

Universidad “José Martí” Sancti Spíritus



Tesis en opción al Título Académico de Máster en Ciencias Agrícolas

Mención: Granos

**Título: Influencia de la inoculación con rizobios en maíz
(*Zea mays* L.), bajo condiciones de campo en
Sancti Spíritus, Cuba.**

Autor: Ing. Yanet Suárez González

Tutor: Dr. C. Biol. Carlos José Bécquer Granados

2012

“Año 53 de la Revolución”

**Universidad “José Martí”
Sancti Spíritus**



**Tesis en opción al Título Académico de
Máster en Ciencias Agrícolas**

Mención: Granos

**Título: Influencia de la inoculación con rizobios en maíz
(*Zea mays* L.), bajo condiciones de campo en
Sancti Spíritus, Cuba.**

Autor: Ing. Yanet Suárez González

**2012
“Año 53 de la Revolución”**

PENSAMIENTO
PENSAMIENTO

“Las ciudades son la mente de las naciones, pero su corazón, donde se agolpa y de donde se reparte la sangre, está en los campos...”

José Martí

DEDICATORIA

DEDICATORIA

A quienes han sabido guiarme por los senderos de la victoria, esos que sin escatimar esfuerzos día a día, enarbolan la bandera de mi felicidad, a los que les debo todo lo que soy, por darme con cariño lo que he necesitado en los justos momentos, con amor:

A mi hija, abuelos, padres, y familia en general. A Aníbal, que con su ayuda y mejores deseos contribuyó y me supo guiar en la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco y le doy las gracias profundamente por la ayuda brindada, por su enseñanza y experiencia personal, al investigador Dr. Carlos Bécquer, además de ser el tutor del presente trabajo.

Al profesor y Dr. Miguel Angel Salvat, el cual me apoyó en la realización de la tesis.

A la Revolución por darme la oportunidad de formarme como Máster en Ciencias.

A todos los que de una forma u otra me ayudaron desinteresadamente.

Resumen:

Se realizó un experimento de campo con el objetivo de determinar el efecto de la inoculación con rizobios en maíz, para seleccionar las mejores cepas con vistas a su aplicación práctica. Se utilizaron 10 cepas nativas de *Bradyrhizobium* sp, y 3 cepas de referencia. La preparación de los inóculos y la inoculación de las semillas se realizaron con procedimientos preestablecidos. La dosis de siembra fue de 10 kg/ha. El marco de siembra fue de 70 cm entre surco, a chorrillo espaciado. Se aplicó un diseño experimental de bloques al azar, con 15 tratamientos y 4 réplicas. Se utilizó análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre medias, por LSD de Fisher ($p < 0,05$). Se realizó un análisis de conglomerados mediante el método Ward, distancia City-Block. Se evaluó peso seco aéreo, índice de efectividad de la inoculación, longitud del tallo, número de mazorcas y peso de las mazorcas. En la variable peso seco aéreo se observó que todos los tratamientos inoculados presentaron valores estadísticamente superiores al control absoluto. Los tratamientos JJ4, JJ2, SP20, 25B6, presentaron un IEI de 43,8%; 41,7% y 45,8%; respectivamente, lo que supera al resto de los tratamientos. Existió una influencia notable de las cepas inoculadas en longitud del tallo, así como en peso de la mazorca. El 46 % de los tratamientos aplicados mostraron los mayores valores en tres de las cuatro variables estudiadas, igualando o superando al control fertilizado. Los resultados obtenidos demostraron las perspectivas económicas prometedoras de la inoculación de maíz con rizobios.

Palabras clave: Maíz, *Bradyrhizobium*, variables agroproductivas, perspectivas económicas

Abstract:

A field experiment was carried out with the aim of determining the effect of rhizobial inoculation onto maize in order to select the best strains for the agricultural practice. Ten native strains belonging to *Bradyrhizobium* sp, as well as three reference strains were used. Inocula preparation and seeds inoculation were accomplished according to established methodologies. The sowing rate was 10 kg/ha. Sowing width was 70 cm between rows, widely spaced. A randomized block with 15 treatments and 4 replicates was constructed. The ANOVA analysis was used. Differences among means were determined by Fisher's LSD ($p < 0,05$). A cluster analysis was made with a Ward's method and a City-Block distance. Aerial dry weight, inoculation effectiveness index, length of stems, number of ears and ears weight were determined. In the aerial dry weight was observed that all inoculated treatments showed values statistically higher than the absolute control. Treatments JJ4, JJ2, SP20 and 25B6 showed an IEI of 43,8%; 41,7% and 45,8%, respectively, which is higher than the rest of treatments. It was observed a remarkable influence of inoculated strains on the length of stems, as well as on the ears weight. The 46% of treatments showed the highest values in four from five evaluated variables which matches or surpasses those ones of the fertilized control. Obtained results demonstrated promising economic perspectives of rhizobial inoculation on maize.

Key words: Maize, *Bradyrhizobium*, agro-productive variables, economic perspectives.

ÍNDICE	Pág.
INTRODUCCION.....	1
CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
I. 1. Impacto ambiental de los fertilizantes químicos en la producción del cultivo del maíz.....	6
I.2. Acercamiento necesario a las características morfológicas y botánicas del maíz.....	7
I.3 Importancia del maíz como suplemento y alimento animal.....	8
I.4 Requerimientos nutricionales del Cultivo.....	9
I.5. La biofertilización: una alternativa necesaria.....	10
I.5.1. Tipos de biofertilizantes.....	14
I.5.1.1. <i>Azotobacter</i>	15
I.5.1.2. <i>Azospirillum</i>	16
I.5.1.3. <i>Pseudomonas</i> spp.....	18
I.5.1.4. Micorrizas.....	19
I.5.1.5. Rizobios.....	20
I.6. Características de algunos géneros representativos.....	21
I.6.1. Género <i>Azorhizobium</i>	21
I.6.2. Género <i>Mesorhizobium</i>	21
I.6.3. Género <i>Sinorhizobium</i>	22
I.6.4. Género <i>Bradyrhizobium</i>	22
I.6.5. Género <i>Rhizobium</i>	23
I.7. Reseña y efecto de los rizobios como biofertilizante.....	24
I.8. Inoculante bacteriano a base de cepas de rizobios.....	24
I.9. Sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal.....	27
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
II.1. Procedencia de las cepas de rizobios.....	31
II.2. Procedencia de la semilla de maíz.....	32
II.3. Procedimiento experimental.....	32
II.3.1. Preparación de los inóculos e inoculación de las semillas.....	32

II.3.2. Siembra del experimento.....	32
II.3.3 Dosis de siembra.....	33
II.3.4 Tipo de suelo.....	33
II.3.5 Fertilización inorgánica del experimento.....	34
II.3.6. Control de plagas y enfermedades.....	34
II.3.7. Diseño experimental y análisis estadístico.....	34
II.3.8 Variables evaluadas.....	35
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
III.1. Peso seco aéreo e índice de efectividad de la inoculación.....	36
III.2. Longitud del tallo.....	39
III.3. Número y peso de las mazorcas.....	41
III.4. Análisis de conglomerados.....	43
III.5. Impacto económico de la investigación.....	45
III.5.1 Bases de cálculo.....	45
III.6. Algunas consideraciones generales.....	46
III.6.1. Factores suelo y fertilizante químico.....	46
III.6.2. Bases fisio-bioquímicas del efecto positivo de los rizobios en la planta.....	47
CONCLUSIONES.....	49
RECOMENDACIONES.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51

Introducción:

Maíz, es el primer cultivo en cuanto a volumen de producción en el mundo. Desde hace cincuenta años, la extensión y volumen de producción del grano mesoamericano ha ido en aumento; de seguir así, se convertirá en el grano más importante del planeta. Ello se debe a la gran cantidad de productos que se obtienen del maíz, tanto para la alimentación humana y animal, como para uso industrial. Más de seiscientos millones de toneladas métricas se producen en ciento cincuenta millones de hectáreas y nuestro continente es el de mayor producción (<http://www.comaiz.mx/importancia-maíz>. 2007. Consultado el 8 de mayo de 2012).

