

# ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PLANTA-*Azospirillum* EN EL CULTIVO CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum* sp.)

Juana Pérez<sup>✉</sup> y M. Casas

**ABSTRACT.** The isolation and characterization of wild strains of *Azospirillum* was done in the rhizosphere of the commercial sugarcane varieties Ja60-5 and C266-70 on the Red and Yellowish Ferralitic soils from Havana and Ciego de Avila provinces. The nitrogenase activity of isolated bacteria was assayed by acetylene reduction technique (ARA) and its growth promoting activity in sugarcane plantlets. Strain characterization was achieved using morphological and biochemical tests. Significant concentrations of bacteria of  $10^4$  cels.g<sup>-1</sup> of roots were obtained, mainly on Ja60-5 variety in both soils. Four strains similar to *Azospirillum* were isolated and 8 INICA strain was selected due to its high ARA and sugarcane plant growth values.

**RESUMEN.** Se realizó el aislamiento y la caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* en la rizosfera de las variedades comerciales de caña de azúcar Ja60-5 y C266-70 en los suelos Ferralítico Rojo y Ferralítico Amarillento de las provincias de La Habana y Ciego de Avila. A los aislamientos se les evaluó la actividad nitrogenasa mediante la técnica de reducción del acetileno y la actividad estimuladora del crecimiento en vitroplantas de caña de azúcar. Las cepas fueron caracterizadas mediante pruebas morfológicas y bioquímicas. Se encontraron concentraciones de bacterias del orden de  $10^4$  cel. g<sup>-1</sup> de raíces, correspondiendo los mayores valores a la variedad Ja60-5 en ambos suelos. Se aislaron cuatro cepas con características propias del género *Azospirillum*, seleccionándose la cepa 8 INICA de *Azospirillum brasilense* para estudios posteriores, por sus elevados valores de reducción de acetileno y su mayor efecto sobre el crecimiento de vitroplantas de caña de azúcar.

**Key words:** *Azospirillum*, sugarcane, vitroplants

**Palabras clave:** *Azospirillum*, caña de azúcar, vitroplantas

## INTRODUCCIÓN

De la caña de azúcar se han aislado numerosos microorganismos, por ser este un cultivo de ciclo largo que acumula elevadas concentraciones de sacarosa a través de su desarrollo vegetativo.

En este cultivo se ha aislado un elevado número de microorganismos diazotófos de vida libre, los cuales han mostrado una gran actividad nitrogenasa *in vitro*, entre los que se encuentran las bacterias del género *Azospirillum* (1). El género comprende un grupo de bacterias promotoras del crecimiento de las plantas, capaces de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones microaeróbicas y producir sustancias estimuladoras del crecimiento (2). Actualmente, el género incluye siete especies diferentes de bacterias (3).

Las plantas micropropagadas obtenidas por cultivo de meristemas han sido ampliamente utilizadas en la evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y promotoras del crecimiento vegetal (4), por lo que algunos señalan que la evaluación de las cepas del género *Azospirillum* a

través de las técnicas de cultivo *in vitro* ha resultado una herramienta muy útil para estos fines (5).

La práctica de aplicar inoculantes microbianos en la agricultura, constituye una alternativa promisoriosa que ha tomado auge internacionalmente. El *Azospirillum* es uno de los géneros más utilizados, aplicándose en diferentes cultivos y localidades edáficas (6, 7). Sin embargo, la poca repetibilidad en los resultados obtenidos a escala internacional se atribuye principalmente a la presencia de diferentes ecotipos de cepas (8); de aquí la importancia de trabajar con cepas autóctonas asociadas al cultivo de la caña de azúcar.

Este trabajo tiene como objetivo aislar, caracterizar y seleccionar cepas autóctonas de *Azospirillum* potencialmente eficientes en la biofertilización de la caña de azúcar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Caracterización de algunos componentes de la fertilidad del suelo.** Entre los meses de enero y marzo se colectaron muestras de la capa arable en los suelos Ferralítico Rojo y Ferralítico Amarillento de las provincias de La Habana y Ciego de Avila, con el objetivo de determinar algunas variables físico-químicas de los suelos que caracterizan su fertilidad. Se determinaron el pH-H<sub>2</sub>O (método potenciométrico), porcentaje de materia orgánica (MO)

Juana Pérez, Investigador Auxiliar y M. Casas, Investigador Agregado del Programa de Fitomejoramiento, Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA), Carretera al CAI Martínez Prieto, km 2 ½, Boyeros. Cuba.

