

**EFFECTO DE LA INOCULACIÓN DEL ENDÓFITO *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS* SOBRE EL CULTIVO DE LA REMOLACHA (*BETA VULGARIS* .VAR DETROIT).**

Yoania Ríos Rocafull, Bernardo Dibut Alvarez, Luis Fey Govín, Rafael Martínez Viera, Noel Arozarena, Alfredo Lino, Marisel Ortega García y Graciela López.

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT), Calle 2 esquina a 1 Santiago de las Vegas, Ciudad de la Habana, Cuba. E-mail: [yoania@inifat.co.cu](mailto:yoania@inifat.co.cu)

**RESUMEN**

Teniendo en cuenta la escasa información que existe sobre la bacteria endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus* y su potencial estimulador, consideramos conveniente ampliar los estudios referentes al efecto que produce su inoculación sobre cultivos de importancia económica para el país, tal y como es el caso del grupo de las hortalizas. Utilizando un biopreparado a partir de la cepa INIFAT Az 1 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a una concentración de  $10^9$  UFC/ml, se comprobó la presencia de la bacteria en el interior del cultivo de la remolacha (*Beta vulgaris* var. Detroit) aún cuando este no se inoculase. Ello demuestra el carácter de endófito del microorganismo. Como resultado de la aplicación del producto se logró un aumento en la concentración de la bacteria en el interior del vegetal ( $1.2 \times 10^6$  UFC/ml contra  $1.0 \times 10^5$  UFC/mL) permaneciendo la misma viable hasta los 45 días posteriores a la inoculación. Ello dota al cultivo de una potente maquinaria interna capaz de estimular su crecimiento y desarrollo, lo cual se observa desde los 15 días posteriores a la inoculación y permite obtener incrementos al finalizar el ciclo del cultivo de entre 40 y 70% del peso de las hojas, el área foliar, el diámetro del tallo y más del doble para el peso de los bulbos. El estudio se realizó durante un período de dos años. Los datos obtenidos se evaluaron estadísticamente mediante prueba t de Student, al 5% de significación.

**Palabras Claves:** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, remolacha, biofertilizantes.

**INOCULATION EFFECT OF THE ENDOPHIT *GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS* IN BEET CROP (*BETA VULGARIS* .VAR DETROIT).**

**ABSTRACT**

Information about endophytic bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its stimulant potential is scarce. That is why we consider convenient to study the agronomic effect of bacterial inoculation on economic crops such as vegetables. By a product obtained from *Gluconacetobacter diazotrophicus* INIFAT Az 1 strain at  $10^9$  UFC/ml, we could see the microorganisms inside of beet (*Beta vulgaris* var. Detroit) even though vegetable inoculation was not made. It shows the endophytic characteristics of this microorganism. When the products was applied we can rise the inside concentration of *G. diazotrophicus* ( $1.2 \times 10^6$  UFC/mL vs  $1.0 \times 10^5$  UFC/mL) until

45 days after the inoculation. It gives to the vegetable a powerful machine able to stimulate vegetal growing and development since the 15 days after the inoculation. Yield increase between 40 and 70% of weight leaves, leaves area, stem diameter and a double for bulb weight was obtained. This work was made by two years. Student t test at 5% of significies was used for the evaluation of dates obtained.

**Key Words:** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, **Biofertilizers**, **Beet**.

## INTRODUCCION

Dentro de la visión agrícola actual, donde se emplean términos como agricultura sustentable y desarrollo sostenible, tiene especial importancia el uso de los biofertilizantes. Uno de los más estudiados, es el obtenido a partir de *Rhizobium* sp, producto altamente eficiente cuando se aplica sobre plantas leguminosas (Chen, 1997). Por otra parte, en el caso de los microorganismos rizosféricos, como *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum brasilense*, existe una pérdida de la actividad metabólica del microorganismo y por consiguinete, de su efecto beneficioso sobre las plantas cultivables (Elmerich, 1992).