La importancia que representa el maíz dentro de los granos básicos es indudable desde distintos puntos de vista, por tener altas implicaciones en el contexto agrosocioeconómico de una gran mayoría de la población, principalmente para garantizar la seguridad alimentaria y la sobrevivencia. Los productos y subproductos que se obtienen del maíz, son utilizados tanto por la población rural como urbana, siendo estos demandados para el consumo humano, animal, transformación industrial y otros usos variados dentro o fuera de las fincas productoras.(Fuentes, 2002).

El maíz (*Zea mays* L. Moench), si se cultiva bajo el sistema de producción intensivo, causa pérdida de fertilidad del suelo y contamina el agua superficial y los acuíferos, por el exceso de fertilizante nitrogenado aplicado y no absorbido por la planta. Una alternativa para minimizar este problema, son las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, las cuales realizan sus funciones de diversas formas (Plata-Guzmán *et al.*, 1997).

El uso desmedido de fertilizantes químicos y pesticidas sintéticos en los cultivos, fundamentalmente en el maíz, ha provocado graves consecuencias ambientales, por lo que se ha prestado especial atención al estudio de los microorganismos asociados a las raíces de las plantas y a sus beneficios para la agricultura (Rodríguez *et al.*, 2003).

En Cuba el uso de los biofertilizantes ha tomado auge en los últimos años y se han desarrollado varios estudios en cultivos como el tomate, pimiento, tabaco, cebolla, plátano y arroz, entre otros. Sin embargo, en los pastos los trabajos se han encaminado, fundamentalmente, a la inoculación de las leguminosas con cepas de rizobios. En las gramíneas, como la caña de azúcar, se ha utilizado *Azospirillum* y hasta el momento se han obtenido resultados alentadores que indican la posibilidad de poder sustituir entre un 15 y un 20% del fertilizante mineral nitrogenado (Treto y Arzola, 1993).

Es conocido que la adaptación de los microorganismos a ambientes estresantes es un factor de supervivencia de los mismos y, que puede incidir positivamente en la capacidad de los rizobios de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar sales minerales para su mejor aprovechamiento por la planta o producir sustancias promotoras del crecimiento vegetal en ecosistemas agrícolas sometidos a estrés ambiental, donde las cepas comerciales convencionales no son eficientes (Chabot *et al.*, 1996; Biswas *et al.*, 2000; Hilali *et al.*, 2001; Bécquer *et al.*, 2008).

La aplicación de biofertilizantes y bioestimulantes a los cultivos, es una estrategia importante para mejorar o preservar las condiciones físicas, químicas y biológicas de los suelos y por consiguiente su potencial agroproductivo, a la par que incrementan el nivel de sanidad y productividad de los cultivos (Rodríguez *et al.*, 2003).

Las bacterias beneficiosas se aplican en la agricultura en forma de inoculantes para los cultivos (biofertilizantes). Se han realizado investigaciones extensas sobre este tema, incluyendo estudios sobre la diversidad y la taxonomía de los rizobios. *Rhizobium* fue la primera bacteria producida a gran escala y se ha añadido como inoculante a diversos cultivos agrícolas, con éxito en muchos casos. (Bécquer, 2007).

Esta asociación entre rizobios y plantas no leguminosas puede mejorar el crecimiento de las plantas, aunque se ha demostrado que esto no solo se realiza mediante la fijación del nitrógeno, sino también por la producción de fitohormonas

que estimulan y promueven el crecimiento vegetal, así como sus rendimientos agrícolas. Se ha observado que la inoculación con *Rhizobium leguminosarum* incrementa de forma significativa la materia seca en áreas de maíz, trigo y cebada (Antoun y Prévost, 2000).

Las bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por su acrónimo en inglés), representan una amplia variedad de bacterias del suelo las cuales, al crecer en asociación con las plantas hospederas, provocan la estimulación del crecimiento de dichas plantas (Kevin, 2003). Sin embargo, el efecto positivo de las bacterias rizosféricas, entre ellas los rizobios, en plantas no pertenecientes a la familia de las leguminosas, como las gramíneas, es un hecho científico demostrado por diferentes autores (Biswas *et al.*, 2000; Hilali *et al.*, 2001; Antoun y Prévost, 2005; Anya *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha demostrado por Prévost *et al.* (2000), que la inoculación de maíz con rizobios, ejerce un efecto positivo en los parámetros fisiológicos del vegetal.

Otros estudios en este tema han señalado que la respuesta de los cereales a la inoculación bacteriana depende del genotipo de la planta (Murty y Ladha, 1988), de la cepa de bacteria utilizada y del tipo de suelo (Baldani *et al.*, 1987); así como de las condiciones medioambientales existentes (Bhattarai y Hess, 1993). Según estos últimos autores, además de Neves y Rumjanek (1997) y otros, las cepas procedentes de ecosistemas locales pueden ser seleccionadas para la inoculación de los cultivos, ya que las mismas están adaptadas al ambiente y pueden ser más competitivas que las cepas importadas.

El problema científico a resolver en esta tesis es el siguiente:

¿Es factible la inoculación de rizobios para mejorar variables agroproductivas importantes en maíz?

Objetivo general:

Valorar el efecto de la inoculación de rizobios nativos y comerciales en una variedad cubana de maíz en condiciones de campo en Sancti-Spíritus, con el fin de determinar el efecto positivo de las cepas en el cultivo y de esta forma seleccionar las mejores para su aplicación en la práctica agronómica.

Objetivos específicos:

- 1.- Determinar el efecto de la inoculación con rizobios en variables agroproductivas determinadas.
- 2.- Seleccionar cepas de acuerdo a su efecto en la planta para su aplicación posterior en la práctica agrícola del territorio.
- 3.- Evaluar el impacto económico de la investigación.

Hipótesis:

Con la inoculación de diferentes cepas de rizobios en maíz se pueden obtener resultados agronómicos satisfactorios con bajos costos de producción por la no utilización de fertilizantes químicos.

Tipo de investigación:

Aplicada.

El objeto de investigación: la aplicación de biofertilizantes (inoculantes bacterianos) en el cultivo del maíz.

Campo de acción. Aplicar el efecto promotor de crecimiento vegetal de rizobios en maíz, bajo condiciones de campo en Sancti Spíritus.

Justificación de la investigación y su viabilidad:

El actual incremento significativo de los precios de fertilizantes y otros productos químicos en el mercado internacional obligan a aplicar variantes menos costosas en la práctica agrícola. Por otra parte, es conocido del impacto negativo que proporcionan los fertilizantes químicos al medio ambiente por contaminar el manto freático y provocar enfermedades metabólicas a animales y seres humanos. La actual investigación aborda profundamente estos problemas para brindar una adecuada solución a los mismos. Un incremento aceptable de los rendimientos podría también esperarse, por lo que se justifica plenamente desde el punto de vista científico, ambiental, económico y agrícola.

Novedad científica:

Se considera que esta investigación puede constituir una novedad para las ciencias del suelo de Cuba, al no contar con antecedentes previos en nuestro país al momento de ejecución del experimento, así como muy pocos antecedentes en el extranjero.

Capítulo I.

Revisión Bibliográfica.

I.1. Impacto ambiental de los fertilizantes químicos en la producción del cultivo del maíz.

La llamada revolución verde que fue vendida como la panacea de la agricultura para la producción de alimentos a gran escala y mitigar el hambre a nivel mundial, hoy en día está muy cuestionada. La realidad nos ha convencido de la existencia de cambios, producto de la intervención del hombre en la naturaleza, nocivos al ambiente y que, en algunos casos, están alcanzando niveles irreversibles. Esta intervención ha traído consigo la inutilización de campos debido a la pérdida de suelos por erosión y mal manejo y la disminución de la biodiversidad por abuso de agroquímicos e incorporación de grandes cantidades de fertilizantes químicos que contaminan mantos acuíferos, produciéndose un impacto negativo sobre la sostenibilidad. (Chirinos *et al*, 2006).