✉ juanita@inica.edu.cu, ediliomtnez@infomed.sld.cu

(Walkley-Black), fósforo asimilable (Bray y Kurtz) ( $\text{mgP}_2\text{O}_5 \cdot 100\text{g}^{-1}$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  ( $\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) (complexometría mediante valoración con EDTA) y  $\text{K}^+$  ( $\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) (fotometría) (9). **Determinación de las poblaciones de *Azospirillum*.** Se realizaron muestreos de la rizosfera en las variedades de caña de azúcar Ja60-5 y C266-70, en plantas con edades entre cuatro y siete meses crecidas en los suelos estudiados. Se seleccionaron parcelas no fertilizadas de experimentos de dosis de nitrógeno, conformándose muestras únicas para cada variedad y tipo de suelo. Una vez en el laboratorio y en condiciones asépticas, las raíces se separaron del suelo con la ayuda de pinzas, lavadas primeramente con agua corriente y después con abundante agua destilada estéril; posteriormente se secaron con papel de filtro y se pesó un gramo de cada muestra.

Las muestras se maceraron en mortero estéril con 9 mL de agua destilada estéril y a partir de aquí se realizaron diluciones seriadas ( $10^2$ - $10^6$ ), que se sembraron por triplicado a razón de 0.1 mL en frascos que contenían medio NFb (10), los cuales se incubaron a  $35^\circ\text{C}$  de tres a cinco días. Las cuantificaciones se realizaron por el método de número más probable (NMP), mediante la observación del crecimiento típico del microorganismo en el medio NFb semisólido. En cada dilución los tubos positivos se anotaron y los datos se analizaron empleando las tablas de McCrady.

**Aislamiento de cepas.** De los frascos con crecimiento positivo o dudoso, se transfirieron alícuotas al medio NFb semisólido y a las 48 horas se observaron al microscopio de contraste de fase, para la confirmación de las características celulares. Para la obtención de cepas, se seleccionaron los tubos positivos de las mayores diluciones y a partir de estos tubos, se sembraron por estrías placas con medio Rojo Congo (11). Se seleccionaron las colonias con características típicas del género, las cuales se purificaron posteriormente en placas de BMS (10). La pureza de los aislados se confirmó además mediante tinción de Gram, observándose la uniformidad celular al microscopio óptico. Para su diferenciación, las cepas se enumeraron y se añadió la letra I de INICA. Las colonias individuales se mantuvieron en refrigeración a  $4^\circ\text{C}$ , en cuñas de agar BMS hasta su uso.

**Determinación de las características culturales y bioquímicas.** Se determinaron la capacidad y las características de crecimiento de los aislamientos en los medios Rojo Congo, NFb semisólido y BMS. Los estudios morfológicos de las células se realizaron siguiendo las descripciones del Manual de clasificación de bacterias de Berguey (12, 13) para el género *Azospirillum* spp. Además, para su identificación las cepas se sometieron a algunas pruebas fisiológico-bioquímicas (oxidasa, catalasa, fosfatasa, requerimientos de biotina, asimilación de diferentes fuentes de carbono, hidrólisis del almidón y la gelatina, reducción de nitrato a nitrito,  $\text{NO}_3$ - $\text{NO}_2$ , y producción de Indol a partir de triptofano) (14). En los estudios se emplearon las cepas patrones de *Azospirillum brasilense* Sp7 (ATCC 29145), *A. lipoferum* Br17 (ATCC

29709) y *A. amazonense* Y6 (ATCC 35121), todas procedentes del cepario del CNPAB/EMBRAPA de Brasil.

**Actividad de reducción del acetileno (ARA):** La capacidad fijadora de nitrógeno de los aislados 8-I, 11-I, 79-I y 88-I, se determinó por cromatografía gaseosa (15), con los siguientes parámetros de corrida: columna de vidrio 2.7 mm.4 mm, matriz Porapax N80-100 mallas, temperaturas (inyector  $100^\circ\text{C}$ , columna  $90^\circ\text{C}$ , detector  $150^\circ\text{C}$ ), flujos (nitrógeno, portador,  $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , hidrógeno, combustible,  $32.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , aire  $320.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ), tiempo de corrida seis minutos, tiempo de retención de etileno 3.25 minutos y tiempo de retención de acetileno 4.73 minutos.

Las cepas se cultivaron durante 24 horas a  $35^\circ\text{C}$  en viales de 13 mL de volumen efectivo, que contenían 5 mL de medio NFb semisólido. Los tubos se inocularon en una atmósfera de 10 % de acetileno y se incubaron por espacio de una hora a  $35^\circ\text{C}$ . Se realizaron cinco réplicas por tratamiento y los resultados se procesaron por el programa BIOCROM así como se evaluaron estadísticamente mediante análisis de varianza de clasificación simple y las medias significativas comparadas por la prueba de Duncan, mediante el modelo estadístico Tonystat.

