

SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVA DE LAS RELACIONES ENDÓFITAS PLANTA-BACTERIA. ESTUDIO DE CASO *Gluconacetobacter diazotrophicus*-CULTIVOS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA

B. Dibut[✉], R. Martínez-Viera, Marisel Ortega, Yoania Ríos, Grisel Tejeda, Liuba Planas y Janet Rodríguez

ABSTRACT. In recent years, the study of endophytic plant-microorganism associations has grown special interest, emphasizing on the introduction of good agrobiological results into agricultural practice. This work shows an outlook of the current and prospect situation of these associations mostly illustrated by *Rhizobium*-cereal, *Azorhizobium*-rice, *Azospirillum* and *Herbaspirillum* interactions, as well as cereals and *Gluconacetobacter diazotrophicus* with different crops. There is a microbial rotation process with *Rhizobium* bacteria at different cyclical association phases of the agroecosystem (legume, nodule-soil-grass-soil-legume) in relation to productivity physiology and yield. Concerning the study with *G. diazotrophicus*, on certain tropical vegetable and fruit determinations under Cuban conditions, a cell concentration of 4.2×10^5 per gram of fresh tissue was recorded in inoculated plants whereas 2.7×10^2 cells per gram of fresh tissue in non-inoculated ones (control); therefore, it is necessary to increase bacterial concentration, both under experimental and field conditions, to obtain an adequate answer of agrobiological effect on the above mentioned species. The answer of casaba, dasheen and papaya to inoculation constitutes a first world report. There was a great economic impact of inoculation with a higher benefit/cost ratio than 40:1; thus, it is an extremely attractive biotechnology to be introduced into the current agrobiological market. Besides, the result has a scientific, technological, environmental and social impact.

Key words: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, endophytes, bacteria, agrobacterium, food crops

RESUMEN. En los últimos años, ha ganado especial interés el estudio de las asociaciones endofíticas planta-microorganismos, con énfasis en la introducción en la práctica agrícola de los buenos resultados que se han obtenido en la agrobiología. En este trabajo se ofrece una panorámica de la situación actual y perspectiva de estas asociaciones ilustradas en gran medida por las interacciones *Rhizobium*-cereales, *Azorhizobium*-arroz, *Azospirillum* y *Herbaspirillum*, al igual que cereales y *Gluconacetobacter diazotrophicus* con diferentes cultivos. Se plantea un proceso de rotación microbiana que manifiesta la bacteria *Rhizobium* en las diferentes fases de asociación cíclica en el agroecosistema (leguminosa, nódulo-suelo-gramínea-suelo-leguminosa) en función de la fisiología de la productividad y el rendimiento. En el estudio con *G. diazotrophicus*, en las determinaciones realizadas en viandas tropicales y frutales en las condiciones de Cuba, se encontró una concentración de células de 4.2×10^5 por gramo de tejido fresco en las plantas bacterizadas y 2.7×10^2 células por gramo de tejido fresco para las hojas de plantas controles (sin bacterizar); por eso, es necesario aumentar la concentración bacteriana, tanto en las condiciones experimentales como de extensión, para obtener una respuesta favorable del efecto agrobiológico sobre las especies antes relacionadas. La respuesta a la inoculación encontrada para yuca, malanga y papaya constituyen un primer informe mundial. El impacto económico como consecuencia de la inoculación es elevado, con una relación beneficio/costo superior a 40:1, por lo que resulta una biotecnología sumamente atractiva para ser introducida en el mercado actual de agrobiológicos. Igualmente, el resultado presenta impacto científico, tecnológico, ambiental y social.

Palabras clave: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, endofitas, bacteria, agrobacterium, cultivos alimenticios

Dr.C. B. Dibut y Dr.C. R. Martínez-Viera, Investigadores Titulares; Marisel Ortega, Investigadora; Ms.C. Yoania Ríos, Ms.C. Liuba Planas y Janet Rodríguez, Investigadoras Agregadas y Ms.C. Grisel Tejeda, Investigadora Auxiliar del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), calle 2 esquina a 1, Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba.

✉ bdibut@inifat.co.cu

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos endófitos comprenden a hongos y bacterias, que viven sin causar daño en el interior de las células y los tejidos de plantas superiores durante una parte considerable de su ciclo de vida, y pueden habitar en espacios intracelulares, intercelulares o en el tejido vascular.

Existe una extensa diversidad de endófitos, pero los que se han estudiado con mayor frecuencia pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Entero-bacter*, *Bacillus*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Herbaspirillum*, *Erwinia* y *Xantomonas* (1, 2, 3, 4).

En años recientes, se ha demostrado las notables ventajas de la asociación *Rhizobium*-cereales, con avances importantes en la estimulación del crecimiento de plantas y las ganancias en nutrientes por vía de mayor extracción a partir del suelo (5).

Así, se conoce que el 60-70 % del área de 500 000 ha en las orillas del Nilo se benefician mediante esta interacción en la rotación arroz-*Trifolium alexandrinum*, L.

Otros estudios se han encaminado a la explicación de los mecanismos de asociación *Rhizobium*-plantas. Datos recientes han puesto de manifiesto que, tanto en el arroz como el trigo, esta asociación comienza por las células epidérmicas de las raíces, a lo que sigue una migración ascendente hacia la base del tallo y las hojas, donde desarrollan altas densidades de población, que permanecen activas durante períodos relativamente largos (6).

