

# PRESENCIA Y USO DE MICROORGANISMOS ENDÓFITOS EN PLANTAS COMO PERSPECTIVA PARA EL MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN VEGETAL

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

**ABSTRACT.** This article offers a new perspective about endophyte microorganisms associated with important plants for the economy because their activity increases nitrogen supplies by diazotofixation or provokes plant growing by the action of physiologically active substances. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum* sp, and *Herbaspirillum* sp. were isolated from arum, yucca, sweet potato, maize, potato and sugarcane, but only *Gluconacetobacter diazotrophicus* was studied. Experiments carried out with melon under screening conditions showed a great stimulating effect on plant height, stem length and biomass of 41, 67 and 69 % respectively. The trials with three clones of yucca and potato both under field conditions also showed a double effect with *Gluconacetobacter diazotrophicus*, where plant height, leaf number and efficiency per potato plant increased 32, 39 and 25 % respectively, when the bacterium was inoculated, obtaining high quality tubers. With yucca clones (CMC-40, CEMSA-785 and INIFAT-2), results were significant in all evaluated parameters and agricultural efficiency increased until 54 % with bacterization. All information was assessed using statistical tests like ANOVA, Duncan and Newman Kleus, both at a significance level of  $p < 0.05$ .

**RESUMEN.** Se ofrece una nueva perspectiva del estudio de microorganismos endófitos asociados con especies cultivables de importancia económica, que por su actividad permitan aumentar las ganancias en nitrógeno mediante la diazotofijación o estimular el crecimiento y desarrollo vegetal debido a la producción de sustancias fisiológicamente activas producto de la ventaja que presentan por estar integrados al sistema planta. Se efectuaron aislamientos de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum* sp y *Herbaspirillum* sp a partir de malanga, yuca, boniato, maíz, papa y caña de azúcar, solo estudiando en este trabajo la primera, por su perspectiva, empleándola en la bacterización mediante ensayos con plantas y conservando el resto de los aislados de las otras dos especies en la colección de microorganismos BFN del INIFAT. Experimentos conducidos en melón en condiciones de screening mostraron un marcado efecto estimulador sobre el cultivo con aumentos en la altura de la planta, largo del tallo y biomasa de 41, 67 y 69 %, respectivamente. Los ensayos con tres clones de yuca y en papa, ambos en condiciones de campo, igualmente mostraron el doble efecto de *G. diazotrophicus*; así, la altura, el número de hojas y rendimiento por planta en papa se incrementaron en 32, 39 y 25 %, por su orden, al inocular la bacteria con la obtención de tubérculos de mayor calidad; en el caso de los clones de yuca (CMC-40, CEMSA-785 e INIFAT-2), el efecto también fue significativo en todos los parámetros evaluados con un incremento en el rendimiento agrícola de hasta 54 % con la bacterización. Todos los datos expuestos fueron procesados por ANOVA con prueba de Duncan y en algunos casos de Newman Kleus, ambos al 5 % de significación.

**Key words:** microorganisms, endophytes, stimulus

**Palabras clave:** microorganismos, endófitos, estímulo

## INTRODUCCIÓN

El estudio de la Microbiología del Suelo y como consecuencia la aplicación de biofertilizantes en diferentes latitudes dista de más de medio siglo. En Cuba, a pesar de que muchos años atrás los agricultores manipulaban en sus siembras la nodulación de leguminosas vinculadas a la rotación de cultivos, las investigaciones

microbiológicas del suelo comienzan desde principios de la década del sesenta y alcanzan su madurez técnica en la década del ochenta, comenzando con el desarrollo y la elaboración de diferentes productos.