**Interacción in vitro *Azospirillum*-caña de azúcar.** Se realizaron dos experimentos *in vitro* para evaluar el efecto de cuatro cepas de *Azospirillum* sobre vitropiantas de caña de azúcar de las variedades comerciales Ja60-5 y C120-78 en fase de enraizamiento, en comparación con el control no inoculado. Se empleó el medio de enraizamiento Murashige-Skoog (16) con la concentración de nitrógeno reducida a 1/8 (5). En estas condiciones se evaluaron tres cepas nativas y la cepa Sp7 en comparación con un control no inoculado. Se realizaron 15 réplicas por tratamiento y las variables evaluadas fueron: peso fresco de la raíz, peso fresco del tallo, peso seco de la raíz y peso seco del tallo. Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante análisis de varianza de clasificación simple y las medias significativas comparadas por la prueba de Tukey, mediante el modelo estadístico SAS.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

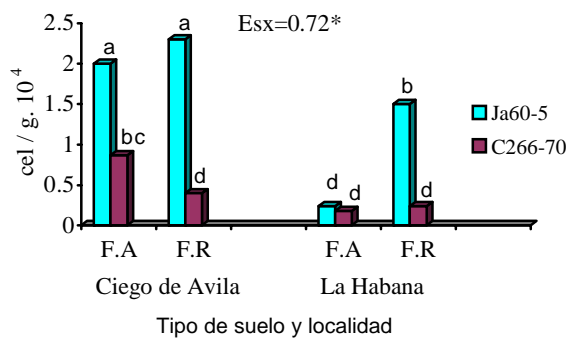
*Algunas características de la fertilidad de los suelos estudiados.* En la Tabla I se muestran los resultados del análisis químico-físico de los suelos.

**Tabla I. Características agroquímicas de los suelos Ferralítico Rojo y Ferralítico Amarillento de las provincias de La Habana y Ciego de Avila**

Variables	Ferralítico Rojo		Ferralítico Amarillento	
	La Habana	Ciego de Avila	La Habana	Ciego de Avila
PH ( $\text{H}_2\text{O}$ )	6.34	6.52	6.75	7.2
MO (%)	3.14	3.16	3.23	2.87
$\text{K}^+$ ( $\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	0.38	0.82	0.31	0.35
$\text{Ca}^{2+}$ ( $\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	10.29	9.05	17.75	15.27
$\text{Mg}^{2+}$ ( $\text{cmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	3.28	2.70	4.77	4.38
P ( $\text{mgP}_2\text{O}_5 \cdot 100\text{g}^{-1}$ )	3.81	3.55	3.48	3.02

Según la categorización de los suelos Ferralíticos (17), los Amarillentos analizados son neutrales en cuanto a su pH; sin embargo, los Rojos son ligeramente ácidos. Todos los suelos tienen porcentaje medio de materia orgánica en el entorno de 3. El contenido de cationes  $Mg^{2+}$  y  $K^+$  es considerado medio para todos los suelos, con excepción del  $K^+$  en el Ferralítico Rojo de Ciego de Ávila, que se considera alto. El contenido de  $Ca^{2+}$  en los suelos Ferralíticos Amarillentos es mayor que en los Ferralíticos Rojos, aunque todos los valores se consideran medios, siendo esta la base intercambiable predominante en el complejo de adsorción para ambos suelos. Los contenidos de fósforo en todos los suelos son aceptables. De manera general, se demuestra las favorables características nutricionales que ellos poseen.

**Poblaciones de *Azospirillum* spp. en la rizosfera de la caña de azúcar.** Como se muestra en la Figura 1, la concentración de bacterias obtenida en las raíces de las diferentes muestras fue significativa. Los integrantes del género *Azospirillum* se encuentran en números significativos en asociación con las gramíneas (18, 19). La rizosfera de este cultivo es un ambiente favorable para el desarrollo de estas bacterias, debido a la presencia de fuentes de carbono y energía, las cuales se pueden originar por los exudados radicales y residuos vegetales que se depositan en el suelo.



Letras distintas indican que las medias son diferentes (Tukey 0.05)

**Figura 1. Poblaciones de *Azospirillum* determinadas en la rizosfera de las variedades de caña de azúcar Ja60-5 y C120-78**

En el microscopio de contraste de fase, se observaron células en forma de bacilos cortos y medianos, con extremos puntiagudos y movimiento espiral. Al realizar la tinción de Gram, resultaron Gram negativas.