Desde el punto de vista agrobiológico, se han realizado múltiples experimentos en condiciones de campo, con la aplicación de inoculantes de este tipo en polvo y reduciendo las dosis de fertilizante nitrogenado en cantidades significativas. Estos ensayos muestran avances satisfactorios con aumento en los rendimientos entre 18-30 % en el arroz y 16-30 % en el trigo (7).

Igualmente, se ha comprobado la presencia de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* en la rotación arroz-leguminosa en sistemas irrigados y secano favorecido (5). La asociación *Azorhizobium*-arroz ha arrojado muy buenos resultados, demostrándose la ubicación de la bacteria en las células epidérmicas intercelulares.

La asociación *Gluconacetobacter diazotrophicus*, en interacción con especies cultivables de importancia económica, ha alcanzado en los últimos años un gran desarrollo en los estudios fundamentales y orientados (8, 9, 10, 11). En este caso, la bacteria se ha aislado de los cultivos de piña (*Ananas comosus*, L. Merr), calabaza (*Cucurbita moschata*, Duch y Poir), maíz (*Zea mays*, L.), hierba elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.), papaya (*Carica papaya*, L.), remolacha (*Beta vulgaris*, L.) y zanahoria (*Daucus carota*, D.C.), entre otros (12, 13, 14).

En este trabajo se ofrece una panorámica sobre la situación actual y las perspectivas a seguir de la asociación de estos microorganismos endófitos con plantas de interés económico, incluida una propuesta de asociación de *Rhizobium* sp. en rotación con especies de gramíneas y leguminosas; así como los principales resultados de aplicar *G. diazotrophicus* como bioestimulador del crecimiento y rendimiento vegetal sobre el cultivo de viandas tropicales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios se desarrollaron del 2002 al 2006, en áreas agrícolas del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), cultivando la variedad de papaya MARADOL roja y diferentes clones de viandas tropicales (yuca: CMC40, malanga: Camerum-14 y boniato: INIVIT B-88) sobre suelo Ferralítico Rojo (15). Se empleó un diseño de Bloques al Azar en todos los casos con un tamaño de parcela de 75 m² y cinco réplicas por cada variante experimental (experimento 1 para el caso de las viandas), así como una distancia de siembra de 4x1.5x1.5 en el caso de la papaya (experimento 2), con fecha de plantación de las posturas entre el 5 y 11 de febrero en ambas campañas.

Las dos variantes experimentales consistieron en el tratamiento inoculado: aspersión foliar y al ruedo de la planta en papaya, y foliar y al suelo en viandas, y el tratamiento control sin inocular. Todas las atenciones agrotécnicas a las plantaciones (viandas tropicales y papaya) en los experimentos se realizaron según lo recomendado en los instructivos técnicos respectivos (13, 14). Cada ensayo se repitió al menos dos veces.

Las mediciones de los parámetros de crecimiento y desarrollo sobre las plantas se tomaron, para el caso de las posturas de papaya, a un total de 100 plántulas (fase de vivero) y, para las plantas adultas, a un total de 25 plantas por tratamiento; en las viandas se midieron 25 plantas por cada tratamiento. El rendimiento agrícola se evaluó por planta, así como el total de cada parcela experimental, evaluando además el largo, peso y diámetro promedio de las raíces, los tubérculos y frutos de papaya.

La bacteria *G. diazotrophicus* cepa INIFAT Abn-1, creció en medio SG (16), diseñado para la obtención de biomasa y con ayuda de un fermentador del tipo BIOLAFITTE de 5 L de capacidad, regulado a 32°C de temperatura, 250 rpm de agitación, 1.0 vvm de aireación y pH libre; todos los parámetros registrados a partir de un módulo electrónico acoplado al fermentador.

El proceso fermentativo tuvo una duración de 21 horas y se alcanzó una población o concentración celular final de 3.5 x 10¹² UFC.mL⁻¹ del inóculo. El biopreparado se aplicó en el momento de la siembra de las plantas a razón de 2 L.ha⁻¹ con ayuda de una máquina fumigadora regulada a tres atmósferas de presión. La aspersión se realizó de forma foliar y al suelo. Las plántulas de papaya habían sido tratadas anteriormente en el vivero, por aspersión de una suspensión de 1/100 de la bacteria en agua común con ayuda de una mochila fitosanitaria.

En la Tabla I se relacionan los análisis de suelo correspondientes a los lotes donde se realizaron los respectivos ensayos.

Una segunda aplicación sobre papaya en campo, a la misma dosis, se realizó al inicio de la floración de las plantas, pero en esta ocasión con ayuda de una motomochila, tratando en todo momento de asperjar toda la planta (ciclón) y la zona del suelo que la rodea (ruedo).

Tabla I. Características químicas del suelo utilizado en los ensayos

Experi- mentos	MO (%)	N total (ppm)	pH (H ₂ O)	P ₂ O ₅ (mg/100 g)	K ₂ O	Ca (cmol.kg ⁻¹)	Mg
1	3.25	59	7.3	51	64	9.1	3.7
2	3.09	57	7.2	49	61	8.7	3.5

La cuantificación del endófito se realizó en la hoja más desarrollada de cada planta a los 130 días de edad; a partir de este material (fresco), se obtuvo un extracto acuoso con agua destilada estéril mediante su maceración con mortero esmerilado también estéril. Con una alícuota de este extracto se realizaron las diferentes diluciones, para su posterior conteo en placas conteniendo medio LGI-P (7-25).