El abono químico llega a Cuba con las relaciones del campo socialista, en esa época los campesinos se negaban a usar productos químicos pues planteaban que le mataban las lombrices del suelo, puesto que al adicionarle al suelo sales de NPK aumentaban su concentración en él y cambiaban el potencial osmótico de las lombrices, muriendo, qué tan cierto estaban de la experimentación empírica. (Moreira, 2005).

Los fertilizantes sintéticos de nitrógeno también pueden convertirse en contaminadores del aire y han estado implicados recientemente al contribuir al calentamiento global y a la destrucción de la capa de ozono. El N_2O es liberado a la atmósfera por la aplicación de fertilizantes nitrogenados, y tiene casi 300 veces el potencial de calentamiento global que una misma masa de CO_2 . (Searchinger *et al*. 2008).

El maíz requiere grandes cantidades de fertilizantes químicos nitrogenados, que llevan a la contaminación del agua superficial y subterránea. Los residuos cargados de nitrógeno son el resultado del uso ineficiente de fertilizantes de nitrógeno en los cultivos que alcanzan el agua superficial y el agua subterránea. La contaminación de acuíferos por nitratos es bastante extensa, y a niveles peligrosamente altos, en muchas regiones rurales (Altieri, 2009).

Desde el punto de vista de una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente, el uso de biofertilizantes representa una importante alternativa para limitar el uso de abonos químicos, reduciendo su negativo impacto ambiental y económico, y mejorando la productividad de los cultivos. A su vez, los biofertilizantes pueden ser de gran utilidad en la recuperación de terrenos marginales para su aprovechamiento agrícola y forestal. El uso de biofertilizantes constituye una forma de aumentar la productividad de los cultivos, reduciendo al mismo tiempo los efectos perversos de la fertilización química sobre el medio ambiente y la salud. (Chirinos *et al*, 2006).

I.2. Acercamiento necesario a las características morfológicas y botánicas del maíz.

El maíz es una monocotiledónea, dentro de su diversidad existen cultivares de menos de 1 m de altura, 8-9 hojas y una madurez de 60 días y otros con más de 5 m de altura, 40-42 hojas y una madurez de 340 días (Fischer y Palmer, 1984). Es una gramínea anual, robusta, de 1-4 m de altura, determinada, normalmente con un solo tallo dominante, pero puede producir hijos fértiles, hojas alternas en ambos lados del tallo, pubescentes en parte superior y glabras en parte inferior, monoéica con flores masculinas en espiga superior y flores femeninas en jilotes laterales; potándrica con la floración masculina ocurriendo normalmente 1-2 días antes que la femenina, polinización libre y cruzada con exceso de producción de polen: 25-30 mil granos por óvulo, granos en hileras incrustados en el olote, mazorca en su totalidad cubierta por hojas; grano cariopsis; metabolismo fotosintético C4. El maíz pertenece al Reino: Vegetal, División: *Tracheophyta*, Subdivisión: *Pteropsidae*, Clase: *Angiospermae*, Subclase: *Monocotiledoneae*, Grupo: *Glumiflora*, Orden: *Graminales*,

Familia: Gramínea, Tribu: *Maydeae*, Género: *Zea*, Especie: *Mays* (Purseglove, 1972; Fisher y Palmer, 1984).

El maíz con alta calidad de proteína deriva del aprovechamiento del gen mutante opaco o2o2. Su versión homocigótica recesiva genera mayor contenido de lisina y triptófano, aminoácidos componentes de las proteínas esenciales para el crecimiento y desarrollo humano (Mertz, 1994, Ortega et al., 1986, Vasal, 2002). La calidad de la proteína en estos maíces es similar a la de la leche (Bressani, 1994; Vasal *et al.* 1994) concentraron genes modificadores del endospermo, para lograr la textura cristalina o dentada en el grano, que expresa el gen o2o2, obteniendo con ello líneas, híbridos y variedades con la textura del maíz común, con características aptas para la industria, para el método de consumo tradicional.

I.3. Importancia del maíz como suplemento y alimento animal.

Los sistemas silvopastoriles son una opción para contribuir a la base alimentaria en los sistemas ganaderos de Cuba y es necesario estudiar la forma de potenciar la respuesta del sistema (producción de leche y ganancia media). En este sentido, una alternativa viable para lograr que se maximicen los resultados productivos es la suplementación con subproductos de industrias diversas. Por otra parte, el aumento de la producción de etanol ha traído consigo un incremento en la disponibilidad de los residuos de destilería, que son considerados una buena fuente de proteína y energía para las novillas (Martín, 2007; Ramírez, 2008). En los últimos años en Cuba se ha empleado el subproducto de destilería del maíz (Northgold) para potenciar la producción de leche, lo cual presenta un contenido de proteína entre 2,2 y 3 veces mayor en relación con el producto original (25-29%), pero es pobre en lisina, además, la suplementación con subproductos de destilería del maíz al 20% de los requerimientos de proteína bruta, influye de forma positiva en la ganancia media diaria, así como se mantienen los valores de hematocrito dentro de los recomendados para la especie bovina. (Blas, 2007; Martínez, 2008).

Con respecto a la oferta de carne vacuna, de mayor incidencia en el costo de la canasta familiar, las entidades indicaron que en los planes productivos de los

asociados no contemplan un crecimiento de los pastos, sino mantenerlos con fines de rotación de cultivos y diversificación de la producción. Si la disponibilidad de forraje no cambia y los modelos de uso de raciones se ven perjudicados por las relaciones de precios, no se podría esperar un cambio positivo en la oferta local de carne vacuna. (Muñoz, 2006).

I.4. Requerimientos nutricionales del cultivo.

La presencia de los elementos nutritivos en las cantidades disponibles suficientes para el desarrollo de la planta es condición primordial para un rendimiento óptimo de grano. El maíz consume alrededor de 100-150 kg de N para producir unas 5 ton/ha de grano. El ritmo de acumulación de N en la planta crece casi paralelo a la acumulación de sustancias secas. El consumo de N es intenso especialmente en el período de mayor crecimiento de las plantas, que se produce desde que éstas emiten la décima hoja hasta después de la fecundación y formación de los granos. Los niveles más altos de nitrógeno corresponderán a los suelos arenosos, los más bajos o los no calcáreos y los intermedios a los latosalizados. Los niveles más altos de fósforo se aplicarán a los suelos latosalizados, los más bajos a los arenosos y los intermedios a los calcáreos y no calcáreos (MINAGRI, 2009).

A través de diferentes evaluaciones realizadas en el Sub-Programa de Maíz en diferentes localidades de la zona del Trópico Bajo de Guatemala se ha generado información confiable que sirve de base para la interpretación y recomendación de fertilizantes para el cultivo del maíz. Asimismo, se ha documentado que la eficiencia del uso de los fertilizantes es baja en los sistemas de producción de maíz. La baja eficiencia del uso de fertilizantes está relacionada a la aplicación del fertilizante a la superficie del suelo al voleo o por posturas. Esta aplicación superficial de fuentes amoniacales puede conducir a pérdidas considerables por volatilización directa o por escorrentía y así contribuir a la baja eficiencia de uso (Larios *et al*, 1997).

I.5. La biofertilización: una alternativa necesaria.

La revolución verde de los años sesenta trajo un notable incremento de la producción agrícola, gracias, sobre todo, al empleo generalizado de abonos químicos y semillas mejoradas. Pero el fertilizante nitrogenado, el más utilizado en agricultura, se lleva buena parte de la inversión en el campo. Para la fabricación de fertilizantes nitrogenados se requiere en general energía derivada del petróleo. Por otro lado, su uso indiscriminado ha ocasionado graves problemas de contaminación, ya que no todo el fertilizante que se aplica lo aprovecha la planta; en una cuantía importante acaba en lagos y lagunas. (<http://apuntes.rincóndelvago.com/rhizobium.html>. *Rhizobium*, 1998. Consultado el 8 de mayo de 2012).