Dentro de la interacción planta-microorganismo, especial interés microbiológico y agronómico tiene el sistema *Rhizobium*-leguminosas, ya que a diferencia de otros microorganismos, estos tienen la capacidad de penetrar y transformar de forma organizada y altamente eficiente el sistema planta en función de disminuir las pérdidas en la actividad de ambos organismos dentro de la asociación, no ocurriendo así con otros géneros (*Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Clostridium*, *Bacillus*, etc.), los cuales se limitan en su colonización a la zona

Dr.C. B. Dibut, Investigador Auxiliar; Dr.C. R. Martínez, Investigador Titular, Marisel Ortega, Yoania Ríos y L. Fey, Especialistas del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", calle 2 esq. 1, Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba

✉ bdibut@inifat.co.cu

rizosférica, provocando la pérdida de un porcentaje elevado de su actividad metabólica y, por tanto, de su influencia sobre el vegetal, al igual que la actividad de este último sobre tales microorganismos asociados (1, 2, 3).

Así, en los últimos años, este comportamiento ha planteado como línea para microbiólogos y agrónomos la posibilidad de trabajar en las más diversas técnicas, incluyendo la bioingeniería, en función de introducir la información genética de estos microorganismos beneficiosos en el sistema planta; sin embargo, a pesar de los avances logrados, todavía no ha sido posible la comercialización de estas plantas transformadas. Por otra parte, otra línea no menos importante y más avanzada en su adaptación a la naturaleza sería la búsqueda de algunos de estos microorganismos beneficiosos que habitan dentro del vegetal y de hecho valorar la necesidad o no de que puedan ser inoculados sobre cultivos de importancia económica; tal es el hecho de los endófitos *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum* sp, *Herbaspirillum* sp y diferentes hongos micorrizógenos que cumplen con estos requisitos como microsimbiontes de plantas (4, 5, 6).

En este trabajo se propone, como principal objetivo, estudiar la presencia de estos endófitos en especies cultivables no presentadas en la literatura, así como demostrar el efecto que *G. diazotrophicus* pueda provocar sobre dichas especies, con énfasis en cultivos que promedien altos contenidos de azúcares, como es el caso de la yuca, la papa y el melón.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las bacterias se aislaron a partir de material vegetal fresco, previamente lavadas con detergente Tween-80 y varios pases en agua destilada estéril. *Gluconacetobacter diazotrophicus* se creció en medio LGI-P (3) y *Azospirillum* sp. y *Herbaspirillum* sp. en los medios Nfb y Jnfb (7), respectivamente. El método de aislamiento consistió en dos procedimientos, en un caso obteniendo filtrados, con ayuda de un filtro Saltorius-5 $\mu$  de extractos a partir de biomasa vegetal (hojas, tallo y raíz) macerada con mortero esmerilado estéril y, en otro, efectuando la siembra directa a mediana profundidad de secciones de cada uno de estos órganos en viales de 25 mL con 10 mL de cada medio de cultivo, los cuales fueron posteriormente incubados a 32°C durante 96 h, hasta desarrollar el crecimiento esperado que permitió la purificación y el posterior pase a tubo de los aislados.

Las cepas así obtenidas se mantienen en tubos de ensayo en cuñas de los medios de cultivo indicados anteriormente para cada microorganismo y formando parte de la colección de BFN del INIFAT. El inóculo de *G. diazotrophicus* para conducir los experimentos se obtuvo a partir del crecimiento de la bacteria en medio SG (7) diseñado para la obtención de biomasa.

Los experimentos en melón (cv Tropical ch-2) en condiciones de *screening* en invernadero se realizaron

empleando bandejas plásticas 15 x 10 x 5 cm conteniendo suelo Ferralítico Rojo (8) esterilizado a 1.5 atmósferas durante dos horas; se depositaron 25 semillas por bandeja y el riego se realizó de forma manual. Los ensayos en campo (yuca, clones CMC-40, CEMSA-725 e INIFAT-2 y papa cv. Desirée) se condujeron empleando un diseño en Bloques al Azar con cuatro réplicas y un tamaño de parcela de 30 m<sup>2</sup>, todos sobre suelo Ferralítico Rojo (8) y entre los años 1999 y 2000.