Las mayores poblaciones de *Azospirillum* spp. fueron cuantificadas en los suelos Ferralíticos Rojo y Amarillento de Ciego de Avila, sobre todo en la variedad Ja60-5. Además, en estos suelos se observó un mayor número de raíces, con una estructura muy ramificada. Probablemente, la calidad y naturaleza de las sustancias excretadas por esta variedad producen una mayor atracción quimiotáctica sobre las bacterias del género

*Azospirillum*, conociéndose que los exudados de las plantas influyen decisivamente en la expresión de los genes involucrados en la interacción planta-bacteria (20).

Los menores valores encontrados en La Habana pueden estar relacionados con la poca humedad existente en los suelos en el momento en que se realizaron los muestreos, pues se debe tener en cuenta que en una región de clima y suelo como Cuba, los períodos de más altas temperaturas coinciden con las mayores precipitaciones y tienen lugar entre los meses de mayo-octubre, mientras que la seca se produce desde noviembre hasta marzo (21), a lo que se suma el hecho de que los suelos Ferralíticos Rojos, por poseer características sobresalientes como una marcada uniformidad física, gran profundidad efectiva y un adecuado nivel de fertilidad en la zona de desarrollo del sistema radical, tienen gran valor para la producción agrícola; sin embargo, tienen como desventaja las grandes pérdidas de agua que se producen por evaporación en la época de sequía, a causa de su estructura abierta (22), factor que puede haber influido en los resultados. Nuevamente, los mayores recuentos microbianos se observaron en la variedad Ja60-5.

**Determinación de las características culturales y bioquímicas.** Los resultados de la caracterización morfológica (Tablas II y III) y bioquímica (Tablas IV y V) de los aislamientos, demostraron la similitud de respuesta de las cepas estudiadas con las cepas patrones *A. brasilense* Sp7 y *A. lipoferum* Sp Br17, y coinciden con las descripciones del Manual de clasificación de bacterias de Berguey (12, 13) para el género *Azospirillum*. Las características resultantes de las nuevas cepas aisladas 79-I, 88-I y 11-I permitieron ubicarlas dentro de la especie *A. lipoferum*, mientras que la cepa 8I aunque tiene resultados que difieren de los de la cepa de *A. brasilense* empleada en el estudio, debe quedar ubicada dentro de esta especie.

Los resultados confirmaron que la inclusión de la siembra en el medio RC facilita el aislamiento de cultivos puros y la diferenciación del *Azospirillum* del resto de las bacterias dinitro fijadoras que pudieran crecer en el halo. Las características de las cepas estudiadas en el medio RC coinciden con las descritas para cepas de *Azospirillum* aisladas en el maíz (23).

**Actividad de reducción del acetileno (ARA).** Las cepas aisladas demostraron su capacidad fijadora de nitrógeno *in vitro*. En la Tabla VI, se muestran los valores de actividad nitrogenosa de las cepas aisladas, donde los valores de reducción de acetileno medidos en los aislamientos resultan estadísticamente superiores a los encontrados en las cepas patrones de *A. brasilense* Sp7 y *A. lipoferum* SpBr17, con excepción del aislamiento 88-I. Los valores de reducción del acetileno obtenidos están en el rango de los encontrados en aislamientos de *Azospirillum* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum* spp. procedentes de caña de azúcar (24).

**Tabla II. Resultados de la microscopía de contraste de fase de las cepas 8-I, 79-I y 11-I de *Azospirillum* spp., en comparación con las cepas patrones *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145), *A. lipoferum* SpBr17 (ATCC 29709) y *A. amazonense* Y6 (ATCC 35121) en el medio NFb semisólido**

Características	Cepas						
	8-I	79-I	11-I	88-I	Sp7	SpBr17	Y6
Forma	Bacilos gruesos, simples o dobles	Bacilos alargados simples o dobles	Bacilos alargados simples o dobles	Bacilos alargados simples o dobles	Bacilos gruesos simples o dobles	Bacilos alargados simples o dobles	Bacilos delgados y simples
Tamaño	1.0-1.3 µm	1.0-1.2 µm	1.2-1.3 µm	1.0-1.2 µm	1.0-1.2 µm	1.0-1.5 µm	0.8-1.0 µm
Gram	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Gránulos	si	si	si	si	si	si	si
Motilidad	muy mótil	lenta	mótil	mótil	muy mótil	lenta	mótil