La fijación biológica de nitrógeno es la opción alternativa y natural de la fertilización química. De todos los seres vivos, sólo un centenar de géneros de bacterias están capacitados para fijar nitrógeno del aire, donde este elemento constituye alrededor del 70%, y convertirlo en compuestos asimilables por todos los organismos. (<http://apuntes.rincóndelvago.com/rhizobium.html>. *Rhizobium*, 1998. Consultado el 8 de mayo de 2012).

En condiciones naturales o con bajo nivel de disturbio en la vegetación original, se ha demostrado que la interdependencia planta-microorganismo ha contribuido al mantenimiento, funcionamiento y la estabilidad de los ecosistemas (Read, 1998) y como consecuencia en la diversidad de las especies en las comunidades vegetales. En cambio, en la actividad agrícola, esta relación de interdependencia ha sido menospreciada y poco estudiada, y en general en los terrenos agrícolas ha ido en detrimento (Remy *et al*, 1994).

Agronómicamente, la parte aérea de la planta ha recibido más atención para su estudio, en comparación con el sistema radical (Kramer, 1983 y Gregory, 1994), aún cuando existe una estrecha interdependencia entre ambos órganos. El sistema radical ha sido llamado el componente olvidado (Davidson, 1978), la mitad escondida (Waisel *et al*, 2002), aunque para muchas plantas representa mucho más que la parte aérea.

El objetivo de la biofertilización es el de formar asociaciones microorganismos – planta, capaces de incrementar la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (Da Silva *et al.*, 1999; Hardson, 1999), así como incrementar la disponibilidad de nutrientes y hacer eficiente la absorción de los mismos (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000; Young *et al.*, 1988; Brown y Bethlenfalvay, 1988; De la Cruz *et al.*, 1988; Werner, 1992; Aguirre y Velazco, 1994; Linderman, 1993; Bethlenfalvay, 1993; Bashan *et al.*, 1993, Uribe, 2004).

Una alternativa al uso de los fertilizantes químicos son los microorganismos promotores del crecimiento denominados: “bioestimulantes”, “biofertilizantes” o “inoculantes”. Los microorganismos más utilizados son las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Azospirillum*, así como hongos micorrícicos del género *Glomus*, que generalmente provienen de otras regiones, lo que limita a los agricultores locales. Así, los estudios sobre la adaptación y eficiencia biofertilizante de nuevas cepas deberán conducirse en las regiones donde se utilizarán recurrentemente. La inoculación con *A. brasilense* es altamente benéfica en gramíneas como maíz, caña de azúcar, pastos y sorgo, pues aporta de 30 a 50% de los requerimientos de nitrógeno de dichos cultivos (Martínez-Morales *et al.*, 2003; Viviene *et al.*, 2004).

Entre las especies fijadoras de nitrógeno hay cianobacterias (*Anabena* y *Nostoc*, por ejemplo), arqueobacterias (*Methanococcus*), bacterias grampositivas (así, *Frankia* y *Clostridium*), enterobacterias (*Klebsiella*) y otras proteobacterias (*Rhizobium*, *Azospirillum* y *Acetobacter*, entre varias). En la fijación biológica de nitrógeno el mundo orgánico halla su fuente principal de abastecimiento en dicho elemento. Si se suspendiera el proceso de fijación, todo el nitrógeno retenido en la biomasa regresaría a la atmósfera en 100 años. De poder fijar nitrógeno, el hombre no necesitaría ingerir proteínas. Pero la ambición de los científicos no es que el hombre fije nitrógeno, sino que los cultivos altamente extractivos de nutrientes del suelo puedan prescindir del uso de fertilizantes mediante la fijación biológica de nitrógeno. En la naturaleza ya existen plantas que aprovechan la fijación de nitrógeno realizada por bacterias que se asocian con los vegetales. Ocho familias de plantas emparentadas entre sí gozan de la capacidad para asociarse en simbiosis con

bacterias fijadoras de nitrógeno. Las plantas en cuestión alojan a las bacterias en estructuras especiales que se forman en sus raíces; en los nódulos, nombre de esas estructuras, las bacterias fijan el nitrógeno. (<http://apuntes.rincóndelvago.com/rhizobium.html>. *Rhizobium*, 1998. Consultado el 8 de mayo de 2012).

Individuos de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* penetran en las raíces y a veces en los tallos de las leguminosas, mientras que *Frankia* y otros actinomicetos son las responsables de la fijación de nitrógeno en *Casuarina* y otras especies. Las leguminosas, se admite que deben tamaño éxito adaptativo a su capacidad para fijar nitrógeno, lo que les permite colonizar suelos pobres en nutrientes. Pero no todas las especies están capacitadas para formar nódulos; tampoco se sabe cuántas establecen simbiosis. Las más conocidas son las que tienen valor comercial y alimentario para el ser humano o para el ganado, como el frijol, la soja, el chícharo, la lenteja, el haba y la alfalfa. Todas ellas fijan nitrógeno atmosférico al establecer simbiosis con *Rhizobium* y otros géneros emparentados. (<http://apuntes.rincóndelvago.com/rhizobium.html>., 1998. Consultado el 8 de mayo de 2012).

La utilización de productos biológicos constituye un elemento de extraordinario valor para una agricultura sostenible. Esta no puede introducirse de forma aislada, sino dentro de un sistema de manejo de suelo donde se integren las diferentes tecnologías que de forma interactiva contribuyan cada una a obtener los resultados esperados. Los biofertilizantes y bioestimulantes son productos a base de microorganismos beneficiosos que viven en el suelo en poblaciones relativamente bajas, que al incrementarse sus poblaciones por medio de la inoculación artificial, son capaces de poner a disposición de las plantas una parte importante de las sustancias nutritivas que necesitan para su desarrollo. La obtención de diferentes productos biológicos se ha llevado a cabo sobre la base de la explotación de diferentes características genéticas de los microorganismos como son la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, la capacidad de solubilizar los fosfatos insolubles de los suelos, la capacidad de optimizar los nutrientes presentes en el suelo y la

capacidad de ofrecer protección fitosanitaria a los cultivos contra plagas y enfermedades (Anon, 2007. <http://mibr.asm.org/2/attachment2.htm>. Consultado el 12 de Octubre de 2011).

Los biofertilizantes son sustancias líquidas o sólidas que provienen de la fermentación de materiales orgánicos, que pueden ser enriquecidos con sales minerales naturales y que contienen microorganismos con efectos positivos sobre algunos procesos de descomposición y síntesis que ocurren en el suelo. Todas estas sustancias, extraídas por procedimientos naturales y respetuosos con el medio ambiente, actúan sobre el crecimiento del tejido radicular secundario, sobre la multiplicación de las células en el crecimiento de la masa de la planta, la multiplicación de nuevos brotes y sobre un mejor cuajado de las flores, que proporciona, a su vez, una mayor uniformidad del fruto tanto en lo que respecta a su tamaño como a su aspecto externo, además de un mayor brillo en su aspecto y una mayor consistencia del mismo. (TRAXCO, 2010. <http://www.traxco.es/blogposibles-averias-de-un-pivot>. Consultado el 7 de mayo de 2012).

El empleo de microorganismos biofertilizantes constituye una vía importante para atenuar la escasez de fertilizantes minerales, a la vez que contribuye a disminuir los costos de la producción agrícola, ya que la fijación biológica logra cubrir hasta el 50% del nitrógeno necesario para las plantas (Martínez Viera, 1986), además, estos microorganismos ayudan a mantener el equilibrio biológico, ya que no producen afectaciones al suelo, a la salud y al ambiente en general.