Los datos experimentales se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de varianza para Bloques al Azar con cinco réplicas, previa comprobación de la normalidad de las variables y transformándolas por raíz de x y logaritmo de x , según el caso. Los promedios de los tratamientos se compararon con una prueba de Student Newman-Keuls (SNK), considerando el 5 % como nivel de significación. El procesamiento de toda la información se realizó mediante el programa STAT. ICTF 4.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- ✱ Estado actual de las investigaciones sobre los microorganismos endófitos y su asociación con plantas cultivables

Los estudios realizados con proteína verde fluorescente (gfp) en variedades de arroz colonizadas por *Rhizobium* indican que la bacteria coloniza totalmente las raíces.

Igualmente, en la asociación *Azorhizobium caulinodans* se ha demostrado la colonización de raíces por la bacteria, cuando los cultivos se suplementan con flavonoides. Por otra parte, en la interacción endófito planta-bacteria, se ha demostrado una mayor capacidad de invasión de las células corticales de raíces, en relación con las asociaciones no endófitas. Esta tendencia se ha comprobado al comparar los conteos de células viables en placas contra microscopía directa con bacterias marcadas con *gfp* y se ha observado una fuerte actividad de colonización que disminuye a partir de que la planta alcanza la senescencia (17).

Un resultado similar también se demostró escaneando imágenes de microscopía electrónica asistida a través de software (CMEIAS, Centro de Sistemas de Análisis de Imágenes para Ecología Microbiana), en raíces inoculadas con un biofertilizante a base de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* en trébol (18, 19).

Se han realizado estudios bioquímicos con *Rhizobium* en asociación con avena y arroz, en cuanto a la capacidad de absorción y penetración de la bacteria como endófito en los tejidos (pared celular) de las raíces de estas plantas. En este sentido, se han cuantificado por electroforesis concentraciones adecuadas del complejo CMC asa (18, 20).

Igualmente, se ha demostrado en cultivos no genotípicos de diferentes variedades de arroz, que la colonización por *Rhizobium* promueve el crecimiento de tallos y raíces de forma diferencial, o sea, una respuesta positiva, neutral y algunos negativos, comprobándose generalmente un alto nivel de especificidad cepa-variedad (21).

La actividad de promoción del crecimiento observada se manifiesta, fundamentalmente, por una mayor capacidad germinativa, seguida del incremento en la longitud de la raíz, altura del tallo, área foliar, contenido de clorofila, capacidad fotosintética, volumen radical y biomasa. Resultados similares se obtuvieron en trigo (3).

Se ha experimentado en la obtención de inoculantes a base de estas cepas endófitas, con el objetivo de reducir dosis de fertilizante nitrogenado (entre 85 y 150 kg N.ha⁻¹) e incrementar el rendimiento agrícola en campos cultivados de cereales, fundamentalmente de arroz y trigo (21).

En Egipto, a partir de estos datos se han diseñado diferentes métodos de bioensayo (*plant growth promotion*, *PGPR*) para un sistema de selección de cepas efectivas de *Rhizobium*; de hecho, se han obtenido los primeros avances en extensiones de inoculantes a base de la bacteria, en rotación de cereales-leguminosas en fincas de campesinos y empresas privadas alrededor de las áreas del Nilo.

Estas pruebas realizadas en 24 localidades, con diferentes niveles de fertilizante nitrogenado (25, 75 y 100 %) en áreas previamente no inoculadas, mostraron la eficiencia de diferentes cepas (cuatro) en arroz y trigo, lográndose registrar aumentos entre 3-4 t.ha⁻¹ en comparación con 1.0-1.5 t.ha⁻¹ cuando no se biofertilizó. Los biofertilizantes en forma sólida se emplearon a razón de 720 g.ha⁻¹ con un nivel de eficiencia de 85 % en arroz y 91 % en trigo.

En Wisconsin, EUA, se ha demostrado con experimentos en condiciones de campo la efectividad del *Rhizobium* (recomendado para arroz) en el cultivo del maíz. La inoculación promedió aumentos significativos en el peso seco de las plantas en siete genotipos de maíz (21). Se ha comprobado una alta respuesta del genotipo de maíz a la asociación con cepas de *Rhizobium*; por tanto, es necesario identificar los genes en las plantas que expresan o intervienen en la respuesta al endófito.

Igualmente, se ha comprobado que una de las cepas de *Rhizobium* efectivas en arroz es capaz de promover el crecimiento de tallos, raíces, biomasa y toma de nitrógeno y calcio, para ciertas variedades de algodón en condiciones de casa de cultivo (21).

Se ha comprobado que las cepas de *Rhizobium* con arroz (variedades específicas) han colonizado también otras variedades (Sinandomeng, PSBRC-74, PSBRC58 y PSBRC18), encontrándose tanto en la superficie de la raíz como en el área que rodea a las raíces. En este caso, se alcanzaron niveles (UFC/g.raíz) entre 1.50x10⁷ y 1.03x10⁹. La cepa E11 proviene de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y BSS 202 a partir de *Saccharum spontanium* (21).