Los tratamientos realizados consistieron en la inoculación (aspersión) al suelo y foliar en el caso de yuca, papa y melón, siempre con ayuda de una mochila fitosanitaria. La dosis aplicada de producto correspondió a 2 L.ha<sup>-1</sup> del biopreparado ACESTIM<sup>®</sup>, a base de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* con una concentración final de 3.2 x 10<sup>12</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. En el método de inhibición o inoculación sumergida de las estacas de yuca, se emplearon bandejas de 50 x 30 x 18 cm conteniendo el biopreparado diluido quince veces en agua común. Las atenciones culturales, en cada caso, fueron conducidas según las normas técnicas establecidas para cada cultivo.

Los datos obtenidos se evaluaron estadísticamente por Análisis de Varianza (unifactorial y bifactorial, según el caso) con prueba de Duncan y Newman Kleus, ambas al 5 % de significación. El procesamiento de toda la información se realizó mediante el programa STAT-ICTF.2 perteneciente al Departamento de Matemática Aplicada del INIFAT.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla I, se evidencia el efecto de la bacteria en cuanto a la estimulación de todos los indicadores del rendimiento agrícola de la yuca. Todos los clones respondieron por igual a la inoculación; sin embargo, en cuanto a los métodos de inoculación empleados, la aspersión foliar resultó la más efectiva, aunque la imbibición de las semillas (estacas) por 15 minutos en el biopreparado también muestra una marcada estimulación en relación con el control sin inocular.

El rendimiento agrícola muestra aumentos entre 20-54 %, lo que también se evidencia en sus indicadores más cercanos, como el número de tubérculos por planta (entre 11-43 %) y el diámetro de estos (entre 15-19 %). En este caso, un aspecto de gran importancia para la economía del cultivo lo constituye el comportamiento encontrado en las plantas controles, en cuanto a la afectación en la cantidad de tubérculos no comerciales dentro del volumen total de la cosecha.

Así, la inoculación con *Gluconacetobacter diazotrophicus* logra obtener entre un 5-9 % más de raíces tuberosas (correspondiente a entre 2-3.5 t) con la calidad requerida para su venta en los tres clones tratados, mientras que esta misma cantidad se pierde cuando no se aplica el microorganismo con la consiguiente pérdida de eficiencia y rentabilidad de la cosecha.

**Tabla I. Efecto de los métodos de inoculación de *G. diazotrophicus* sobre el cultivo de la yuca sembrada en suelo Ferralítico Rojo (Santiago de las Vegas, 1999)**

Clones	Método de inoculación	Rendimiento (t.ha <sup>-1</sup> )	Largo de la planta (m)	No de tubérculos/planta	Diámetro de tubérculo/planta (mm)	Raíces no comerciales (%)	Producción no comercial (ton.ha <sup>-1</sup> )
INIFAT-2	Testigo	30.50 C	2.40 C	8.55 C	40.82 C	35.5 A	3.45 A
	I. sumergido	33.25 B	2.45 B	8.98 B	42.25 B	20.90 B	2.20 B
	I. foliar	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. sumergido	45.50 B	2.66 B	6.91 B	69.80 B	15.10 B	1.73 B
	I. foliar	51.83 A	2.71 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. sumergido	32.06 B	1.69 B	6.90 B	49.50 B	20.38 B	1.80 B
	I. foliar	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
		3.60	1.9	4.8	3.4	7.8	12.4

Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí, según Anova y prueba de Duncan al 5 %. El conteo del número de tubérculos por calibre corresponde 5 pl/m<sup>2</sup>.

Este aspecto se puede considerar de interés para ser profundizado en estudios posteriores, no solo en yuca, sino en cultivos tuberosos en general (boniato, malanga, ñame y otras viandas), ya que significaría la recuperación de importantes volúmenes alimentarios esperados, teniendo en cuenta el potencial de rendimiento que ofrecen los clones comerciales de estas especies.

No existen informes en la literatura de efectos similares en viandas tropicales, excepto en boniato, donde un comportamiento similar ha sido encontrado en la estimulación de los tubérculos por parte de *G. diazotrophicus* (9, 10, 11), lo que se justifica por la producción de sustancias fisiológicamente activas por parte de la bacteria en el interior del tejido vegetal.