Como consecuencia de la revolución biológica que se lleva a cabo en la agricultura cubana, en los últimos años se han desarrollado diferentes biofertilizantes. Entre los más utilizados se encuentran aquellos elaborados a base de bacterias fijadoras de nitrógeno de forma asociativa como es el caso de *Azotobacter chroococcum*. Estos microorganismos viven en la zona rizosférica de las plantas y utilizan como nutrientes las sustancias contenidas en las secreciones de las raíces, suministrando a estas el nitrógeno que fijan. Al mismo tiempo, sintetizan aminoácidos, citoquininas, auxinas, giberelinas, ácidos orgánicos y péptidos de bajo peso molecular, entre otras

sustancias, las cuales actúan como estimuladores del crecimiento vegetal. (Dibut *et al.* 1995).

La inoculación de varios microorganismos (biofertilizantes) constituye una tendencia mundial, sobre todo a partir de los años 90. Esto se debe fundamentalmente a que contribuyen en el mejoramiento de la eficiencia de la fertilización y a la conciencia que se ha adquirido sobre la conservación del medio ambiente. Por esta razón se hace necesario la búsqueda de alternativas que mejoren la eficiencia de utilización de los fertilizantes y que a su vez constituyan tecnologías respetuosas del medio ambiente, como es el caso de la inoculación con *Rhizobium* y Micorrizas (Ruiz *et al.*, 2010).

I.5.1. Tipos de biofertilizantes.

Los microorganismos del suelo aprovechados en la agricultura han tenido diferentes denominaciones, tradicionalmente se han utilizado inóculo o inocular, que es la introducción de gérmenes en un sustrato cualquiera (Font Quer, 1977), pero también se han denominado fertilizantes bacterianos, (Dommergues, 1978) e inoculantes microbianos (Kapulnik y Okon, 2002).

Algunos productos comerciales que contienen solamente bacterias, son comúnmente llamados biofertilizantes, como el caso del *Rhizobium*, fitoestimulante como el *Azospirillum*, biopesticidas, cuando se utilizan para el control biológico como la *Pseudomonas* (Kapulnik y Okon, 2002) y también como bioinoculante, (Loredo *et al.*, 2007). En todos los casos pueden utilizarse en cultivos anuales, en praderas de gramíneas, leguminosas, hortalizas y frutales.

Ferrer y Herrera (1991) y Hernández (1997), agrupan en este concepto a todos los organismos vivos capaces de brindar algún beneficio a las plantas y los clasifican en dos grandes grupos: los de acción directa, entre los que se encuentran los microorganismos fijadores simbióticos de nitrógeno y las Micorrizas Vesículo Arbusculares (MVA) y las de acción indirecta que incluyen los solubilizadores de

fósforo, los fijadores de nitrógeno atmosférico de vida libre y los estimuladores de crecimiento vegetal, representados por varios géneros.

La importancia según Hernández *et al.* (1994) y Martínez y Dibut, (1995), de estos bioproductos radica en su capacidad para suplementar o movilizar nutrientes con un mínimo uso de recursos no renovables; además, tiene las ventajas de que los procesos microbianos son rápidos y los biopreparados pueden aplicarse para solucionar problemas locales específicos, al mismo tiempo que se reducen los problemas económicos y ecológicos que se derivan de la aplicación indiscriminada de los fertilizantes industriales.

El uso de inoculantes biológicos incorporados como tratamientos de semilla con microorganismos promotores del crecimiento vegetal tales como *Azotobacter*, *Azospirillum*, Micorrizas u otros, muestran un creciente interés no sólo en estudios de investigación sino también en evaluaciones extensivas y en usos comerciales en diferentes cultivos. Efectos como una más rápida implantación, mayor crecimiento de raíces, tolerancia mejorada a patógenos, fijación biológica no simbiótica de nitrógeno y solubilización de nutrientes son habitualmente reportados en estas experiencias (Caballero Mellado *et al.* 1992). Dado el crecimiento en los costos de producción, las mejoras derivadas de una mayor eficiencia de uso de los nutrientes y otros recursos a partir de los aportes de estos tratamientos biológicos serían de relevancia (Ferraris *et al.*, 2008).

Las leguminosas también presentan asociaciones tripartitas con rizobios y hongos vesículo arbusculares (micorrizas), mejorando el desarrollo de los nódulos y la fijación de nitrógeno, incrementándose el rendimiento de los cultivos y la eficiencia en el uso de fertilizantes (Ferrero y Alarcón, 2001).

I.5.1.1. *Azotobacter*

El nombre de este género de bacterias proviene de la palabra francesa "azoto", que quiere decir nitrógeno, y del griego "bacter", que significa bacilo. De él se han descrito cuatro especies: *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii* y *A. paspali*

(Martínez Viera, 1986); se ha planteado que esta última es específica para el pasto *Paspalum notatum*. En general se ha encontrado que existe en diferentes regiones del planeta, tanto tropicales y subtropicales como templadas, aunque en las últimas la frecuencia de aparición es menor (Dobereiner, 1968).

Azotobacter, *Azospirillum* y *Pseudomonas* son bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, aumentan la capacidad de solubilización del fósforo orgánico e inorgánico del suelo, colonizan las raíces de las plantas produciendo fitohormonas como giberelinas (inducen a la germinación de las semillas y controlan el crecimiento vegetal), citoquininas (fomentan y favorecen el crecimiento de las yemas laterales), auxinas (sustancias promotoras del crecimiento vegetal), esto trae como consecuencia un aumento en la captación de nutrientes. (<http://www.controlbiológico.com/directorio-provedores-agri.htm>.2012. Consultado el 8 de mayo de 2012).

Azotobacter y *Azospirillum*, son promotores de crecimiento vegetal, producen fitohormonas, incrementan la velocidad de germinación de semillas, estimulan la formación de raíces, fortalecen los mecanismos naturales de defensa de la planta (resistencia sistémica), incrementan la respuesta a la fertilización química u orgánica, reducen las pérdidas de N por lavado, aumentan la tolerancia al estrés hídrico y al ataque de plagas o enfermedades. (Fornasero *et al*, 2007. <http://www.engormic.com>. Consultado el 7 de mayo de 2012)

1.5.1.2. *Azospirillum*

En la actualidad las bacterias de este género son ampliamente estudiadas por su capacidad de fijar el dinitrógeno atmosférico y de producir sustancias estimuladoras del crecimiento y desarrollo vegetal. Así, Velazco (1993) informó que a nivel mundial la biofertilización con *Azospirillum* sp. en las gramíneas como trigo, arroz, cebada y pastos, produce incrementos en los rendimientos hasta de un 25% y/o la disminución de la dosis de fertilizante mineral.

Azospirillum es el género de microorganismos promotores del crecimiento vegetal (acrónimo en inglés: PGPM) más ampliamente estudiado. Es reconocido por su capacidad de promover el crecimiento vegetal en plantas de interés agrícola, especialmente en cereales y pastos. El mayor desarrollo radical inducido por la inoculación con *Azospirillum* conduce a una mayor absorción de agua y nutrientes del suelo que se refleja en el mayor crecimiento del tallo y follaje. También se han demostrado incrementos en peso seco total, concentración de nitrógeno en follaje y grano, número total de espigas, espigas fértiles y mazorcas, una floración y aparición de la espiga más temprana, incremento en el número de espigas y granos por espiga, plantas más altas y tasas de germinación más altas (Albrecht *et al.*, 1981; Bashan, 1986; Fulchieri y Frioni, 1994; Stancheva *et al.* 1992). Además se ha observado un incremento en el desarrollo del sistema de raíces, tanto en longitud como en volumen (Bashan *et al.*, 1996) y una promoción del crecimiento vegetativo (Kapulnik *et al.*, 1982, 1983).