**Tabla III. Características macroscópicas determinadas en las colonias de las cepas de *Azospirillum* spp. 8-I, 79-I y 11-I en comparación con las cepas patrones *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145), *A. lipoferum* SpBr17 (ATCC 29709) y *A. amazonense* Y6 (ATCC 35121) en los medios BMS y Rojo Congo**

Medios de cultivo	Características	Cepas						
		8I	79I	11I	88I	Sp7	SpBr17	Y6
BMS	Forma	circular	circular	circular	circular	circular	circular	circular
	Elevación	plana	plana	plana	plana	plana	plana	convexa
	Tamaño	4.0 mm	5.0 mm	5.0 mm	6.0 mm	5.0 mm	12.0 mm	
	Color	rosada*	blanca	rosada*	blanca	Rosada*	Rosada*	beige
	Superficie	rugosa	lisa	rugosa	rugosa	rugosa	lisa	lisa
	Borde	entero	entero	entero	entero	entero	entero	entero
	Detalles ópticos	opaca	brillosa	opaca	opaca	brillosa	opaca	opaca
RC	Forma	circular	circular	circular	circular	circular	circular	circular
	Elevación	plana	plana	plana	plana	plana	plana	plana
	Tamaño	5.0 mm	5.0 mm	5.0 mm	5.0 mm	5.0 mm	5.0 mm	5.0 mm
	Color	roja	roja	roja	roja	roja	roja	roja
	Superficie	seca	lisa	seca	seca	seca	seca	seca
	Borde	entero	entero	entero	entero	entero	entero	entero
	Detalles ópticos	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca	opaca

\*Colonias originalmente blancas, tornándose rosadas cuando envejece el cultivo

**Tabla IV. Utilización de diferentes fuentes de carbono por las cepas de *Azospirillum* spp. 8-I, 79-I y 11-I comparada con las cepas patrones *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145), *A. lipoferum* SpBr17 (ATCC 29709) y *A. amazonense* Y6 (ATCC 35121) en el medio NFb semisólido**

Fuentes de carbono	8I	11I	79I	88I	Sp 7	Sp Br17	Y6
Fructosa	+	+	+	+	+	+	-
Manitol	±	±	±	-	-	-	-
Sorbitol	±	±	+	-	-	-	-
Sacarosa	±	-	-	-	-	-	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-
Celobiosa	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	+
Succinato	+	+	+	+	+	+	+
Malato	+	+	+	+	+	+	+
Lactato	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+	+	-
Citrato	±	±	±	+	±	+	-
Glucosa	±	+	+	-	-	+	+
Malonato	+	+	+	-	-	-	-
Ketoglutarato.	±	±	±	+	-	-	±
Arabinosa	-	-	-	+	±	+	+
Galactosa	-	±	-	+	±	+	+

+ buen crecimiento, ± poco crecimiento, - no crecieron

**Tabla V. Respuesta ante las pruebas bioquímicas de las cepas de *Azospirillum* spp. 8I, 79I y 11I, en comparación con las cepas patrones *A. brasilense* Sp7 (ATCC 29145), *A. lipoferum* SpBr17 (ATCC 29709) y *A. amazonense* Y6 (ATCC 35121) en el medio NFb semisólido**

Pruebas	Cepas						
	8I	11I	79I	88I	Sp7	SpBr17	Y6
Requerimiento de biotina	+	+	±	-	-	+	-
Hidrólisis de la gelatina	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis del almidón	-	-	-	-	-	-	-
Prueba de la oxidasa	+	±	+	+	+	+	+
Prueba de la fosfatasa	+	-	+	+	+	+	+
Prueba de la catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	±
Indol a partir de triptófano	-	-	-	-	-	-	-

+ Buena reacción, ± poco reactivas, - no reaccionan

**Tabla VI. Actividad nitrogenasa de cuatro cepas autóctonas de *Azospirillum* aisladas de la rizosfera de caña de azúcar en comparación con las cepas patrones Sp7 (*A. brasilense*) y SpBr17 (*A. lipoferum*)**

Cepas	nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> .h <sup>-1</sup> .mL <sup>-1</sup>
8I	42.12 a
79I	42.12 a
11I	34.71 bc
88I	7.90 c
Sp7	37.08 b
SpBr17	37.08 b
Esx	1.7 ***
CV %	5.2

**Efectos de la inoculación del *Azospirillum* sobre vitroplantas de caña de azúcar.** En la Figura 2 (A, B, C y D), se observan los resultados de la inoculación de diferentes cepas de *Azospirillum* sobre vitroplantas de caña de azúcar de las variedades Ja60-5 y C120-78.