En papa, el incremento en el rendimiento arrojó un 34 % de aumento al aplicar *G. diazotrophicus*, con un 25 % más de diámetro en los bulbos cosechados provenientes de la inoculación. El resto de los parámetros fenológicos evaluados como la altura de la planta, el número de hojas y el diámetro del tallo muestran índices de 33, 39 y 40 % de aumentos, respectivamente (Tabla II).

**Tabla II. Respuesta de la papa cultivada sobre suelo Ferralítico Rojo a la inoculación con *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Santiago de las Vegas, 2000)**

Variantes	Altura de la planta (cm)	Número de hojas	Diámetro del tallo (mm)	Peso de los tubérculos (kg)	Diámetro de los tubérculos (cm)
Control	17.21 b	8.70 b	6.00 b	2.30 b	5.7 b
Inoculado	22.83 a	12.10 a	8.45 a	3.10 a	7.12 a
ESx	0.24	1.8	0.37	0.36	0.12
CV (%)	7.50	3.40	4.80	4.7	2.30

Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí, según prueba de Anova y Newman Kleus con P<5%

En otra campaña posterior, se comprobó el efecto de la bacteria, pero en este caso en condiciones de producción agrícola (Tabla III), comprobándose nuevamente el efecto beneficioso sobre el cultivo de la papa. Así, en relación con la calidad de los tubérculos cosechados, se observaron diferencias significativas en todos los calibres

muestreados con aumentos promedio entre 18-39 % y 26-42 % en el número y peso de frutos provenientes de plantas inoculadas, en comparación con plantas controles, manifestándose finalmente un incremento de 28 % correspondiente a más de 8 t.ha<sup>-1</sup> sobre el rendimiento agrícola.

Este efecto, además de contribuir directamente a la formación del rendimiento agrícola, también influye sobremanera en el establecimiento y la función de la bacteria en su interacción con el sistema planta.

En este sentido, al tratarse de un endófito, la estimulación de los diferentes órganos del vegetal tiende a producir un marcado efecto beneficioso en la asociación planta-microorganismo, ya que un aumento en la superficie foliar asimiladora y en los órganos de transporte de agua y nutrientes, generalmente se traduce en una mayor cantidad de fotosintatos en el sistema, que a su vez constituyen la reserva energética para la multiplicación y el normal funcionamiento como nitro fijador y estimulador del crecimiento de *G. diazotrophicus* como microsimbionte.

Por otra parte, el macrosimbionte (sistema planta), al recibir por parte del microorganismo los niveles sintetizados de amonio y fitoreguladores (auxinas, giberelinas y citoquininas), entre otras sustancias, desencadena el conjunto de mecanismos fisiológico-bioquímicos involucrados en la división celular y la estimulación del crecimiento vegetal.

Varios autores, en los últimos años, han dedicado sus esfuerzos a estudiar por diferentes vías el mejoramiento genético de plantas y microorganismos involucrados en asociaciones de este tipo, con el objetivo de lograr amplificar (fundamentalmente por transformación) las funciones de ambos en beneficio de la simbiosis (2, 5, 6), destacándose no solo los aspectos de nutrición vegetal, sino además de antibiosis y biocontrol. En este sentido, los resultados aquí obtenidos también cumplen con este principio de asociación y, por tanto, pueden ser objeto de programas de mejoramiento genético.