El contenido de fósforo, nitrógeno, potasio y diversos micronutrientes es mayor en las plantas inoculadas con *Azospirillum* que en las no inoculadas. Esta bacteria fue aislada de la rizosfera y de la superficie de las raíces de una amplia variedad de plantas cultivadas y silvestres del mundo. La amplia distribución geográfica entre hospederos indica la versatilidad para adaptarse a condiciones edáficas diversas (Okon, 1994).

La inoculación con *Azospirillum* puede afectar positiva o negativamente algunos parámetros de las raíces y del follaje, que están atribuidos a efectos positivos en la absorción de minerales por parte de la planta. Se ha indicado que la absorción de NO₃⁻, NH₄⁺, PO₄²⁻, K⁺, Rb⁺ y Fe²⁺ inducida por *Azospirillum* es el factor responsable en incrementar la materia seca foliar y la acumulación de minerales en tallos y hojas (Barton *et al.*, 1986; Lin *et al.*, 1983, Murty y Ladha, 1988; Sarig *et al.*, 1988).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal estimulan el crecimiento del maíz e incrementan el peso seco hasta en un 30% más que en el maíz sin inocular y

tratado sólo con urea (García *et al.*, 1995). Las especies de *Azospirillum* son una alternativa para reducir la aplicación de FN sin efecto negativo en el rendimiento del maíz. (Caballero *et al.*, 1999), aunque tanto *A. lipoferum* como, *A. brasilense*, son específicos para ciertas variedades del maíz (Reis *et al.*, 2000). Sin embargo, las raíces del maíz pueden ser colonizadas por rizobacterias nativas del suelo, que desplazan con relativa facilidad a *A. lipoferum* y/o *A. brasilense*, pero que no tienen el efecto benéfico en el crecimiento y rendimiento del maíz (Fulcheri y Frioni, 1994; Pandey *et al.*, 1998).

Numerosos trabajos analizan los efectos de la inoculación con *Azospirillum* spp. en condiciones de campo sobre el contenido de nutrientes y el rendimiento de los cultivos. (Fulchieri y Frioni, 1994; Bhattarai, 1999; Dobbelaere *et al.*, 2002). Schulze y Pöschel (2004) afirman que un prerrequisito indispensable para el éxito de la inoculación es la proliferación de las bacterias en la rizosfera. Generalmente, los trabajos sobre colonización se han realizado en condiciones controladas y en sistemas gnotobióticos donde una sola cepa de bacterias interactúa con la planta hospedadora (Mantelin y Touraine, 2004). Son muy escasas las referencias sobre sobrevivencia y colonización de *Azospirillum* spp. inoculados en condiciones de campo (Fulchieri y Frioni, 1994; Bashan *et al.*, 1995; Kopp y Abril, 1997).

Las características básicas de la interacción *Azospirillum brasilense*-raíces y los diferentes parámetros críticos para obtener la inoculación exitosa, pueden mejorar la eficacia de los inóculos basados en *A. brasilense* bajo condiciones ambientales y del suelo variables, y de esta forma, estimular su utilización comercial en la producción agrícola en campo (Bashan y Holguin, 1997).

I.5.1.3. *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas es otro amplio género bacteriano, en el cual se encuentran especies con potencialidad para ser considerados PGPM. Han sido utilizadas con fines agronómicos en nuestro país *P. fluorescens* y *P. chlororaphis*, en ese orden de importancia. Los efectos atribuidos a este grupo bacteriano pueden resumirse en una acción de biocontrol, la secreción de sustancias inductoras y la solubilización de

nutrientes. Además, a las especies de *Pseudomonas* se les atribuye la capacidad de producir enzimas fosfatasas, ácidos orgánicos (i.e. ácido glucónico, cítrico) e inorgánicos (i.e. ácido sulfhídrico, nítrico, carbónico), que por medio de la rotura de enlaces y la acidificación del medio, incrementarían la recuperación del fósforo nativo del suelo y la adquisición del aportado por fertilización. (Ferrari, 2008). *P. fluorescens* exuda ciertos ácidos orgánicos que promueven incrementos en las concentraciones de fósforo en las inmediaciones de las raíces (Faggioli *et al.*, 2004).

Las condiciones ambientales (suelo, clima, fertilización, etc.) y las características de los microorganismos nativos e introducidos son factores determinantes para la sobrevivencia y actividad en la rizosfera (Bacilio-Jiménez *et al.*, 2001; Chotte *et al.*, 2002; Kaushik *et al.*, 2002; Tsagou *et al.*, 2003; Kozdroj *et al.*, 2004). Sin embargo, un estudio realizado sobre colonización rizosférica por *P. chlororaphis* mejorada genéticamente e introducida con fines de control biológico, demostró que no es posible predecir con exactitud la sobrevivencia en la rizosfera mediante un modelo que incluye características de suelo y abundancia de microorganismos nativos (Edge y Wyndham, 2002).

I.5.1.4. Micorrizas

Las micorrizas son asociaciones entre ciertos hongos del suelo y las raíces de las plantas y este término fue primeramente propuesto por el botánico alemán Albert Bernard Frank en el año 1885. Existen tres tipos de micorrizas: las ectomicorrizas, las ectendomicorrizas y las endomicorrizas; dentro de estas últimas las vesículo-arbusculares constituyen la simbiosis micorrízica más extendida sobre el planeta, tanto por el número de los posibles hospederos, como por su distribución geográfica. (Marta *et al.*, 1994.)

Se reconoce de las micorrizas su capacidad para mejorar la estructura del suelo gracias al crecimiento del micelio y la secreción de glomalinas (Faggioli *et al.*, 2008). Asimismo, actúan como una prolongación del sistema radicular (Peterson *et al.*, 2004), facilitando la adquisición de agua y nutrientes de baja movilidad como potasio (K), zinc (Zn) y especialmente P. Al incrementar el flujo de P a la raíz, de manera

indirecta se mejoran otros procesos fisiológicos en que participa este nutriente. Por su menor diámetro, las micorrizas tienen mayor superficie de absorción que las raíces del vegetal. Si bien utilizan P bajo las mismas formas que las plantas, tienen mayor afinidad por P y una concentración crítica en solución más baja para lograr su absorción (García *et al.*, 2006).

Las micorrizas obtienen por lo menos algunos de los azúcares de la planta, mientras la planta se beneficia de la captación de nutrientes minerales por la hifa fúngica. La influencia de las micorrizas sobre el consumo de nutrientes es importante. Es probable que esta mejora en la absorción de nutrientes se deba a la mayor superficie que proporciona el micelio. El efecto beneficioso que se obtiene del hongo micorrítico se observa mejor en suelos de baja fertilidad. El fósforo es uno de los nutrientes que las MA transportan a través de sus hifas hacia las plantas. (Miller y Allen 1992).

I.5.1.5. Rizobios

Estos microorganismos son capaces de fijar el dinitrógeno atmosférico mediante la asociación simbiótica con las leguminosas. En la antigua caracterización de estas bacterias, lo más importante era el rango hospedero de la leguminosa, aunque también se describían diferencias morfológicas y fisiológicas (Young y Haukka, 1996). Después de pasados 50 años, por primera vez se introdujeron cambios en la nomenclatura de los rizobios con la creación del nuevo género *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984), el cual incluye todas las cepas que forman nódulos en *Glycine max*, pero que no contemplaba la definición de otras especies, pues aunque el nuevo género estaba basado en caracteres fisiológicos que lo distinguen de *Rhizobium*, aún no se habían introducido completamente técnicas que podían establecer diferencias en el nivel genético (Young, 1996).

Sólo los estudios clásicos de Hellriegel y Wilfarth (1888) por primera vez establecieron claramente que eran microbios los que, en los nódulos radicales, permitían a las leguminosas obtener nitrógeno atmosférico mientras que otras plantas no podían. En 1890, Beijerinck aisló y cultivó exitosamente la bacteria a partir de nódulos, denominándola *Bacillus radicola*, casi al mismo tiempo, Frank (1889) la

había denominado *Rhizobium leguminosarum*, nombre que se mantiene actualmente (Young y Haukka, 1996; Sprent, 2001).