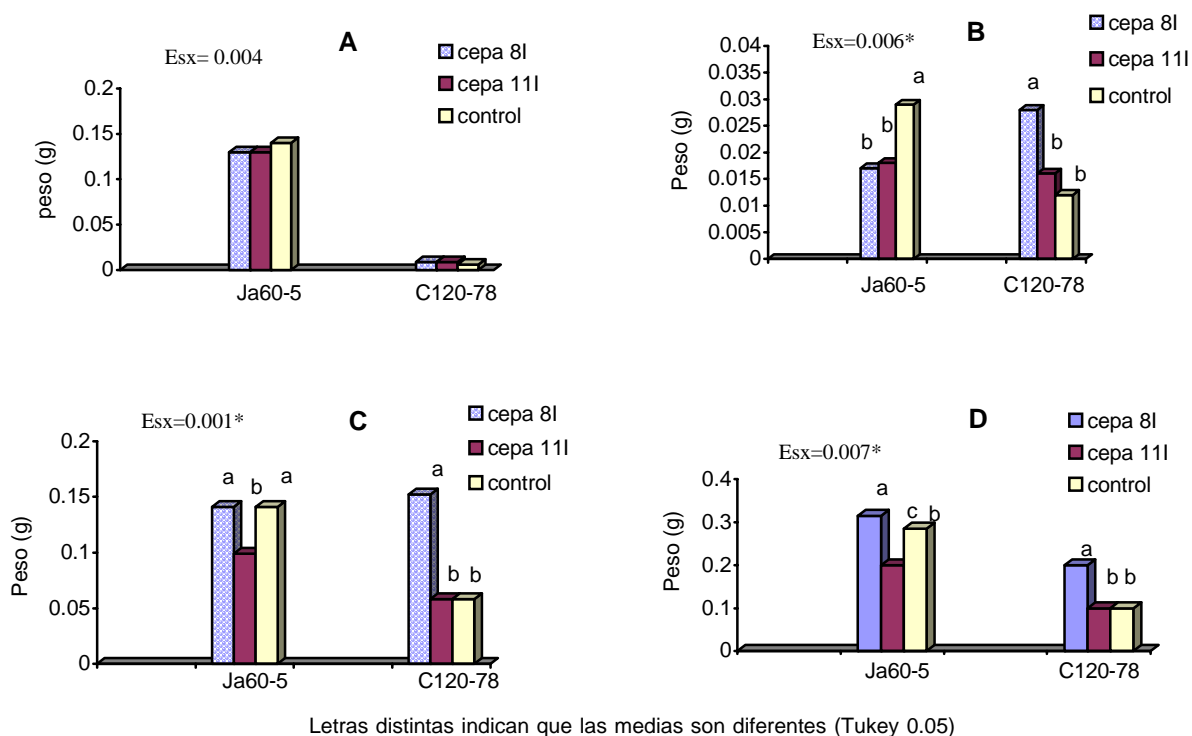
Se aprecia una respuesta estimuladora altamente significativa de la cepa de *Azospirillum brasilense* 8I sobre todas las variables de crecimiento determinadas, fundamentalmente en la variedad C120-78 (Figura 2A, B, C y D). Los valores absolutos obtenidos en los pesos seco y fresco de las vitroplantas de caña de azúcar en la variedad Ja60-5 fueron superiores, pudiéndose observar la mayor influencia de las cepas en las variables peso fresco de la raíz (Figura 2C) y tallo (Figura 2D). La cepa 11-I mantuvo un comportamiento similar al control no inoculado en la variedad C120-78, mientras que en la variedad Ja60-5, sus valores fueron inferiores.

En la Figura 3 (A, B, C y D), también se pueden observar los efectos de las cepas autóctonas de *Azospirillum* 8-I y 79-I sobre vitroplantas de caña de azúcar de la variedad Ja60-5. Todas las variables del crecimiento evaluadas resultan estadísticamente superiores al control no inoculado y a la cepa patrón Sp7 incluida en este estudio.