**Tabla III. Efecto de la aplicación del biopreparado ACESTIM® sobre el cultivo de la papa en condiciones de gran producción (Suelo Ferralítico Rojo compactado, Güira de Melena, campaña 2000-2001)**

Variante	Número y peso de tubérculos por calibre					Rendimiento total (t.ha <sup>-1</sup> )	
	<35mm peso (t.ha <sup>-1</sup> )	35-45mm peso (t.ha <sup>-1</sup> )	>45mm peso (t.ha <sup>-1</sup> )				
Control	4.3 b	3.60 b	8.11 b	8.86 b	7.7 b	18.67 b	31.13 b
Inoculada	5.99 a	5.14 a	12.22 a	10.90 a	9.1 a	23.69 a	39.73 b
ESx	0.62	0.17	0.13	0.24	1.42	0.395	0.70

El otro cultivo ensayado, este en condiciones de *screening*, igualmente muestra el efecto estimulador de *G. diazotrophicus*, aunque esta vez no se observan diferencias significativas en todos los parámetros del crecimiento evaluados en relación con el control. En la Tabla IV, se evidencia la respuesta del melón a la inoculación, observándose aumentos del orden de 41 % en la altura de la planta, 67 % en el largo del tallo y 68 % en biomasa.

El efecto de la bacteria sobre el resto de los indicadores no mostró diferencias significativas con respecto al testigo sin inocular; sin embargo, se puede evidenciar la presencia del aumento en el número, largo y ancho de las hojas, así como del diámetro del tallo al aplicar el microorganismo.

En relación con este comportamiento, a pesar de la no significación encontrada en los análisis estadísticos con respecto al control, sí se puede asumir que el efecto devenido de la inoculación en cada uno de estos influye sobre la estimulación expresada por el resto de los indicadores evaluados y, por consecuencia, en general sobre la planta.

En la literatura, no aparece información que relacione la interacción *G. diazotrophicus*-*Citrullus lanatus*; no obstante, estos ensayos deben ser extendidos a pruebas de campo, ya que las condiciones imperantes en los sistemas de bioensayo y/o *screening* generalmente limitan las potencialidades para el normal crecimiento y desarrollo de determinadas especies cultivables; más aún si tenemos en cuenta la arquitectura de especies del tipo rastreras, como es el caso del melón.

De forma general, se observa el efecto de *G. diazotrophicus* en cada uno de los cultivos ensayados, demostrándose el potencial que como bioestimulador ofrece para el mejoramiento de la producción vegetal. Es de señalar que no se discute el beneficio que pueda ser aportado por la nitrificación, debido a la ausencia de los análisis (Isótopo N<sub>15</sub>) requeridos para cuantificar la FBN, aunque dentro del efecto general encontrado, debe estar presente este componente en mayor o menor cuantía, ya que la diazotofijación representa una propiedad genéticamente estable y, a su vez, la función principal de este microorganismo.

Esta bacteria, por su etiología, está asociada a la caña de azúcar y se encuentra armónicamente distribuida por toda la planta (12, 13); de ahí, que en este trabajo se proponen los cultivos de melón, yuca y papa, ya que junto a las viandas tropicales y frutales, entre otros, constituyen las especies que promedian la mayor concentración de azúcares asimilables acumulada en sus diferentes órganos, lo que a su vez constituye una premisa importante para el normal establecimiento y función del microorganismo, sobre todo si se considera que *G. diazotrophicus* habita en óptimas condiciones en reservorios naturales que acumulan hasta más de un 20 % de azúcares. Así, en aislamientos realizados por nosotros, también se ha encontrado la bacteria en papaya, piña, remolacha y malanga.

Sin embargo, la limitante fundamental de su distribución en otras especies radica en las vías de penetración en el sistema planta; de hecho, solo se han descrito dos formas: la penetración estomática y la penetración mediada por hongos micorrizógenos arbusculares (2). Este fenómeno hace que de forma aislada, su potencialidad como biofertilizante y/o bioestimulador sea escasa, teniendo en cuenta el carácter comercial de su aplicación.

En este sentido, la bacteria está sujeta a la presencia o no de micorrizas (HMA) en el suelo, lo cual obstaculiza a que pueda formar parte de un bioproducto para uso general como agrobiológico, ya que el consumidor (productor) tendría que estar en función de si sus terrenos contienen el nivel adecuado de HMA que permitan una colonización potencial de *G. diazotrophicus*, análisis este que hasta hace un tiempo se consideraba costoso e inoperante, pero que ya en la actualidad, debido a la extensión en Cuba de las inoculaciones de diferentes cultivos económicos con HMA, pueden de hecho formar parte de una recomendación.