Al inocular *Azospirillum brasilense* en arroz, se ha encontrado una respuesta similar en cuanto a la estimulación del crecimiento vegetal, incluso en la absorción de nutrientes (Fe, Cu, B y Mn).

Por otra parte, al aplicar *Rhizobium* a este cereal, se ha incrementado entre 22 y 50 % el contenido de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Na, Zn y Mo), lo que le confiere un mayor valor nutricional a la alimentación, o sea, un valor agregado que repercute en la dieta humana, como es el caso del zinc, que influye marcadamente en la maduración de los órganos reproductores y el desarrollo del feto en la mujer (21).

Además, al analizar la composición de proteínas con SDS-PAGE y RP-HPLC, en la variedad de arroz G17a177 cultivado en campo e inoculado con el endófito cepa E11 de *Rhizobium*, ellos indican que no hubo diferencias en los rangos de mayor contenido de proteínas, particularmente glutelina, globulinas y albúmina; sin embargo, se ha comprobado un aumento significativo en el nitrógeno total del grano por hectárea de cultivo en forma de proteína, y por ende un mayor valor nutricional.

Estudios realizados en los últimos años sugieren que *Rhizobium* (cepa E11) produce AIA (triptofano dependiente) en cultivos puros y en cultivos nognotobióticos de arroz. Así, se ha diseñado un medio de cultivo para optimizar la producción de AIA con esta cepa (21) y, de hecho, se ha comprobado la posibilidad de estimular el volumen radical.

En esta dirección, empleando espectrometría de masa y cromatografía gaseosa de ionización de llama, el análisis de fracciones sobrenadantes de cultivo de la cepa E11 indica la presencia de AIA y giberelina (correspondiente a GA7) (21).

Los suelos del río Nilo se utilizan para cultivar arroz con concentraciones superiores a 1 000 ppm de fósforo no asimilable y se ha comprobado que el aniego no permite más de 8 ppm de fósforo disponible para el cultivo; por tanto, ha sido necesario estudiar la mayor diversidad de cepas de *Rhizobium* con actividad solubilizadora, que además promueven el crecimiento vegetal.

Así, en ensayos *in vitro* se ha comprobado la actividad solubilizadora de varias cepas, tanto para fósforo inorgánico (fosfato de calcio) como orgánico (hexafosfato de inositol) (21). El mecanismo que se conoce es a través de la acidificación extracelular y producción de enzima fosfatasa.

En general, se ha comprobado que las ganancias de nitrógeno en biomasa y granos de arroz, al ser inoculadas con cepas seleccionadas de *Rhizobium*, provienen de la absorción del nitrógeno mineral del suelo y no de la FBN, lo que ha sido comprobado por ARA y ^{15}N en condiciones de invernadero y campo (21).

Finalmente, todo parece indicar que *Rhizobium* posee un nicho ecológico adicional, capaz de involucrar tres componentes en el ciclo de vida: I fase heterotrófica de vida libre, II fase endosimbiótica donde se realiza la FBN en los nódulos de leguminosas y III fase benéfica de estimulación del crecimiento, mediante endocolonización

con raíces de cereales en la propia rotación de cultivos (18, 21). En este sentido, se puede plantear que ocurre una rotación (no sucesión) microbiana en función de la fisiología de la productividad en la rotación de los cultivos, lo cual promueve el efecto beneficioso esperado en la formación del rendimiento agrícola del sistema leguminosa-cereal-leguminosa.

Estos avances indican la factibilidad de buscar nuevas asociaciones *Rhizobium* leguminosa-cereal, con el objetivo de desarrollar biofertilizantes con capacidad de incrementar la producción de cereales, a través del consumo de menor cantidad de fertilizante nitrogenado y el consiguiente beneficio económico, ambiental y social, lo cual puede lograrse a través del concepto de promover la cooperación entre instituciones de investigación científica gubernamentales y el sector privado, éste último representado por campesinos y la industria biotecnológica agrícola.

● Perspectivas del estudio y aplicación de endófitos en sistemas agrícolas

En estos momentos, en el mundo se avanza en los estudios agrobiológicos de la asociación *Rhizobium*-cereales y otras asociaciones (*Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*), obteniéndose notables resultados en la estimulación del crecimiento; así como en la posibilidad de disminuir cantidades significativas de nitrógeno con ventajas ecológicas, por constituir estos biopreparados insumos biotecnológicos de residualidad baja o prácticamente nula.

En el caso de Cuba, se han obtenido muy buenos resultados con el aislamiento y la aplicación como estimulador del crecimiento (modalidad de experimentación y extensión agrícola) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos con alto contenido de azúcares (papa, calabaza, viandas tropicales, frutales, rosa amarilla y rojas), a diferencia de otros resultados del mundo, en los cuales la respuesta agrobiológica encontrada se centra en experimentos y pequeñas parcelas de suelo (6).

Se recomienda realizar estudios futuros sobre nutrición con este y otros microorganismos asociados (grandes perspectivas en hongos micorrizógenos arbusculares), en función de poder cuantificar las ganancias en nitrógeno (con esta bacteria y otros microorganismos fijadores, método isotópico de ^{15}N) y fósforo (solubilizadores, cuantificación del ^{32}P), con el fin de poder reducir la dosis de ambos elementos en las cartas agrotécnicas de los cultivos para diferentes sistemas de producción agrícola (nutrición mineral, orgánica, bioorgánica y biorganomineral).