Para contrarrestar estos inconvenientes, sería factible elaborar un bioproducto a partir de un microorganismo que habite en el interior del vegetal y que por tanto ejerza un efecto mucho más directo sobre el mismo (Dibut y col, 2004; James y col, 2001).

Una alternativa interesante sería el endófito *Gluconacetobacter diazotrophicus*, bacteria fijadora de nitrógeno atmosférico, que posee además la capacidad de producir ácido indol acético y giberelinas, sustancias promotoras del crecimiento vegetal. Sin embargo, los estudios acerca de su distribución, aislamiento y aplicación son muy escasos, y los existentes, están limitados a un número muy reducido de especies de importancia económica (Sevilla y Kennedy, 1999).

Teniendo en cuenta el potencial estimulador de este microorganismo consideramos conveniente ampliar los estudios respecto al efecto que produce su inoculación sobre diferentes cultivos, por lo que el presente trabajo se propone estudiar los efectos de la aplicación de un biopreparado a base de *G.diazotrophicus* sobre el cultivo de la remolacha (*Beta vulgaris* var Detroit).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El biopreparado se obtuvo a partir de la cepa INIFAT Az1 de *G.diazotrophicus*, inoculada en medio SG (Cavalcante y Döbereiner, 1988). El inóculo se mantuvo en zaranda a una velocidad de 170 r.p.m de agitación y una temperatura de 32°C, durante un período de 24 horas, alcanzándose una concentración bacteriana del orden de 10<sup>9</sup> UFC/mL. La aplicación del biopreparado se realizó por aspersión utilizando los medios requeridos para ello.

Para observar el comportamiento de la concentración del microorganismo a lo largo del ciclo de cultivo se sembraron 50 macetas de barro de 6 kg conteniendo suelo Ferralítico Rojo. La mitad de las macetas fue inoculada con el bioproducto a base de *G.diazotrophicus*, mientras que las restantes se mantuvieron como testigos sin

inocular. La dinámica de crecimiento del microorganismo se realizó según el procedimiento descrito por Loganathan *et al.*, (1999), tomando muestras de los diferentes órganos del vegetal a los 15, 30 y 45 días posteriores a la inoculación.

El efecto agrobiológico fue evaluado en condiciones de organoponía. El área sembrada se dividió de tal forma que se obtuvieran dos parcelas formadas por igual número de canteros, una se mantuvo como testigo, mientras que la otra se inoculó con el microorganismo en estudio. Se realizaron mediciones de diferentes parámetros fisiológicos del cultivo (diámetro del tallo, altura de la planta, peso de la raíz, peso de la biomasa aérea y área foliar) a los 15 días de inoculación y al finalizar el ciclo de vida del vegetal.

El trabajo se realizó durante un período de dos años. Los datos obtenidos fueron procesados mediante el programa STATGRAPH y se evaluaron estadísticamente mediante una prueba de t-Student al 5% de significación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de concentración obtenidos en este estudio (Tabla 1) coinciden con los referidos en la literatura para microorganismos endófitos (Hallmann y col, 1997). La presencia del microorganismo en el interior de las hojas y tallo del cultivo aún cuando este no se inoculara ratifica el carácter de endófito de la bacteria (Döbereiner y col, 1993) y apoya la idea de su asociación con cultivos ricos en sacarosa (Dibut y col, 2004; Tapia-Hernández y col, 2001).

Tabla 1. Distribución de *G.diazotrophicus* en plantas de remolacha testigos e inoculadas.

Variante	órgano	15 días	30 días	45 días
Testigo	Hojas	$1.05 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	0
	Tallo	$1.02 \times 10^2$	0	0
Inoculado	Hojas	$2.5 \times 10^4$	$1.2 \times 10^6$	$2.15 \times 10^5$
	Tallo	$1.35 \times 10^4$	0	0

\*Concentración en UFC/g de cultivo.

