vida y que generalmente la benefician con su actividad. Por otra parte, la diversidad y el número de organismos rizosféricos es muy elevada, presentándose en la rizosfera (como nicho ecológico) una fuerte competencia por los nutrientes y en consecuencia una disponibilidad limitada, además de

encontrarse menos protegidos frente a las condiciones adversas que se presentan en el medio ambiente (1, 2, 3).

Un elevado número de informes describe las ventajas de las asociaciones simbióticas y más recientemente las endófitas, en cuanto a la alta eficiencia que se logra en el intercambio entre micro y macrosimbiontes, que finalmente incide sobremanera sobre el comportamiento del sistema planta, en general, a diferencia de los sistemas asociativos donde se conoce que gran parte del resultado de su actividad metabólica se pierde por lavado, lixiviación e inmovilización por absorción en el complejo arcillo húmico o por parte del resto de la microflora normal del suelo (2, 4, 5, 6).

En este sentido, desde hace más de diez años se conoce de la presencia del endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus*, aislado por primera vez a partir de raíces y tallos de caña de azúcar cultivada en distintas regiones

Dr.C. B. Dibut, Investigador Auxiliar; Marisel Ortega, L. Fey y Yoania Ríos, Especialistas y Dr.C. R. Martínez, Investigador Titular del Departamento de Biofertilizantes, Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), calle 1, esq. 2, Santiago de las Vegas, Boyeros, La Habana, CP 17 200.

✉ bdibut@inifat.co.cu

del Brasil (7). En este momento, fue descrita como *Saccharobacter nitrocaptans*, que posteriormente se modificó por *Acetobacter nitrocaptans* en base a experimentos de hibridación de ADN; más tarde, esta nomenclatura fue corregida teniendo en cuenta una modificación hecha por puño y letra de Döbereiner, en la que se indicaba como nombre de la especie *Acetobacter diazotrophicus*, y más recientemente, se presentó el reordenamiento de la familia a la que pertenece el microorganismo y se renombró entonces como se conoce en la actualidad (4, 7, 8).

La bacteria, además, ha sido aislada de diferentes variedades de caña de azúcar cultivadas en otros países como Australia, México, India y Canadá, en este último a partir de plantas crecidas en condiciones de invernadero (9, 10, 11). En el caso de Cuba, se ha estudiado el microorganismo en el interior de la caña de azúcar y otras especies de plantas de importancia económica, lográndose obtener un número importante de aislados, así como el conocimiento de su actividad nitro fijadora y estimuladora del crecimiento vegetal y la relación con otros microorganismos asociados a estos cultivos (3, 12). Igualmente, *G. diazotrophicus* ha sido encontrado en *Pennisetum purpureum* var. Camerún, boniato, café, piña, maíz, millo africano, así como en el insecto *Saccharococcus sacchari*, plaga común de la caña de azúcar y en el interior de esporas de hongos micorrizógenos arbusculares (1, 4, 8, 11).

A pesar de todos los esfuerzos realizados por estudiar este microorganismo, la mayor cantidad de información científica sobre el tema se centra en la taxonomía y la forma en que se asocia con las plantas (5, 7, 13), por lo que no abundan informes acerca del interés agrobiológico que como endófito presenta sobre el metabolismo vegetal y por tanto su actividad sobre el crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos, haciendo posible la obtención de una gama de nuevos biofertilizantes de alta efectividad en comparación con los que hoy se conocen a base de bacterias asociativas fijadoras del dinitrógeno y estimuladoras del crecimiento vegetal.