En este sentido y teniendo en cuenta el germoplasma que hoy se cultiva y comercializa por las empresas productoras de semilla, el predominio de los sistemas de producción actuales no se ajusta a un modelo de producción netamente orgánico, ya que la base genética de estos materiales proviene de la incorporación de genes predominantes bajo el esquema de la revolución verde, por lo que los genetistas, agrónomos, microbiólogos, fitopatólogos, fisiólogos y economistas

deben estudiar la obtención de materiales adaptados a bajos insumos nutricionales (macro y microelementos) y, al mismo tiempo, combinar estos estudios con el manejo bioorgánico de sustratos, incluido el suelo, con la finalidad de mantener un nivel aceptable de rendimiento (capaz de asegurar un nivel elemental de volumen alimentario por habitante en el planeta) y la calidad del ambiente.

En cuanto a la bioindustria, se debe prestar gran atención al diseño y la obtención de biopreparados basados en profundos estudios de investigación fundamental y fundamental-orientada, con adecuadas formas terminadas, capaces de poderse aplicar a dosis no alarmantes, desde el punto de vista del desequilibrio ecológico del agroecosistema, que puede ser provocado por la incorporación al suelo de elevadas concentraciones de biomasa bacteriana.

Datos recientes en la literatura técnico-comercial indican la introducción y aplicación de un gran número de biopreparados, con elevadas concentraciones y diversidad microbiana.

Esta situación puede en pocos años alterar el equilibrio ecológico, más aún si se tiene en cuenta la aplicación conjunta de otros biopreparados microbianos con igual situación, como es el caso de los biopesticidas, mejoradores de suelo, bioestimuladores, por lo que conduciría a una etapa similar a lo sucedido bajo el esquema de la Revolución Verde. Así, se estaría en presencia de un evento de biologización desequilibrada del ecosistema, es decir, una aplicación no planificada o indiscriminada de productos biológicos, sin tener en cuenta la relación bioproducto-función-residualidad, en base a la naturaleza y las riquezas garantizadas del producto, dosis y número de aplicaciones mínimas recomendadas, para obtener el efecto agrobiológico y medioambiental deseado.

A pesar de que esto no está legislado actualmente, ya ha sido el llamado de atención de algunos ecólogos microbianos y otros especialistas, que han incidido de una forma u otra en las corporaciones, pequeñas y me-

dianas empresas, respecto a la regulación de la aplicación indiscriminada de biopreparados de este tipo, o sea, biofertilizantes y bioestimuladores (6).

En relación con los biopesticidas la situación es algo diferente, ya que existen regulaciones para su licencia de introducción de tipo más rigurosa, así como las pruebas ecotoxicológicas que se exigen para tal efecto, pero no se ha establecido un sistema que regule su aplicación, como ya existía en los últimos años de la Revolución Verde para los pesticidas.

● Resultados en Cuba con la aplicación del endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica

Los estudios con el endófito comenzaron en Cuba a finales de los 90, con el aislamiento de la bacteria a partir de fracciones de diferentes órganos de la planta de varios cultivos de interés y posterior establecimiento de la colección del microorganismo. En otras investigaciones, en la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana, igualmente se han concretado importantes resultados de carácter fundamental, aunque no se han obtenido aún resultados aplicados a la agricultura (8, 9, 10).

Así se han obtenido varios aislados, que después de rigurosas pruebas de selección (6, 7) han arrojado importantes resultados, al aplicar la bacteria como base del biopreparado ACESTIM en base a la cepa Abn1 (Tabla II).

Como se observa en dicha tabla, fue notable el efecto de la bacteria sobre los indicadores evaluados en el cultivo del boniato, con una importante actividad estimuladora que pudo ser producto de la biosíntesis de ácido indolacético (AIA) y/o citoquininas (15, 22, 23, 24).

La tabla muestra el efecto de la inoculación foliar y al suelo del microorganismo sobre el cultivo del boniato, en dos años de experimentación sobre áreas del INIFAT. En ambas campañas de siembra, el biopreparado logró incrementar el largo de las plantas (33-34 %), número de hojas (31-62 %), diámetro del tallo (38-40 %) y diámetro del tubérculo (34-45 %), en relación con las plantas controles.

Tabla II. Respuesta del cultivo del boniato a la inoculación con *G. diazotrophicus*, cepa INIFAT Abn1, en Santiago de las Vegas

Variantes	Largo de la planta (cm)	No. de hojas	Diámetro tallo (mm)	Diámetro del tubérculo (cm)	Rendimiento (t.ha ⁻¹)
Campaña 2003					
Control	21.35 b	9.56 b	3.59 b	5.10 b	27.81 b
Inoculado	27.59 a	12.57 a	4.83 a	7.46 a	41.75 a
Esx	0.34	1.8	0.21	0.11	0.72
CV (%)	7.58	3.35	3.20	2.27	11.03
Campaña 2004					
Control	23.48 b	8.70 b	3.51 b	6.01 b	29.32 b
Inoculado	31.10 a	13.15 a	4.90 a	8.16 a	43.96 a
Esx	0.10	1.6	0.30	0.17	0.60
CV (%)	6.40	4.00	4.15	3.29	15.10

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

El rendimiento agrícola se incrementó en 51 y 48 % para el 2003 y 2004, respectivamente. En el caso de este indicador, se manifiesta un mayor índice de aumento en comparación con la etapa experimental, fenómeno que ocurre normalmente.