La mayor concentración de la bacteria en las hojas pudiera ejercer un efecto directo del microorganismo sobre las reacciones fotosintéticas que tienen lugar en ese órgano, haciendo más eficiente el proceso, lo que se traduciría en un incremento sobre diferentes parámetros fisiológicos del cultivo. El efecto estimulador sería mayor en las plantas inoculadas ya que como se puede apreciar en la tabla, la bacteria no sólo alcanza una mayor concentración en las mismas, sino que es capaz de persistir en el interior del vegetal por un mayor período de tiempo lo que dota al cultivo de una potente maquinaria interna capaz de estimular su crecimiento y desarrollo, efecto mostrado desde los 15 días posteriores a la inoculación (tabla 2).

Tabla 2. Efecto agrobiológico de *G.diazotrophicus* sobre el cultivo de la remolacha tras 15 días de inoculación.

Variante	Diámetro del tallo (mm)	Altura de la planta (cm)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Peso raíz (g)	Peso de las hojas (g)
Testigo	2.24 b	31.00 b	238.13	11.2 b	55.8 b
Inoculado	3.68 a	43.20 a	248.25	36.00 a	103.0 a
Esx	0.158	1.421	3.306	0.35	0.35
CV%	5.34	3.83	13.59	1.47	0.44

\* Nota: Medias con distintas letras difieren significativamente entre sí según prueba t-Student al 5% de significación.

El que las plantas inoculadas promedien un mayor tamaño favorece la toma de rayos solares y por tanto la eficiencia de la fotosíntesis. La presencia de tallos más vigorosos le confiere al cultivo cierta ventaja ante condiciones ambientales adversas. La superioridad en cuanto al peso de las hojas pudiera deberse no sólo a una mayor acumulación de fotosintatos en las mismas, sino también a la existencia de diferencias en cuanto al contenido de agua presente. En cualquiera de los casos el cultivo inoculado se encontraría en ventaja sobre aquel sin inocular, ya que este estaría en condiciones de realizar un proceso fotosintético más eficiente con una mayor acumulación de fotosintatos, o podría mantener una mayor hidratación en las hojas, favoreciendo el metabolismo en las mismas. En ambos sistemas el efecto se traduciría en una mayor traslocación de carbohidratos hacia la raíz y por tanto, en el aumento del peso de los bulbos.

El incremento de entre 40% y 70% observado al finalizar el ciclo de cultivo del vegetal para el caso del peso de las hojas, área foliar, diámetro del tallo y más del doble para el peso de los bulbos (tabla 3) es el resultado del mejor funcionamiento integral en el cultivo inoculado.

Tabla 3. Efecto agrobiológico de *G. diazotrophicus* sobre el cultivo de la remolacha al finalizar el ciclo del vegetal.

Variante	Diámetro del tallo (mm)	Altura de la planta (cm)	Área foliar (cm <sup>2</sup> )	Peso raíz (g)	Peso de las hojas (g)
Testigo	5.12 b	40.4 b	223.6 b	62.36 b	105.72 b
Inoculado	6.36 a	49.8 a	311.2 a	149.88 a	147.58 a
Esx	0.338	1.732	1.238	7.869	1.143
CV %	5.88	3.84	4.80	7.41	9.03

\*Nota : Medias con distintas letras difieren significativamente entre sí según prueba t-Student al 5% de significación.

Una mayor área foliar, igualmente supone una mayor superficie de contacto para la realización de la fotosíntesis, lo que unido a la estimulación constatada tras 15 días de inoculación, permite una mayor acumulación de fotosintatos que condiciona la obtención de plantas con mayor desarrollo, los cuales presentan bulbos de más peso.

De esta forma se obtienen efectos beneficiosos análogos a los alcanzados al aplicar *Rhizobium* sobre leguminosas (Chen, 1997) y superiores a los obtenidos al inocular *Azospirillum brasilense* (Okon y Labandera-González, 1994) sobre cereales y hortalizas con *Azotobacter chroococcum* (Dibut y col, 2003).