Esta problemática, en los últimos años, ha planteado como línea para microbiólogos y agrónomos la posibilidad de trabajar empleando técnicas de ingeniería genética, en función de expresar la información génica de estos microorganismos beneficiosos en la planta; sin embargo, a pesar de los avances logrados, todavía no ha sido posible la comercialización de estas plantas transformadas (10, 11). Es por esto que otra línea no menos importante y más avanzada en su adaptación a la naturaleza sería la búsqueda de microorganismos beneficiosos que habitasen dentro del vegetal y de hecho valorar la necesidad o no de que puedan ser inoculados sobre cultivos de importancia económica, tal es el caso del endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que cumple con estos requisitos como microsimbionte de plantas, por lo que se propone como objetivo de este trabajo conocer la presencia y distribución de esta bacteria en un grupo de especies de plantas cultivables de interés para Cuba.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La bacteria se aisló a partir de material vegetal fresco (hojas, tallos y raíces de plantas), previamente lavado con detergente Tween-80 y varios pases sucesivos en agua destilada estéril. Los aislamientos se realizaron a partir de muestras vegetales de diferentes variedades y clones de boniato (*Ipomoea batatas* Lam., clon INIVIT B-88), calabaza (*Cucurbita moschata*, Duch ex Poir., var. Cuba 85-74), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L., var. J-605), maíz (*Zea mays* L., var. Francisco Mejorado y Gibara), malanga (*Xanthosoma* spp. L., clon. México-1 y Camerún 14), melón (*Citrullus lanatus* L., var. Tropical CH-2), papaya (*Carica papaya* L., var. Maradol Roja), rosa (*Rosa canina* L., var. Happy) y yuca (*Manihot esculenta* Crantz, clon CMC-40 y Señorita), todos provenientes de áreas agrícolas del Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT) y atendidos según lo recomendado en el Instructivo técnico para el manejo de cada cultivo.

El método de aislamiento constó de dos procedimientos, en un caso obteniendo filtrados de extractos acuosos a partir de 20 g de biomasa vegetal (hojas, tallo y raíz) macerada con mortero esmerilado estéril y, en otro, efectuando la siembra directa a mediana profundidad de secciones (entre 5 y 8 mm de largo) de cada uno de estos órganos en viales de 25 mL con 10 mL del medio de cultivo selectivo LGI-P (9), los cuales fueron posteriormente incubados a 32°C durante 96 h, hasta desarrollar el crecimiento en forma de película superficial de color amarillo-naranja, que permitió la purificación y el pase a tubo de los aislados para su posterior identificación.

Una vez obtenido el crecimiento de la bacteria en medio selectivo LGI-P, se realizaron otras pruebas fisiológico-bioquímicas para completar la identificación de la especie, como: capacidad de oxidar el etanol a ácido acético a pH 5.5, crecimiento en sacarosa a una concentración del 30 % al mismo valor de pH, utilización de citrato y urea, producción de indol a partir de triptofano, reducción de nitrato, prueba de catalasa y formación de colonias color café oscuro con bordes claros en medio de extracto de papa suplementado con 15 % de sacarosa, todos incubados a 32°C de temperatura (4,13). Adicionalmente, se realizaron pruebas de asimilación de los azúcares rafinosa, galactosa, arabinosa, glicerol, manitol y xilosa; en todos los casos al 2 % de concentración e incubados a 32°C de temperatura (4). Estos aislados forman parte de la colección de BFN ubicada en el Laboratorio de Biotecnología del INIFAT.

Los experimentos diseñados para conocer la distribución de la bacteria por cuantificación de las poblaciones autóctonas en el sistema planta (hojas jóvenes completamente desarrolladas) se realizaron en condiciones de invernadero, empleando macetas de 5 kg conteniendo suelo Ferralítico Rojo (14), distribuidas bajo un diseño Completamente Aleatorizado con cuatro réplicas. En la Tabla I se describen las características de fertilidad del suelo utilizado en los ensayos.