Además, mediante la aspersión foliar (penetración estomática), no se puede justificar, como es el caso de este trabajo, que la penetración se deba solo únicamente a la vía estomática, ya que aquí también se comprende la aspersión a la superficie del suelo que rodea la planta y, por ende, el efecto que las micorrizas puedan provocar en la colonización del microorganismo dentro del vegetal.

**Tabla IV. Comportamiento del melón (cv Tropical ch-2) frente a la inoculación con la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus***

Variantes	Altura planta (cm)	Largo tallo (cm)	Diámetro tallo (mm)	Número de hojas	Largo de las hojas (cm)	Ancho de las hojas	Biomasa
Control	9.35 b	4.55 b	2.04	3.50	2.32	2.66	2.65 b
Inoculado	13.22 a	7.63 a	2.44	4.13	2.97	2.85	4.45 a
ESx	1.88	0.82	N.S	N.S	N.S	N.S	0.28
CV (%)	3.29	24.67	N.S	N.S	N.S	N.S	12.23

Medias con letras comunes no difieren significativamente entre sí, según ANOVA y prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5 % de significación

No obstante, a pesar de estos impedimentos en cuanto a grandes superficies de cultivos, sí se puede considerar una asociación altamente beneficiosa en viveros, siempre y cuando se diseñe un inoculante mixto que contenga la bacteria unida a hongos micorrizógenos, considerando a estos últimos como vía de penetración.

Adicionalmente, un interés marcado pueden tener los análisis microbiológicos a realizar en explantes de cultivos provenientes del mejoramiento genético por cultivo *in vitro*, ya que la pérdida de la bacteria debe constituir un fenómeno común durante la manipulación del material vegetal autóctono, el cual sí puede contener el microorganismo, como por ejemplo la caña de azúcar, en donde se ha demostrado que su multiplicación es a través de la semilla agámica.

En relación con *Azospirillum* sp y *Herbaspirillum* sp., los aislados han sido conservados en la colección de BFN, ya que a pesar de su doble función (nitro fijación y estimulación del crecimiento), no presentan la misma atracción para su estudio en relación con su distribución que *G. diazotrophicus* dentro de la asociación planta-microorganismo, sino que están limitados a la zona endorrizosférica, aunque también constituyen bacterias beneficiosas que forman parte de biopreparados comerciales (14, 15).

Como conclusión, se demuestra la presencia de los microorganismos endófitos *G. diazotrophicus*, *Azospirillum* sp. y *Herbaspirillum* sp. asociados a los cultivos de malanga, yuca, boniato, maíz, papa y caña de azúcar. La aplicación foliar y al suelo de *G. diazotrophicus* sobre yuca, papa y melón mostró un efecto marcado, entre 40-60 %, sobre diferentes parámetros de crecimiento y desarrollo (altura de la planta, número y tamaño de las hojas, diámetro del tallo y biomasa, entre otros), así como en el rendimiento agrícola con aumentos promedio del orden del 25-54 %.

Se recomienda continuar los aislamientos de estos microorganismos en otras especies cultivables de importancia económica, con el objetivo de conocer su biodiversidad en los diferentes agroecosistemas y el consiguiente establecimiento de los aislados en la colección de BFN, así como proceder a las inoculaciones en especies que comprendan la fase de viveros o sistemas similares mediante el diseño de un inoculante comercial que comprenda el cultivo mixto de *G. diazotrophicus* y hongos micorrizógenos (HMA). Igualmente, se recomienda el análisis microbiológico de materiales manipulados por cultivo *in vitro* en estudios de mejoramiento genético, con la finalidad de recuperar la presencia y el normal restablecimiento del microorganismo en el sistema planta con la ayuda del biopreparado citado anteriormente.