I.6. Características de algunos géneros representativos.

I.6.1. Género *Azorhizobium*

Es el género que forma nódulos efectivos en tallos y raíces de *Sesbania rostrata*, además de ser la rama más alejada de *Rhizobium* y sólo posee reconocida la especie *Azorhizobium caulinodans* (Dreyfus et al., 1998), aunque se han determinado otras (no clasificadas aún) mediante análisis de homología ADN-ADN (Rinaudo et al., 1991). La filogenia basada en los genes *nod* muestran que estos genes en *Azorhizobium caulinodans* son los más distantes en relación con todos los demás genes (Lindstrom et al., 1995). Es el único género que puede crecer con nitrógeno atmosférico en su estado libre de existencia (el término Azo se refiere a Nitrógeno) (Sprent, 1994). Posee una gran definición en cuanto a su posición filogenética con respecto a *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, donde se encuentra alejado del primero (Young, 1996).

Las bacterias denominadas comúnmente rizobios presentan varias formas de vida; pueden comportarse como saprófitos en el suelo, establecer una asociación simbiótica y formar nódulos con las raíces y tallos de las leguminosas, o bien estar presentes como endófito en raíces de diferentes especies vegetales, donde ejercen efectos promotores del crecimiento (Wang *et al.* 2001).

I.6.2. Género *Mesorhizobium*.

Este nombre fue propuesto basado en el hecho de que muchas cepas (aunque no todas) en sus especies crecen con tasas de crecimiento que median entre las típicas especies rápidas (*Rhizobium*) y especies lentas (*Bradyrhizobium*). Generalmente, los genes *nod* y *nif* en este género son cromosómicos (Young, 1996).

I.6.3. Género *Sinorhizobium*.

Las cepas son productoras de ácido y son de rápido crecimiento. Al igual que *Rhizobium*, contienen los genes nod, nif y los que controlan la especificidad de la infección radicular (hen) en los plasmidios de gran longitud (pSym) (Somasegaran y Hoben, 1994). Este género fue segregado de cepas de rizobios que forman nódulos en *Glycyne max*, específicamente *Rhizobium fredii*, los cuales presentaban características fenotípicas muy diferentes de las otras especies de *Rhizobium* y de ahí surgió la propuesta de las especies *Sinorhizobium fredii*, *Sinorhizobium melloti* y *Sinorhizobium xinjiangensis* (Chen et al, 1988). Pero surgieron también las especies *Sinorhizobium saheli* y *Sinorhizobium teranga* (esta última especie aparece indistintamente como teranga o terangae en otras referencias), así como *Sinorhizobium medicae* (Rome et al, 1996); *Sinorhizobium arboris* (Nick et al, 1999) y *Sinorhizobium kostiense* (Nick et al, 1999).

I.6.4. Género *Bradyrhizobium*.

Las células bacterianas de este género son aerobias, Gram-negativas, con un flagelo polar o subpolar, su crecimiento en medio enriquecido con levadura es pobre y lento, son pleomórficas y no forman esporas (Jordan y Allen, 1980). Pueden formar colonias de tipo seco, opacas y frecuentemente punctiformes (La Favre et al., 1991).

Bradyrhizobium es el género de rizobio de lento crecimiento y probablemente el más antiguo, pues es el único rizobio con representantes fotosintetizadores y parientes que no son diazótrofes simbiotes pero que sí fotosintetizan como lo es el género *Rhodopseudomonas*. (Molouba et al., 1999).

La formación de polisacáridos extracelulares es común en *Bradyrhizobium*, así como para todos los géneros (Jain et al., 1990), al igual que la presencia de gránulos de poli- β -hidroxibutirato, polímero que aún sin constituir un lípido, absorbe los colorantes lipofílicos.

Los bradyrizobios son productores de álcali, lo cual puede estar relacionado a que las cepas de este género son generalmente más tolerantes a los suelos ácidos que las de rápido crecimiento (Bordeleau y Prévost, 1994). Requieren de 3-5 días para provocar turbidez moderada en medio líquido y tienen un promedio de multiplicación de 6-8 h. Muchas cepas crecen mejor en pentosa como única fuente de carbono (Somasegaran y Hoben, 1994) a pesar de que Elkan y Kuykendall (1981) concuerdan que la arabinosa es la fuente de carbono preferida por las especies de este género.

Teaney III y Fuhrmann (1993) determinaron que la presencia de NO_3^- en el suelo puede reducir el efecto de este aminoácido en la planta. El género *Bradyrhizobium* presenta una gran heterogeneidad, la cual ha servido como base para la propuesta de varias especies, como son *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992), *Bradyrhizobium liaoningense* (Young y Haukka, 1996) y *Bradyrhizobium* sp. (Young, 1996).

No hay especies definidas aún para este grupo, solamente son conocidas como *Bradyrhizobium* sp., seguido por el género de la leguminosa hospedera. (Young y Haukka, 1996).

I.6.5. Género *Rhizobium*.

Son células aerobias, Gram negativas, en forma de bastón, colonias de crecimiento rápido y producción de ácido (Vincent, 1970). Algunas cepas de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium trifolii* (posteriormente *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* [Jordan, 1984]) contienen con frecuencia gránulos metacromáticos (en células jóvenes), son mótils, con flagelos polares o peritricos y se tiñen fácilmente con las tinturas básicas simples, aunque las más viejas necesitan más tiempo para absolver el tinte y tienen zonas no teñidas (de polihidroxitirato), lo cual les da un aspecto lisado. (Hamdi, 1985)

Con la excepción de *Rhizobium loti* (posteriormente *Sinorhizobium meliloti*) que posee ADN cromosómico, en el resto de las especies la información genética para la

nodulación (genes *nod*) y para la fijación del nitrógeno (genes *nif*), se encuentran en los plasmidios (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996). Se ha dado a conocer que estos componentes genómicos presentan rangos de 150 hasta 1500 kb (Martínez-Romero y Palacios, 1990).

I.7. Reseña y efecto de los rizobios como biofertilizantes.

Los rizobios son un grupo parafilético que se encuentran en dos clases de proteobacteria (las proteobacterias alpha y beta). Como se nota más abajo, la mayoría pertenece al orden Rhizobiales pero varios de los rizobios ocurren en distintos órdenes de las proteobacterias. (<http://es.wikipedia.org/wiki/ambiente>. 2011. Consultado el 7 de mayo de 2012).

Muchos autores señalan que los rizobios (rizobacterias conocidas comúnmente como bacterias dinitro fijadoras en simbiosis con las leguminosas) pueden colonizar e influir en el crecimiento de las plantas no leguminosas (Antoun *et al.*, 1998).

Aunque mucho nitrógeno es removido cuando se cosechan los granos ricos en proteína o el heno, cantidades significativas pueden permanecer en el suelo para futuros cultivos. Esto es especialmente importante cuando no se usan fertilizantes nitrogenados como en los esquemas de secuencias de cultivos en la agricultura orgánica o en países menos industrializados. Por lo general, el nitrógeno es el nutriente más comúnmente deficitario en muchos suelos del mundo y el más comúnmente agregado al suelo. La fertilización nitrogenada a través de fertilizantes tiene fuertes impactos medioambientales. En cambio, la fijación de nitrógeno por estas bacterias es muy beneficiosa para el ambiente. (<http://es.wikipedia.org/wiki/ambiente>. 2011. Consultado el 7 de mayo de 2012).

I.8. Inoculante bacteriano a base de cepas de rizobios.