**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.100 g <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> O (mg.100 g <sup>-1</sup> )	Ca (cmol <sup>+</sup> .kg <sup>-1</sup> )	Mg (cmol <sup>+</sup> .kg <sup>-1</sup> )
Ferralítico Rojo	3.25	59	7.3	51	64	9.1	3.7

Para conducir, igualmente en invernadero, el experimento de dinámica poblacional como consecuencia de la inoculación de *G. diazotrophicus* sobre un grupo de cultivos económicos, se empleó el mismo diseño experimental con igual tipo de suelo (Tabla I); para este ensayo se utilizó la cepa INIFAT Abn<sub>1</sub> crecida en medio de cultivo SG (7) en condiciones de zaranda regulada a 32°C de temperatura y 180 rpm de agitación, obteniéndose finalmente a las 72 h un inóculo con concentración de 3.5 x 10<sup>11</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. El método de aplicación del endófito consistió en la inoculación (aspersión) al suelo y foliar con ayuda de un aspersor, y la cuantificación se realizó a partir de hojas jóvenes, empleando el método de diluciones seriadas del filtrado con siembra en placas petri conteniendo medio SG y posterior incubación a 32°C de temperatura durante 72 h, donde se alcanza el completo desarrollo de las colonias.

No se exponen mediciones sobre parámetros de crecimiento y desarrollo en plantas inoculadas, ya que no es objetivo de este trabajo, aunque sí se observó una estimulación marcada. Las atenciones culturales, en cada caso, fueron conducidas según las normas técnicas establecidas para cada cultivo.

Cada experimento se repitió tres veces, excepto las pruebas de clasificación de la bacteria que se repitieron cuatro veces. Los datos así obtenidos fueron evaluados estadísticamente por prueba t de Student y Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación. El procesamiento de toda la información se realizó mediante el programa STAT-ICTF 4.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este tipo de interacción planta-microorganismo, en los últimos años se han dedicado esfuerzos a estudiar por diferentes vías el mejoramiento genético de plantas y microorganismos involucrados en la asociación, con el objetivo de lograr ampliar (fundamental por transformación) las funciones de fijación del dinitrógeno y/o la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal en beneficio de la simbiosis, destacándose no solo los aspectos de nutrición vegetal, sino también de la antibiosis y el biocontrol (9, 15, 16). Sin embargo, a medida que se desarrollan estos avances, se hacen cada vez más necesarios los estudios sobre la diversidad de la bacteria en asociación con plantas, con el objetivo de conocer su comportamiento y lograr un esquema óptimo de selección de cepas con el consecuente establecimiento de un cepario o colección "herramienta" del microorganismo, para el trabajo de mejoramiento de cultivos por vía genética o por la bacterización de plantas (6, 12, 15).

En la Tabla II, se relacionan 22 aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* obtenidos a partir de 10 especies vegetales de importancia económica.

**Tabla II. Presencia y aislados de *G. diazotrophicus* en diferentes cultivos de importancia económica**

Cultivo	Nomenclatura del aislado	Números aislados	Clon/ Variedad
Maíz	INIFAT Az 1,2-3	3	Francisco Mejorado y Gibara
Melón	INIFAT Adm 1	1	Tropical CH-2
Caña de azúcar	INIFAT Aca 1,2	2	J-605
Calabaza	INIFAT Acl 1	1	Cuba 85-74
Yuca	INIFAT Ay 1-2	2	CMC-40, Señorita
Boniato	INIFAT Abn 1,2,3...7	7	INIVIT B-88
Malanga	INIFAT Amg 1,2	2	México 1, Camerún 14
Papaya	INIFAT App 1,2	2	Maradol Roja
Rosa (flor)	INIFAT Ars 1	1	Happy
Remolacha	INIFAT Arm 1	1	R-Detroit

En relación con las pruebas de clasificación de cada material microbiano, todos los aislados se presentan como cocobacilos gram negativo. El hecho de emplear el medio selectivo LGI-P (8), ayuda a reconocer la especie *G. diazotrophicus*, por presentarse el crecimiento característico del microorganismo que se describe como la formación de colonias planas, de forma irregular y color naranja intenso después de cinco días de incubación a 32°C de temperatura (4); sin embargo, estas características no son absolutas para la identificación de la especie, debido a que otras especies fijadoras del dinitrógeno de este mismo género como *Gluconacetobacter johannae* y *Gluconacetobacter azotocaptans* pueden confundirse con *G. diazotrophicus*.