En otros cultivos, igualmente se han logrado buenos resultados al aplicar el microorganismo. Por ejemplo, en malanga y yuca se obtienen efectos altamente beneficiosos, en cuanto a la estimulación de indicadores del crecimiento y desarrollo de las plantas y el rendimiento agrícola (Tabla III).

Tabla III. Efecto del ACESTIM en el cultivo de la malanga cultivada sobre suelo Ferralítico Rojo (clón México 1) 2002-2003, Güira de Melena

Variante	Diámetro del tubérculo (cm)	Largo del tubérculo (cm)	Rendimiento (t.ha ⁻¹)
Testigo	3.89 b	6.75 b	28.95 b
Inoculado	6.15 a	13.10 a	40.70 a
Esx	0.96	0.617	1.04
CV (%)	67.06	20.21	11.15

Estos resultados también constituyen un primer informe en relación con el efecto del endófito sobre la malanga. Aunque no se muestran datos del crecimiento y desarrollo en etapas intermedias del cultivo, es necesario señalar que en todo momento el desarrollo de las plantaciones inoculadas fue superior al de las plantaciones testigos.

Un indicador de mucho interés, por parte de los productores al extender estos resultados a condiciones de producción, fue el cierre de las plantaciones en un tiempo menor (5-8 días antes), lo que contribuyó sobremedida a un menor enyerbamiento, que en el caso de este cultivo resulta importante, ya que la mayoría de las labores de limpia se realizan de forma manual.

En la campaña 2003-2004, se obtuvieron resultados con la misma tendencia, al aplicar las plantaciones de malanga (clón Camerún 14) con *G. diazotrophicus*, lográndose incrementar el rendimiento agrícola en 38 % y obteniéndose tubérculos de mayor calidad comercial (datos no mostrados).

Cuando se aplicó el biopreparado sobre plantaciones de yuca, la altura de las plantas aumentó en un 36 % y el diámetro de la raíz en un 58 %, a diferencia del número de ramas y diámetro del tallo, que promediaron más del doble al comparar las plantas inoculadas y los testigos en un total de 7.45 ha de prueba (Tabla IV).

El rendimiento en raíces aumentó 14 t.ha⁻¹, como consecuencia de la bacterización, lo que representa un 45 % de incremento en relación con las plantaciones de yuca que no fueron tratadas con el microorganismo.

En la campaña 2005-2006, la producción en raíces promedió un 33 % de aumento al aplicar el biopreparado, con incrementos entre 21 y 57 % para los diferentes

indicadores de crecimiento y desarrollo de las plantas; en este caso, un dato de mucho interés resultó ser el número de raíces con calidad comercial, el cual promedió un 87 % cuando se bacterizó, en relación con las plantaciones controles (sin actividad de la bacteria), donde se logró medir un 71 % de este indicador.

Tabla IV. Incidencia de la bacterización sobre las plantaciones de yuca en la localidad de Santiago de Las Vegas, campaña 2004-2005

Variantes	Altura (m)	No de ramas primarias	Diámetro tallo (cm)	Diámetro raíz (cm)	Rendimiento (t.ha ⁻¹)
Control	1.94 b	2.56 b	2.69 b	3.90 b	40.41 b
Inoculado	2.60 a	5.70 a	5.44 a	6.23 a	54.06 a
Esx	0.313	0.72	0.20	0.35	1.04
CV (%)	5.07	3.64	2.70	3.03	10.8

En papaya se han obtenido excelentes resultados, al bacterizar con *G. diazotrophicus*, lo cual constituye un primer informe al igual que en el caso de los cultivos de yuca y malanga.

En la Tabla V se muestra la respuesta de las plantas a la inoculación en el momento de la cosecha. El rendimiento se incrementó en un 38 %, con la obtención de más de 10 kg por planta tratada, en relación con las plantas controles sin tratar. La calidad de los frutos se mostró mayor al aplicar la bacteria, con aumentos de 12, 17 y 25 % en cuanto al largo, diámetro y peso, en comparación con los frutos provenientes de las plantaciones no inoculadas.

Estos resultados no pueden compararse con otros de la literatura para este cultivo u otro frutal, ya que no se han encontrado estudios al respecto; sin embargo, se corresponden con los encontrados en otras especies cultivables, como la yuca, el boniato y la papa en las condiciones de Cuba (3) y en boniato y maíz en Brasil y Estados Unidos (1, 11, 25).

En otra campaña de experimentación posterior, esta vez evaluando solo el rendimiento agrícola, se pudo comprobar nuevamente el efecto de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre la cosecha de plantaciones de papaya (Tabla VI).

Al respecto, es de interés destacar que aunque no se muestran los datos del crecimiento y desarrollo de las plantas durante el ciclo del cultivo, así como el efecto de la bacteria sobre las plántulas en el vivero, en todo momento se pudo comprobar la superioridad demostrada por las plantas bacterizadas en relación con las que no recibieron la bacteria vía inoculación.