## REFERENCIAS

- Lee, S.; Reth, A.; Meletzus, D.; Sevilla, M. y Kennedy, C. Characterization of a major cluster of nif, Fix, and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Bacteriology*, 2000, vol. 182, no. 24, p. 7088-7091.
- Riggs, P. J.; Chelius, M. K.; Iniguez, A. L.; Kaeppler, S. M. y Triplett, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. Contributed papers from the 8th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes, Sydney, NSW, Australia, 3-7 December 2000. *Australian Journal of Plant Physiology*, 2001, vol. 28, no. 9, p. 829-836.
- Mirabal, L. de los A.; Ortega, E.; Rodes, R.; Fernández, L. y Pérez, E. Another nitrogen-fixing microorganism in sugarcane stalks: *Bacillus brevis*. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 4, p. 9-12.
- Franke, I. H.; Fegan, M.; Hayward, C.; Leonard, G.; Sly, L. I. Molecular detection of *Gluconacetobacter sacchari* associated with the pink sugarcane mealybug *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell) and the sugarcane leaf sheath microenvironment by FISH and PCR. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, vol. 31, no. 1, p. 61-71.
- Shankaraiah, L.; Nagaraju, H.; Gururaj-Hunsigi, J. y Hunsigi, G. Field evaluation of some promising associative nitrogen fixing bio-agents under graded levels of nitrogen for yield and quality of jaggery. *Cooperative-Sugar*, 2001, vol. 33, no. 1, p. 39-43.
- Shankaraiah, C. y Nagaraju, M. S. Effect of associative nitrogen-fixing bioagents on nitrogen nutrition of sugarcane and environmental quality. En: Proceedings of the Annual Convention of the Sugar Technologist- Association of India, Jaipur (63:2001 aug. 22-27:Jaipur). p. 77-87.
- Cavalcante, V. A. y Döbereiner, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 1988, vol. 108, p. 23-31.
- Cuba. Minagri. Instituto de Suelos. Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Agrofinfo: LaHabana, 2000, 64 p.
- James, E. K.; Olivares, F. L.; Oliveira, A. L. M. de; Reis, F. B. Jr.; Silva, L. G. da; Reis, V. M.; Oliveira, A. L. M. de; dos Reis, F. B. Jr.; da-Silva, L. G. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Experimental Botany*, 2001, vol. 52, no. 357, p. 747-760.
- Mowade, S.; Bhattacharyya, P. y Mowwade, S. Resistance of P-solubilizing *Acetobacter diazotrophicus* to antibiotics. *Current-Science*, 2000, vol. 79, no. 11, p. 1591-1594.
- Tapia-Hernandez, A.; Bustillos-Cristales, M. R.; Jiménez-Salgado, T.; Caballero-Mellado, J. y Fuentes-Ramírez, L. E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial-Ecology*, 2000, vol. 39, no. 1, p. 49-55.
- Muthukumarasamy, R.; Rebatí, G. y Lakshminarasimhan, C. Diazotrophic associations in sugar cane cultivation in South India. *Tropical-Agriculture*, 1999, vol. 76, no. 3, p. 171-178.
- Lee, S.; Sevilla, M.; Meletzus, D.; Texeira, K.; Baldani, I.; Kennedy, C.; Martínez, E. y Hernández, G. (ed). Analysis of nitrogen fixation and regulatory genes in the sugarcane endophyte *Acetobacter diazotrophicus*. En: Proceedings of the Sixteenth North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation (16:1999 feb. 1-6: Cancun). p. 215-218.
- Gonzalez, M. S. y Barranquio, W. L. Isolation and characterization of *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis) in *Saccharum officinarum* L., *S. spontaneum* L. and *Erianthus* sp. *Philippine-Agricultural-Scientist*, 2000, vol. 83, no. 2, p. 173-181.
- Reis, V. M.; Paula, M. A. de y Döbereiner, J. Occurrence of arbuscular mycorrhizae and bacterium *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 1999, vol. 34, no. 10, p. 1933-1941.

Recibido: 28 de febrero de 2003

Aceptado: 16 de diciembre de 2003