Debido a esto, se realizaron los ensayos para evaluar la capacidad de oxidación del etanol a ácido acético a pH 5.5 y el crecimiento en sacarosa a una concentración del 30 % al mismo valor de pH, resultando ambas pruebas positivas en todos los aislados. Adicionalmente, se dispuso de las siguientes pruebas: utilización de citrato (+), utilización de la urea (-), reducción de nitrato (+), producción de indol a partir de triptofano (+) y catalasa (+). Todos estos resultados permitieron complementar la diferenciación a favor de *G. diazotrophicus*.

La prueba definitiva consistió en hacer crecer los aislados en medio de cultivo a base de extracto de papa suplementado con 15 % de sacarosa, comprobándose, después de siete días de incubación a 32°C, la formación de colonias de color café oscuro con una coloración blanquecina en sus bordes. Esta característica permite diferenciar *G. diazotrophicus* de los fijadores *G. johannae* y *G. azotocaptans* (4). Otra prueba diferenciadora resultó ser la asimilación de azúcares simples. En este caso, todos los aislados crecieron bien en rafinosa, galactosa, arabinosa, glicerol y manitol, observándose un crecimiento muy pobre en xilosa, comportamiento este que identifica a *G. diazotrophicus*, ya que las otras dos especies del género *Gluconacetobacter* presentan un patrón diferente en el crecimiento en cada uno de estos sustratos (4).

Es de interés señalar el informe por primera vez de la bacteria en los cultivos de calabaza, yuca, malanga, papa-ya y rosa roja (ornamental). El hecho de que el microorganismo haya sido aislado de plantas pertenecientes a familias tan diversas como *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Araceae*, *Caricaceae* y *Rosaceae*, sugiere que la bacteria presenta una amplia capacidad para dispersarse y colonizar diferentes hospederos, quedando demostrado al mismo tiempo la potencialidad que tiene como endófito para mejorar la productividad en tan variados cultivos.

Otros investigadores, igualmente han hallado un patrón similar en cuanto a la diversidad de especies vegetales en donde se ha encontrado el microorganismo (11, 17). No obstante, a pesar de que *G. diazotrophicus* ha sido aislado de varias especies cultivables, se plantea que existe la posibilidad de que el hospedero primario de la bacteria no sea una planta de interés agrícola y, por lo tanto, aún no se haya detectado (11).

Con excepción de la rosa, la tendencia al hábitat del microorganismo sigue presentándose en cultivos con alto contenido de azúcares, como ha sido informado anteriormente por otros autores y por el propio grupo de investigación (7, 12), a diferencia de un gran número de cultivos encuestados donde no se logra detectar la presencia del microorganismo. En relación con este comportamiento, todo parece indicar que las propias exigencias anabólicas y catabólicas de la maquinaria bioquímica que caracteriza a esta bacteria, expresan su mayor actividad en ambientes con altas concentraciones de azúcares asimilables, como de hecho se ha logrado simular en los propios medios de cultivo diseñados para el normal crecimiento y reproducción del endófito.

En esta misma línea, se ha planteado con mayor frecuencia la incidencia de la bacteria en plantas que acumulan sacarosa y que se propagan vegetativamente (7, 10); sin embargo, teniendo en cuenta estos resultados, el microorganismo se asocia igualmente de forma efectiva con otras especies de plantas que no acumulan el azúcar y que se propagan por semilla botánica.

Es de destacar la mayor cantidad de aislados de *G. diazotrophicus* a partir de plantas de boniato y maíz (Tabla II), a diferencia del resto de las especies hospederas, donde solo se lograron obtener entre uno y dos aislados. Este comportamiento coincide con otros resultados obtenidos en estos dos cultivos, que junto a la caña de azúcar, constituyen la mayor referencia en cuanto a fuentes de diversidad de la bacteria (7, 9, 18).