Al efectuarse el conteo de la población bacteriana en las hojas durante esta campaña, se encontró un número de 2.5x10⁶ células por gramo de tejido procedente de plantas inoculadas, en comparación con 3.1x10² células por gramo de tejido fresco proveniente de hojas de plantas controles sin inocular. Este comportamiento resulta similar el encontrado en la campaña anterior, en cuanto a la distribución del microorganismo en el sistema planta.

Tabla V. Comportamiento de plantaciones de papaya en cosecha al ser tratadas con *G. diazotrophicus*, campaña 2004-2005

Variante	Largo/fruto (cm)	Diámetro/fruto (cm)	Peso/fruto (kg)	Rendimiento (kg.pl ⁻¹)	Rendimiento (t.ha ⁻¹)
Testigo	20.67 b	10.85 b	1.52 b	29.11 b	64.71 b
Inoculado	23.20 a	12.71 a	1.90 a	40.23 a	89.53 a
Esx	0.901	0.424	0.82	0.547	0.60
CV (%)	15.28	13.36	19.14	11.39	13.24

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

Tabla VI. Efecto de *G. diazotrophicus* sobre el rendimiento de plantaciones de papaya, campaña 2005-2006

Variante	Largo/fruto (cm)	Diámetro/fruto (cm)	Peso/fruto (kg)	Rendimiento (kg.pl ⁻¹)	Rendimiento (t.ha ⁻¹)
Testigo	21.18 b	11.03 b	1.63 b	32.25 b	71.59 b
Inoculado	24.30 a	14.12 a	2.14 a	46.10 a	98.24 a
Esx	0.83	0.61	0.90	0.63	0.84
CV (%)	11.40	9.30	13.61	14.25	12.58

En relación con el rendimiento agrícola y la calidad de los frutos de cosecha, los resultados durante la campaña 2005-2006 se muestran superiores a los registrados durante la campaña anterior. Este comportamiento puede deberse a las condiciones que imperaron en cada caso; por ejemplo, el nivel de precipitaciones fue superior en el último período de siembra. No obstante, es de interés destacar que el aumento logrado producto de la inoculación resultó similar en ambas campañas de siembra, con 38 y 42 % de incremento para la primera y la segunda, respectivamente.

El beneficio económico producto de la aplicación de la bacteria es elevado. En este orden, si se tiene en cuenta que el aumento promedio del rendimiento en relación con las plantaciones sin tratar, durante ambas campañas de experimentación, es de 25 t.ha⁻¹ y considerando que el valor de una tonelada de fruta fresca madura de papaya corresponde a \$4 500, el efecto económico por este concepto sería de \$112 500 por cada hectárea del cultivo aplicada con *G. diazotrophicus*. Por otra parte, cada litro de producto tiene un costo de \$13.27, por lo que el volumen total a aplicar en una hectárea representa un valor de \$26.54 más \$2.63 por concepto de costos de aplicación, para un total de \$ 29.17.ha⁻¹.

De acuerdo con este análisis, la relación beneficio/costo de la aplicación del biopreparado resulta mucho más elevada, con un valor aproximado de más de 3750:1, por lo que queda demostrada la potencialidad de la asociación de la bacteria con el cultivo de la papaya. A esto se le une un marcado impacto ambiental por concepto de aplicación de un producto biodinámico en equilibrio con el agroecosistema, contribuyendo así a su descontaminación.

El hecho de disponer de un mayor volumen de frutos frescos (más de 25 t por cada hectárea tratada) para el consumo de la población o industria, igualmente le confiere un apreciable impacto social al resultado de la aplicación de este método biotecnológico.

Como se ha observado en los diferentes acápite del trabajo, la potencialidad de aislar e introducir esta bacteria y otros endófitos en elevadas poblaciones en el agroecosistema, en relación con la cuantía en que normalmente se encuentran, con el objetivo de poder ejercer un efecto beneficioso cada día cobra mayor interés (1, 9, 10, 11, 26, 27).

De hecho, las relaciones endófitas hoy día se presentan como de vital perspectiva, en cuanto a la eficiencia del sistema planta-microorganismo, ya que las pérdidas por lixiviación, volatilización, disolución en la solución edáfica de suelo, bioconversión y arrastre e inmovilización de contenido celular, a partir de la asimilación por la biocenosis presente en el suelo, no se presentan, por lo que las ganancias metabólicas y, por consiguiente, energéticas en función de la economía celular y formación del rendimiento son superiores.

REFERENCIAS

- Muñoz, J. y Caballero, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial Ecology*, 2003, vol. 46, p. 454-464.
- Cocking, E. C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil*, 2005, vol. 252, p. 169-175.
- Dazzo, F. B. y Yanni, Y. G. The natural *Rhizobium*-cereal crop association as an example of plant bacteria interaction. *En: Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*. Boca Ratón: Taylor and Francis, Eds. 2006. 123-125 p.
- España, M.; Cabrera, E. y López, M. Study of nitrogen fixation by tropical legumes in acid soil from Venezuelan savannas using 15N. *Terciencia*, 2006, vol. 31, no. 3, p. 197-201.
- Reddy, P. M. y Dazzo, F. B. Rhizobial communication with rice. Induction of phenotypic changes, mode of invasion, and extent of colonization in roots. *Plant and Soil*, 1997, vol. 194, p. 81-99.