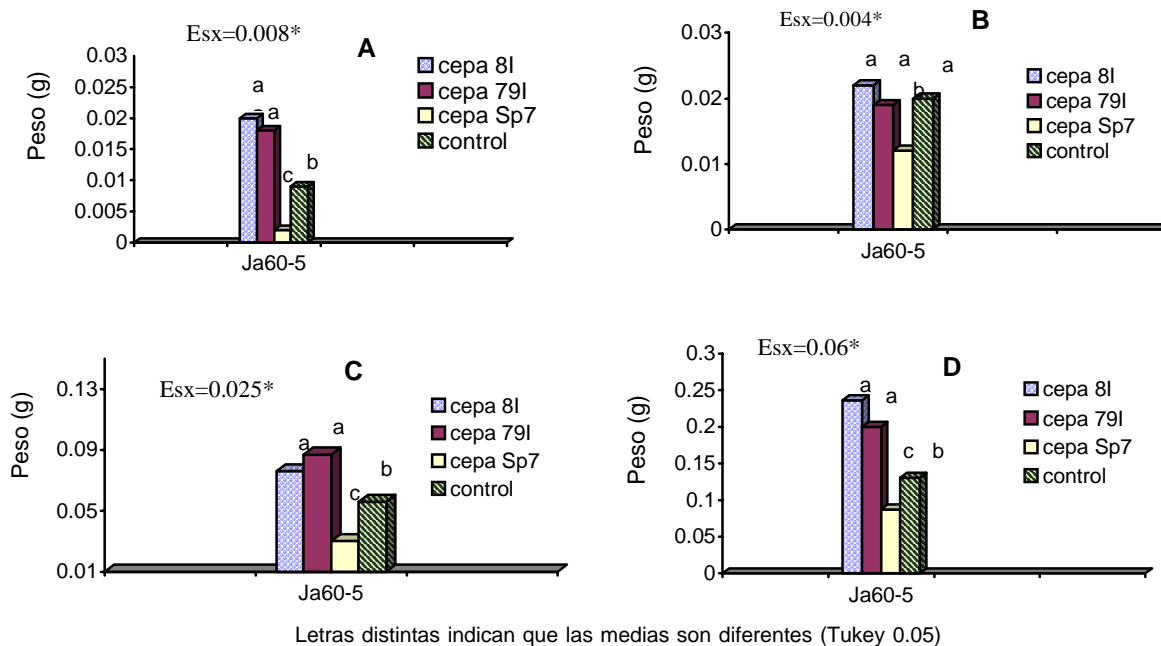
De manera general, la inoculación con las cepas de *Azospirillum* favoreció el crecimiento de las plantas de caña de azúcar, siendo el peso fresco del tallo la variable que mejor representó el efecto de la inoculación. La cepa 8I logró efectos mayores y más estables, lo cual se podría deber a que esta fue capaz de colonizar externa e internamente las raíces de esta planta. Sin embargo, se conoce que la cepa Sp7 no es capaz de colonizar internamente las raíces de las plantas (7).

Al igual que en esta investigación, otros autores, al inocular vitroplantas de caña de azúcar con *A. brasilense*, obtuvieron incrementos en los pesos seco y fresco del sistema radical, así como en el tamaño y volumen radical de las plantas (5); resultados similares se obtuvieron al inocular vitroplantas de caña de azúcar con cepas de los géneros fijadores de nitrógeno *Herbaspirillum* sp. y *Gluconacetobacter diazotrophicus* (25).

Actualmente, las cepas aisladas y caracterizadas forman parte de la colección de microorganismos de interés económico del INICA y la cepa 8 INICA que resultó la de mejores resultados está siendo empleada en la biofertilización de la caña de azúcar.



**Figura 2. Efecto de la inoculación de las cepas de *Azospirillum* 8-I y 11-I sobre las variables de crecimiento peso seco de la raíz (A), peso seco del tallo (B), peso fresco de la raíz (C) y peso fresco del tallo (D) en 10 vitroplantas de caña de azúcar de las variedades Ja60-5 y C120-78**



**Figura 3. Efecto de la inoculación de las cepas de *Azospirillum* 8-I, 79-I y Sp7 sobre las variables de crecimiento, peso seco de la raíz (A), peso seco del tallo (B), peso fresco de la raíz (C) y peso fresco del tallo (D) en 10 vitroplantas de caña de azúcar de la variedad Ja60-5**