En la Tabla II, se demuestra cómo la población bacteriana autóctona varía en relación con los diferentes órganos y tejidos del vegetal, lo cual coincide con lo informado en la literatura para el caso de la caña de azúcar, el maíz, el boniato y otros cultivos (7, 10, 19). En este caso, la respuesta que se presenta se caracteriza por las diferencias significativas encontradas en la cuantificación de las mayores poblaciones del endófito en las hojas jóvenes, seguida del tallo o pecíolo, según la arquitectura del cultivo y, por último, la concentración celular más baja, que se detecta en las raíces o tubérculos; excepto en los cultivos de maíz y caña de azú-

car, donde la mayor concentración bacteriana está presente en el tallo, que a su vez no difiere de las poblaciones encontradas en las hojas, pero sí de las raíces de las plantas. En el caso de la yuca, no se encuentran diferencias significativas entre las poblaciones encontradas en el tallo y la raíz.

Este fenómeno que se presenta en las dos gramíneas, puede deberse a que en este órgano de transporte es donde fluye la mayor cantidad de nutrientes y agua, por lo que la bacteria pudiera acumularse en mayor población en detrimento de las hojas, sobre todo si se tienen en cuenta las características de alta eficiencia fotosintética y respiración de estas dos especies, a diferencia de otras especies vegetales, donde el microorganismo encuentra su ambiente más favorable en las hojas, órganos donde normalmente se presenta la mayor actividad metabólica de síntesis y degradación de biomoléculas. En otros informes, en maíz, se han encontrado igualmente elevadas poblaciones en el tallo (9) y, en caña de azúcar, estudios realizados en Brasil, Australia y Cuba, también muestran una alta concentración bacteriana en el xilema de las plantas (3, 6, 9).

La concentración y distribución de *G. diazotrophicus* aquí detectada en los cultivos de yuca y malanga, también constituyen un primer informe. La no presencia de diferencias significativas detectada entre la concentración celular del tallo y la raíz de plantas de yuca, puede deberse a que estos dos órganos están muy estrechamente relacionados en el intercambio de sustancias de reserva y en la propia arquitectura de esta especie, por lo que el nicho fisiológico bioquímico que predomina en ambos presenta condiciones semejantes, que favorecen un equilibrio en el desarrollo y establecimiento del microorganismo.

El detectarse las mayores poblaciones de *G. diazotrophicus* en boniato y caña de azúcar, puede ser explicado por el hecho de caracterizarse estas especies por una alta concentración de azúcares totales, lo cual constituye, desde el punto de vista fisiológico-bioquímico, un nicho ecológico de óptimas condiciones para la normal actividad metabólica de la bacteria; de aquí que se escogiera la cepa INIFAT Abn1 como base para la elaboración del inoculante ACESTIM.

En Brasil, estudios similares realizados en caña de azúcar han arrojado un título entre  $10^3$ - $10^7$  UFC por gramo de tejido fresco y en Estados Unidos, en el cultivo del maíz, se han logrado detectar poblaciones de la bacteria en hojas jóvenes de hasta  $10^5$  UFC por gramo de tejido (7, 17).

En relación con la necesidad o no de la inoculación para encontrar un efecto beneficioso del microorganismo sobre especies cultivables, esta solo se justifica en aquellas donde se encuentre en poblaciones sub-optimales; de aquí que resulten sumamente necesarios los estudios de diversidad de la bacteria. Por ejemplo, en Brasil, no se ha encontrado respuesta a la inoculación en caña, debido a las altas poblaciones autóctonas encontradas, las que al parecer satisfacen completamente las necesidades del sistema planta dentro de la asociación; sin embargo, en otros cultivos se ha detectado respuesta a la bacterización (6, 9, 16).