6. Chi, F.; Shen, S. H.; Cheng, H. P.; Ping, Y.; Yanni, Y. G. y Dazzo, F. B. Ascending migration of endophytic Rhizobia from roots to leaves inside rice plants and assessment of their benefits to the growth physiology of rice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, vol. 71, p. 7271-7278.
7. Dibut, B. A. Biofertilizantes como insumos en agricultura sostenible. 2005. Cosío Eds. Sinaloa. México. 154 p.
8. Dibut, B.; Martínez, R.; Ríos, Y.; Ortega, M. y Fey, L. Nuevos aislados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica para Cuba. *Cultivos Tropicales*, 2005, vol. 26, no. 2, p. 5-10.
9. Ortega, P.; Ortega, E.; Fernández, L. y Rodés, R. Composición de cinco aislados fijadores de nitrógeno obtenidos del interior de la caña de azúcar y de *Saccharococcus sacchari*. Congreso Científico del INCA (XIII: 2002, nov. 12-15: La Habana). Memorias (CD-ROM). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 2002. ISBN 959-7023-22-9. 67 p.
10. Loiret, F. G.; Ortega, E.; Ortega-Rodés, P.; Rodés, R. y Fuente, E. de la. *Gluconacetobacter diazotrophicus* es todavía un dilema para la ciencia. *Revista Biología*, 2004, vol. 18, no. 2, p. 113-122.
11. Ortega, P. Fijadores de N₂ en el sistema caña de azúcar-*Saccharicoccus sacchari*. Características fisiológicas y diversidad. (Tesis para optar por el Título Académico de Máster). Universidad de La Habana, 2004.
12. Dibut, B.; Martínez, R.; Ortega, M.; Ríos, Y. y Fey, L. Potencial agrobiológico de la asociación *Gluconacetobacter diazotrophicus*- *Carica papaya* L. Congreso Científico del INCA (XIV: 2004, nov. 9-12: La Habana). Memorias (CD-ROM). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 2004. ISBN 959-7023-27-X.
13. Ministerio de la Agricultura. Instructivo técnico para el cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.). La Habana: *Agrinfor*, 2004. 53 p.
14. Ministerio de la Agricultura. Instructivo técnico para el cultivo de viandas tropicales. La Habana: *Agrinfor*, 2003. 37 p.
15. Instituto de Suelos. Nueva versión de la Clasificación Genética de los Suelos de Cuba. La Habana: *Agrinfor*, 2000. 64 p.
16. Oliveira, A. L. M.; Urquiaga, S.; Döbereiner, J. y Baldani, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria in micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, 2002, vol. 242, p. 205-215.
17. Madhaiyan, M.; Saravanan, V. S.; Jovi, D. B. S. S.; Hyoungseok, J.; Thenmozhi, R.; Hari, K. y Sa, T. Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Hats, India. *Microbiol. Res.*, 2004, vol. 159, p. 233-243.
18. Hafeez, E. Y. Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. *Aust. J. Exp. Agric.*, 2004, vol. 44, p. 617-622.
19. Prayitno, J.; Luis, M. y Sörensen, G. Interactions of rice seedlings with nitrogen-fixing bacteria isolated from rice roots. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1999, vol. 26, p. 521-535.
20. Liu, X.; Xu, X. y Li, H. CMEIAS®: A computer-aided system for the image analysis of bacterial morphotypes in microbial communities. *Microbial Ecology*, 2001, vol. 41, p. 173-194.
21. Yanni, Y. G. The beneficial plant growth promoting association of *R. leguminosarum* b.v. trifolii with rice roots. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 2001, vol. 28, p. 845-870.
22. Dibut, A. B.; Martínez, R.; Tejeda, G.; Ríos, Y.; Ortega, M. "Efecto Fitosfera". Biosistema integrado en función de la productividad vegetal. La Habana: Publicación CENDA. 2007, 23 p.
23. Römheld, V. y Neumann, G. The Rhizosphere: Contributions of the soil-root interface to Sustainable Soil Systems. *En: Biological Approaches to Sustainable Soil System*. Boca Ratón: Taylor and Francis. 2006. 91-109 p.
24. Reis-Junior, F. B.; Reis, V. M.; Urquiaga, S. y Döbereiner, J. Influence of nitrogen fertilization on the populations of diazotrophic *Herbaspirillum* sp. and *G. diazotrophicus* in sugar cane. *Plant and Soil*, 2000, vol. 219, p. 153-159.
25. Ríos, Y.; Dibut, B.; Fey, L.; Martínez, R.; Arozarena, N.; Lino, A. y Ortega, M. Efecto del endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre el cultivo de la remolacha (*Beta vulgaris*) var. Detroit. *Agrotecnia de Cuba*, 2005, vol. 1 y 2.
26. Cavalcante, V. A. y Döbereiner, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 1998, vol. 108, p. 23-31.
27. Ríos, Y. Efecto de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre el crecimiento, desarrollo y rendimiento del cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) var CMC-40. (Tesis para optar por el Título Académico de Máster en Microbiología). Universidad de La Habana. 2007. 57 p.

Recibido: 8 de diciembre de 2008

Aceptado: 23 de julio de 2009