## REFERENCIAS

- Seshadri, S.; Muthukumarasamy, R.; Lakshminarasimhan, C. y Ignacimuthu, S. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. *Current Science*, 2000, vol. 79, no. 5, p. 565-567.
- Burdman, S.; Jurkevilch, E. y Okon, Y. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. En: *Microbial interaction in agriculture and forestry*. 2000.
- Eckert, B., Weber, O., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M. y Hartmann, A. *Azospirillum doebereineri* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C(4)-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, vol. 51, p. 17-26.
- Sevilla, M.; Burris, R.; Gunapala, N. y Kennedy, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* type and Nif-mutant strains. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2001, vol. 14, no. 3, p. 358-366.
- Fernández-Vega, Z. Evaluación de la capacidad fijadora *in vitro* e *in vivo* de dos cepas de *Azospirillum* en plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y maíz (*Zea mays*). [Tesis de Maestría], Universidad de México, 1995. 112 p.
- Caballero-Mellado, J. El género *Azospirillum*. Capítulo 10: En: *Microbios*. México. 2000.
- Bashan, Y.; Puente, E.; Belhnenfalvay, G.; Li, C.; Bacilio, M.; Carrillo, A.; Moreno, M.; Vázquez, P.; Holguín, G. y de Bashan, L. Plant growth-promoting bacteria and desert re-vegetation. *Environmental microbiology*. Palm Springs, March 3-7. 2003. [Consultado: 12-7-2004]. Disponible en: <<http://www.cibnor.org>>.
- Bashan, Y. y Holguín, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.*, 1997, vol. 43, p. 103-121.
- Cabrera, A. Manual de técnicas analíticas para laboratorios de agroquímica y suelos. La Habana:INCA, 1988. 92 p.
- Döbereiner, J. Forrage grasses and grain crops. En: *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. 1980, p. 535-555.
- Rodríguez, E. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environm. Microbiol.*, 1982, vol. 44, no. 4, p. 990-991.
- Berguey's Manual of Systematic Bacteriology. William and Wilkins (eds) Baltimore, London, 1984, vol 1, p. 94-103.
- Berguey's Manual of Determinative Bacteriology. John G. Holt... (et al) 9<sup>th</sup> ed. 1994, 56 p.
- Yano, D.; Earris, M.; Umino, C.; Coutinho, M. y Canhos, P. Técnicas para cultivo, identificación y preservación de bacterias. Ed. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello". 1993. 150 p.
- Schollhorn, R. y Burris, R. Study of the intermediates in nitrogen fixation. *Fed. Proc.*, 1966, vol. 24, p. 710-715.
- Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiological Plantarum*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
- Cabrera, A. Los suelos Ferralíticos. Características químicas y físico-químicas y su influencia sobre la producción cañera. [Tesis de grado]. 1991, 106 p.
- Bacillio-Jiménez, M.; Aguilar-Flores, S.; Valle, M. del; Pérez, A.; Zepeda, A. y Zentero, O. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, vol. 33, p. 167-172.

19. Mehnaz, S.; Mirza, M.; Haurat, J.; Bally, R.; Normand, P.; Bano, A. y Malik, K. Isolation and 16 S rRNA sequence analysis of the beneficial bacteria from the rizosphere of rice. *Can. J. Microbiol.*, 2001, vol. 47, p. 110-117.
20. Fisher, S.; Marioli, J. y Mori, G. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* CD under saline stress. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, vol. 219, p. 53-62.
21. Bernal, N.; Morales, F.; Gálvez, G. y Jorge, I. Variedades de caña de azúcar. Uso y manejo. La Habana: Publicaciones IMAGO. 1997. 50 p.
22. SERFE. Bases para la fertilización mineral de la caña de azúcar en Cuba. La Habana:INICA, 1996.
23. Hernández, A.; Caballero, A.; Pazos, M.; Ramírez, R. y Heydrich, M. Identificación de algunos géneros microbianos asociados al cultivo del maíz (*Zea mays* L.) en diferentes suelos de Cuba. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2003, vol. 5, no. 1, p. 45-55.
24. Gamo, T. *Azospirillum* spp. from crop roots: A promoter of plant growth. *JARQ*, 1991, vol. 21, no. (4), p. 253- 259.
25. Olivares, F. The role of endophytic diazotrophs in sugarcane root morphogenesis and development. Abstract books of the 13<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation. Canada. 2001.

Recibido: 12 de octubre de 2004

Aceptado: 4 de agosto de 2005

# Cursos de Verano

Precio: 320 CUC

## *Tratamiento poscosecha de productos agrícolas*

*Coordinador: Dra.C. Inés Reynaldo Escobar*

*Duración: 40 horas*

*Fecha: julio*

### **SOLICITAR INFORMACIÓN**

**Dr.C. Walfredo Torres de la Noval**  
**Dirección de Educación, Servicios Informativos**  
**y Relaciones Públicas**  
**Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)**  
**Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,**  
**La Habana, Cuba. CP 32700**  
**Telef: (53) (64) 86-3773**  
**Fax: (53) (64) 86-3867**  
**E.mail: posgrado@inca.edu.cu**