**Tabla III. Distribución de poblaciones autóctonas de *G. diazotrophicus* en diferentes órganos de plantas de cultivos económicos**

Cultivo	Órgano	Población (ln x)	Variedad/Clon
Maíz	Tallo	5.35 a	Francisco Mejorado
	Hojas	4.78 a	
	Raíz	3.46 b	
		Esx 0.12 CV (%) 7.63	
Boniato	Hojas	5.50 a	INIVIT- B88
	Peciolo	5.35 a	
	Tubérculo	3.38 b	
		Esx 0.10 CV (%) 5.98	
Caña de azúcar	Hojas	7.38 a	J-605
	Tallo	7.51 a	
	Raíz	4.29 b	
		Esx 0.23 CV (%) 6.70	
Yuca	Hojas	4.26 a	CMC-40
	Tallo	2.64 b	
	Raíz	2.66 b	
		Esx 0.35 CV (%) 7.34	
Malanga	Hojas	5.30 a	CAMERÚN-14
	Peciolo	4.65 a	
	Tubérculo	3.61 b	
		Esx 0.18 CV (%) 9.46	

X-UFC.g<sup>-1</sup> de tejido fresco en hojas jóvenes

Medias con letras no comunes difieren significativamente entre sí para p&lt;5 %

Al respecto y según los resultados aquí obtenidos, se recomiendan con carácter permanente los estudios de distribución y dinámica poblacional de *G. diazotrophicus* en especies cultivables, sobre todo si tenemos en cuenta que cada día se incrementa el efecto de los cambios climáticos sobre la biodiversidad, en general, lo que también puede afectar este tipo de asociación y, como consecuencia, la disminución de las poblaciones naturales de la bacteria en la planta. En este sentido, se presentan otros estudios realizados, donde se refleja la disminución de las poblaciones del endófito a medida que avanza la edad del cultivo, fenómeno que guarda una estrecha relación con la variedad que se emplea y otros factores del ambiente (4, 12).

Adicionalmente, los avances logrados en otras técnicas de la biotecnología agrícola, como es el caso de la reproducción *in vitro* de plantas o la obtención de plantas genéticamente modificadas, igualmente puede atentar contra la pérdida o afectación de la bacteria debido al proceso de manipulación. En este caso, también se recomienda restablecer la bacteria por inoculación en los bancos de semillas agámicas (incluida la caña de azúcar), con el objetivo de recuperar el equilibrio del sistema planta-microorganismo.

Como resultado de la bacterización, se ha detectado respuesta de la concentración celular en hojas jóvenes de diferentes cultivos (Tabla IV), excepto en boniato y caña de azúcar, lo que se explica por lo planteado anteriormente en relación con la capacidad de ambos en cuanto a los tenores de azúcares que acumulan. Es de destacar que, en este caso, no es objetivo de estos ensayos

evaluar parámetros de crecimiento y desarrollo de las plantas tratadas, aunque la observación sí permitió constatar un efecto estimulador sobre las plantas.

**Tabla IV. Comportamiento de poblaciones autóctonas de *G. diazotrophicus* en plantas controles (sin inocular) y como consecuencia de la inoculación en diferentes especies cultivables**

Cultivo	Población (lnx)	
	Control	Inoculado
Papa	-	6.19
Maíz	5.06 b	7.41 a
Melón	3.16 b	5.27 a
Calabaza	3.25 b	5.41 a
Yuca	4.22 b	6.07 a
Boniato	5.47	6.06 NS
Malanga	3.69 b	6.25 a
Caña de azúcar	7.53	8.01 NS

Medias con letras no comunes difieren significativamente entre sí para p&lt;5 %

X-UFC.g<sup>-1</sup> tejido fresco, la cuantificación en cada cultivo se realizó a partir de hojas jóvenes

Un caso de especial interés es el comportamiento de las poblaciones de *G. diazotrophicus* detectado en papa, ya que no aparece la bacteria de forma autóctona; sin embargo, logra establecerse a concentraciones elevadas (10<sup>6</sup> UFC.gtf<sup>-1</sup>) en planta producto de la inoculación, provocando un marcado efecto agrobiológico en condiciones experimentales y de producción agrícola, el cual será expuesto en otros resultados posteriores. En este sentido, de haber estado presente la bacteria en el desarrollo evolutivo del cultivo, la pérdida de esta puede haber estado condicionada por la manipulación *in vitro* de plantas dentro del esquema de mejoramiento del cultivo de la papa; de aquí, la necesidad de los estudios de dinámica poblacional y la consecuente alternativa de inocular o no.