## CONCLUSIONES

1. La inoculación de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre el cultivo de la remolacha promedia un aumento de la concentración del microorganismo en el interior del vegetal que oscila entre las  $10^4$  y  $10^6$  UFC/g de tejido fresco.
2. La inoculación de *G. diazotrophicus* provoca un efecto estimulador entre 40 y 70% de diferentes parámetros de crecimiento y desarrollo como el diámetro del tallo, altura de la planta, área foliar, peso de la raíz y peso de la hojas.

## RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios similares en otros cultivos.
2. Extender el resultado obtenido en el presente trabajo a condiciones de producción.

## REFERENCIAS

- Caballero-Mellado, J., E. Martínez-Romero., P. Estrada de los Santos, and L.E. Fuentes-Ramírez. (1998).** Maize colonization by *Acetobacter diazotrophicus*. In C. Elmerich, A. Kondorosi, and W.E. Newton (ed). Biological nitrogen fixation for the 21<sup>st</sup> century. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. 381-382.
- Cavalcante, V.A, y J. Döbereiner. (1988).** A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. Plant Soil. 108: 23-31.
- Chen Ting Wey (1997).** Development and application of biofertilizers in China. En Biological Nitrogen Fixation: The Global Challenge and Future Needs: A Symposium., Roma, 24-26.
- Dibut, B., R. Martínez Viera., Ali Kaychu., A, Semsathim., G. Kaya and E, Fariat. (2001).** Efecto de la aplicación de biopreparados DIMARGON sobre diferentes cultivos económicos en Izmir, Turquía. En XII Congreso Latinoamericano de Ciencias del Suelo, Varadero, Cuba, 26 pp.
- Dibut, B; R, Martínez; Y, Ríos; M, Ortega y L, Fey. (2004).** Presencia y uso de microorganismos endófitos como perspectiva para el mejoramiento de la producción vegetal. Cultivos Tropicales. 5:2: 5-9.
- Dibut, Bernardo. (2004).** INIFAT. Laboratorio de Fermentadores. Comunicación personal.

- Döbereiner, J., V.M. Reis., M.A. Paula, y F.L Olivares. (1993).** Endophytes diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In R. Palacios, J. Mora and W.E. Newton (ed)., New horizons in nitrogen fixation. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 671-676.
- Elmerich, C., W. Zimmer y C. Vieille. (1992).** Associative nitrogen-fixing bacteria. En: Biological Nitrogen Fixation. (Stacey G., Burris R.H y Evans, H.J.ed), Chapman and Hall, New York. 212-258 pp.
- Hallman, J; A. Quadt-Hallmann, W.F. Mahaffee y J.W. Kloepper. (1997).** Bacterial endophytes in agriculture crops. Review Synthese. Can. J. Microb. 43:895-914.
- James , E. K., F.L. Olivares., A.L.M de Oliveira., F.B. Reis Jr., L.G. Silva, y V.M. Reis (2001).** Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. Journal of Experimental Botany. 52, 357: 744-760.
- Loganathan, P., R. Sunlta., A.k. Parlda, y S. Nair. (1999).** Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant Eleusine coracana L. J. Appl. Microbiol. 87: 167-172.
- Okon, Y, y C.A. Labandera-González(1994).** Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biology and Biochemistry. 26:1591-1601.
- Sevilla, M., A, de Oliveira., I, Baldani y C, Kennedy. (1998).** Contributions of the endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition: a preliminary study. Symbiosis, 25: 181-196.
- Tapia-Hernández, A., M.R. Bustillos-Cristales., T. Jiménez-Salgado., J. Caballero-Mellado, y L.E. Fuentes-Ramírez. (2000).** Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. Microb. Ecol. 39:49-55.