Como tendencia, se observa que las poblaciones se aumentan hasta 100 veces con la inoculación, a excepción del cultivo de la malanga, donde se logró aumentar el número de bacterias por gramo de tejido en un orden de 1 000. La respuesta a la inoculación en esta última especie abre grandes perspectivas en cuanto a mejorar la productividad de tubérculos en este cultivo, que se caracteriza por demandar elevadas cantidades de nitrógeno como nutriente, del cual no se dispone con facilidad en estos momentos dentro de la agrotecnia de las viandas tropicales en el país (20).

Una respuesta muy diferente se obtiene de la inoculación de bacterias asociativas, donde es necesario aumentar más de 1000 veces el número de rizobacterias para poder encontrar el efecto agrobiológico deseado sobre las plántulas (cepellón) o plantas adultas en diversos cultivos (2, 19), comportamiento que responde a la desventaja que presentan estos microorganismos en relación con los endófitos, en cuanto a la pérdida en el suelo de un porcentaje elevado de su actividad metabólica (nitrofijación, solubilización, estimulación) por lavado, inmovilización, desasimilación y lixiviación, entre otras causas, por lo que no llegan a beneficiar de igual forma a las plantas.

A esto se une la gran diversidad y el número de organismos rizosféricos, lo que provoca que en este tipo de ambiente predomine una fuerte competencia por los nutrientes y el oxígeno y, en consecuencia, que la disponibilidad de estos en ocasiones sea limitada, además de su menor protección a las condiciones adversas del ambiente y frente al propio antagonismo, depredación y otras leyes que rigen la ecología microbiana en el suelo.

De todo lo anterior se deduce la necesidad de profundizar cada vez más en las asociaciones endofíticas en función del beneficio agronómico que puedan producir, sobre todo si se considera que existen más de 500 000 variedades de plantas superiores, por lo que la diversidad de bacterias y hongos asociados puede estimarse en valores superiores (11). De hecho, sería aceptable para la agrobiotecnología que al menos se lograsen identificar relaciones endófitas beneficiosas en un 1 % de la diversidad existente, lo cual representaría poder mejorar el potencial productivo de 5 000 variedades de plantas cultivables, una cifra nada despreciable, teniendo en cuenta la carencia de alimentos que predomina en la mayor parte del planeta.

En consecuencia, como resultado de este trabajo, la diversidad de *G. diazotrophicus* detectada en especies cultivables de importancia económica para el trópico permite, una vez obtenidos los respectivos aislados, dirigir un esquema de trabajo iniciado por la selección de cepas efectivas y los estudios de dinámica poblacional, con el objetivo final de lograr un mejoramiento de la producción vegetal por el establecimiento de la bacteria, vía inoculación, en el sistema planta.

## REFERENCIAS

1. Bueno, dos Reis Jr., F.; Reis, V. M.; Urquiaga, S. y Dobreiner, J. Influence of nitrogen fertilization on the population of *Diazotrophic bacteria* *Herbaspirillum* sp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plant and Soil*, 2000, vol. 219, p. 153-159.
2. Dibut, B. Obtención de un bioestimulador del crecimiento y el rendimiento vegetal para el beneficio de la cebolla (*Allium cepa* L.). [Tesis de grado]; INCA, 2000, 104 p.
3. Ortega, P.; Ortega, E.; Fernández, L. y Rodes, R. Composición de cinco aislados fijadores de nitrógeno obtenidos del interior de la caña de azúcar y de *Saccharococcus sacchari*. En: Congreso Científico del INCA (13:2002 nov 12-15:La Habana). Memorias CD-ROM Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, ISBN 959-7023-22-9, 2002.
4. Fuentes, L. E.; Bustillos, R.; Tapia, A.; Jiménez, T.; Wang, E. T.; Martínez, E. y Caballero, J. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. Nov, and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. Nov, associated with coffee plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2000, vol. 5, p. 43-49.
5. James, E. K.; Olivares, F. L.; Oliveira, A. L. de; dos Reis, F. B.; Silva da, L. G. y Reis de Oliveira, V. M. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Exp. Botany*, 2001, vol. 52, no. 357, p. 747-760.
6. Reis-Junior, F. B.; Silva da, L. G.; Reis, V. M.; Dobreiner, J.; dos Reis Junior, F. B. y Silva da, L. G. Occurrence of diazotrophic bacteria in different sugarcane genotypes. *Pes. Agrop. Bras.*, 2000, vol. 35, no. 5, p. 985-994.
7. Dobreiner, J.; Reis, V. M.; Paula, M. A y Olivares, F. Endophytic diazotroph in sugarcane, cereals and tuber plants. En: *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Netherlands:Kluwer Academic Publisher, 1993, p. 671-676.
8. Cavalcante, V. A. y J Dobreiner, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 1988, vol. 108, no. 1, p. 23-31.
9. Riggs, P. J.; Chelius, M. K.; Iniguez, A. L.; Kaeppeler, S. M. y Triplett, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with *Diazotrophic bacteria*. *Aust. J. Plant. Physiology*, 2001, vol. 28, no. 9, p. 829-836.
10. Shankaraiah, N.; Gururaj-Hunsigi, L. y Hunsigi, G. Field evaluation of some promising associative nitrogen fixing bio-agents under grader levels of nitrogen for yield and quality of jaggery. *Cooperative Sugar*, 2001, vol. 33, no. 1, p. 39-43.
11. Tapia, A.; Bustillos, M. R.; Jiménez, T.; Caballero, J. y Fuentes, L. E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial Ecol.*, 2000, vol. 39, no. 1, p. 49-55.
12. Dibut, B.; Martínez, R.; Ortega, M.; Ríos, Y. y Fey, L. Potencial agrobiológico de la asociación *Gluconacetobacter diazotrophicus*-*Carica papaya* L. En: Congreso Científico del INCA (14:2004 nov. 9-12:La Habana). Memorias CD-ROM Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, ISBN 959-7023-27-X, 2004.
13. Caballero-Mellado, J. ; Martínez-Romero, J. E.; Estrada de los Santos, P. y Fuentes-Ramírez, L. E. Maize colonization by *Acetobacter diazotrophicus*. In: *Biological Nitrogen Fixation for the 21<sup>st</sup> Century*. C. Elmerich, A. Kondorosi y W. E. Newton, Eds. 1998, 381-382 p.
14. Cuba. Minagri. Instituto de Suelos. Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba, La Habana : AGRINFOR, 2000, 64 p.
15. Hernández, L.; Sotolongo, M.; Rosabal, Y.; Menéndez, C.; Ramírez, R.; Caballero, J. y Arrieta, J. Structural levansucrase gene (*IsdA*) constitutes a functional locus conserved in the species *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Arch. Microbiol.*, 2000, vol. 174, no. 5, p. 111-119.
16. Sevilla, M.; Burris, R. H.; Nirmala-Gunalapa, G. L.; Kennedy, C. y Gunalapa, N. Comparison of benedit to sugarcane plant growth and N<sub>15</sub> incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif-mutant strains. *Molec. Plant. Micro. Interactions*, 2001, vol. 14, no. 3, p. 358-366.
17. James, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, 2000, vol. 65, p. 197-209.
18. Muthukumarasamy, R.; Rebathi, G. y Lakshminarasimhan, C. Diazotrophic associations in sugarcane cultivation in south India. *Tropical Agriculture*, 1999, vol. 76, no. 3, p. 171-178.
19. Reis, V. M.; Baldani, J.; Baldani, V. L. y Dobreiner, J. Biological dinitrogen fixation in Gramineae and palm trees. *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 2000, vol. 19, no. 3, p. 227-247.
20. Ruiz, L. Efectividad de las asociaciones micorrizicas en especies vegetales de raíces y tubérculos en suelos Pardos con Carbonatos y Ferralíticos Rojos de la Región Central de Cuba. [Tesis de grado]; INCA, 2001, 105 h.

Recibido: 12 de marzo de 2004

Aceptado: 25 de enero de 2005