Rizobio es una bacteria que fija el nitrógeno atmosférico sólo cuando se encuentra en simbiosis con las leguminosas. El producto con rizobios se presenta en forma líquida o sólida. Este se utiliza para leguminosas de grano (Maní, frijol, soya) y para

leguminosas de pastos (*leucaena, glicine*). Las plantas obtienen por esta vía entre el 50 y el 75% del nitrógeno que necesitan para su desarrollo, floración y fructificación. Obteniéndose como beneficios el ahorro del 75% del fertilizante mineral nitrogenado necesario para garantizar el ciclo vegetativo de los cultivos, incrementa el rendimiento hasta un 10% y evita la degradación química de los suelos, la contaminación del entorno ecológico y el manto freático que producen los fertilizantes minerales (Anon, 2007. <http://mubr.asm.org/2/attachment2.htm>. Consultado el 12 de octubre de 2011).

Las especies y géneros de rizobios que nodulan en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) son muy específicas, solamente forman nódulos en especies del género *Cicer* y algunas especies del género *Sesbania*. Los nódulos deben aparecer en la planta aproximadamente a los 20 días después de la siembra e inoculación y las plantas pueden nodularse en condiciones de infección natural si la temperatura interna del suelo es mantenida por debajo de los 30° C (Rupela y Dart, 1989).

Esta asociación entre rizobios y plantas no leguminosas puede mejorar el crecimiento de las plantas, aunque no se ha demostrado que sea mediante la fijación del nitrógeno, sino por la producción de fitohormonas que estimulan y promueven el crecimiento vegetal, así como sus rendimientos agrícolas, Estas bacterias son utilizadas ampliamente en el mundo para el incremento de la producción de grano y forraje, con un ahorro sustancial de divisas y una contribución significativa al cuidado del medio ambiente. De acuerdo con investigaciones recientes, estas bacterias pueden colonizar también las raíces de las plantas no leguminosas. La infección rizobiana en dichas especies probablemente sea más común en la naturaleza que lo que se consideraba (Matiru y Dakora, (2004). Diversos autores citados por Antoun y Prevost (2005), han observado que la inoculación con *Rhizobium leguminosarum* incrementó de forma significativa la materia seca aérea de Maíz, Trigo de primavera y Cebada de primavera.

Chabot *et al.* (1996), Yanni *et al.* (2001) y Perrine *et al.* (2004), entre otros, sostienen que las hormonas promotoras del crecimiento como el ácido indolacético, las

giberelinas y las citoquininas producidas por los rizobios, presentes ya sea en la rizosfera o en los tejidos de las plantas estimulan el mayor desarrollo de la raíz y realizan la capacidad de absorción de nutrientes de la raíz en beneficio de la planta no leguminosa.

Acorde con lo expresado por Matiru y Dakora (2004), la infección rizobiana en las plantas no leguminosas es más común en la naturaleza que lo que se pensaba anteriormente. A pesar de que en varias instituciones en el extranjero se han realizado estudios con rizobios en diferentes especies, en Cuba sólo se conocen los beneficios de la inoculación en plantas de maíz, con cepas nativas de *Bradyrhizobium sp.* procedentes de los ecosistemas ganaderos de Sancti Spíritus (Bécquer *et al.*, 2008), por lo que se considera que esta investigación es novedosa para el país.

Dentro de los mecanismos por los cuales las rizobacterias pueden manifestar su acción se destacan la producción de compuestos indólicos, atribuyéndose a los mismos incrementos en el desarrollo y rendimiento de diversas especies de plantas. (Hernández *et al.*, 2004).

La literatura revela la imperiosa necesidad de conocer el impacto del inóculo en las comunidades microbianas rizosféricas y en su estructura, así como su posterior evolución en el tiempo con respecto a la comunidad original. Asimismo, se debe comprobar que el efecto promotor del crecimiento demostrado sobre la planta en condiciones anéxicas se mantiene en presencia de otros microorganismos, en otros sustratos, en distintas condiciones ambientales, y si este efecto es extensible a otras especies vegetales. En este sentido existen numerosos estudios, en los que se evalúan bacterias que son promotoras del crecimiento de una determinada especie vegetal sobre otras especies, y no siempre son capaces de promover el crecimiento (Bashan, 1998). En el caso de la investigación que nos ocupa, el tema en cuestión está centrado en el efecto positivo de los rizobios sobre los cereales, donde se infiere que la utilidad de estos microorganismos no se centran en alguna característica en específico, sino en el sinergismo de todas sus características fisiológicas en relación

con la planta. Tanto la producción de fitohormonas, como las cantidades mínimas de N_2 que se puedan fijar fuera de la simbiosis, la capacidad de emisión de sideróforos, o de sustancias solubilizadoras de fosfatos entran en el marco posible de acciones.

I.9. Sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (acrónimo en inglés: PGPR) comenzaron a ser aisladas, clasificadas y estudiadas hacia fines del siglo XIX. Durante el siglo XX se profundizaron los conocimientos sobre las características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y genéticas de cada uno de estos grupos bacterianos. Es a partir de fines del siglo pasado y principios del actual siglo XXI, cuando comenzaron evaluarse estos microorganismos bajo condiciones extensivas de campo con el propósito de estudiar sus efectos benéficos sobre el crecimiento y desarrollo de los cultivos. Los microorganismos descubiertos y estudiados son numerosos y sabemos que quedan muchos por aislar e investigar. No obstante ello, hoy disponemos de grupos bacterianos que son capaces de proporcionarnos impactos productivos interesantes en cultivos como el maíz. Uno de éstos es el de *Pseudomonas* sp, y particularmente, un pequeño grupo de cepas denominadas *Pseudomonas fluorescens* (González, 2009). Estas últimas nos han demostrado a través de numerosos experimentos que son capaces de:

1. Incrementar la capacidad de solubilizar el fósforo del suelo no disponible para las plantas. Ello se logra a través de la producción de importantes cantidades de fosfatasas y ácidos orgánicos, desde las fracciones orgánica e inorgánica del suelo, como así también, de aquel que es aportado por los fertilizantes fosforados.
2. Incrementar la producción de fitohormonas que mejoran la plasticidad de la pared celular, promueven la elongación de las células radiculares y fundamentalmente dilatan la senescencia del sistema radical. De esta manera se mantienen las raíces activas por más tiempo de manera de aumentar la captación de agua y nutrientes.

3. Incrementar la resistencia a diferentes patógenos como *Fusarium graminearum* y *Fusarium verticilloides*, a través de la producción de antibióticos y sideróforos. (González, 2009).

(<http://www.engormix.com/rizobacter-argentina/sh12255-comercialización.hym>. Consultado el 8 de mayo de 2012).

Los principales mecanismos de las Rizobacterias además de la fijación de nitrógeno atmosférico (Döbereiner *et al.*, 1995), la solubilización de minerales (Crowley *et al.*, 1991) y la producción de sustancia reguladora del crecimiento, contribuyen al incremento del volumen de las raíces (Bowen y Rovira, 1999), la inducción de resistencia sistémica a patógenos (Van Peer *et al.*, 1991), inhibición del crecimiento de organismos patógenos (Utkhede *et al.*, 1999) y la interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Bashan *et al.*, 1996).

Las rizobacterias colonizan de forma agresiva las raíces de las plantas. Aquellas que reciben el nombre de bacterias promotoras del crecimiento vegetal son una pequeña porción (2-5%) de las rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas (Antoun y Kloepper, 2001). Este proceso estimulante puede ser beneficioso, para aquellas plantas que tradicionalmente han sido sometidas a altas dosis de fertilizantes inorgánicos por su efecto esquilante en el suelo. Entre éstas, se encuentran los cereales. Existen criterios conservadores, como el de Cocking (2004), quien considera que en la mayoría de los casos, la bacteria coloniza sólo la superficie de la raíz de los cereales y queda vulnerable a la competencia de otros microorganismos. No obstante, Bécquer *et al.*, (2006) han demostrado los beneficios de la inoculación de plantas de trigo con cepas nativas de *Bradyrhizobium* sp., procedentes de ecosistemas ganaderos de Sancti Spíritus, Cuba.

Estas bacterias se caracterizan por su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje de las plantas. La estimulación indirecta del crecimiento de plantas incluye una variedad de mecanismos por los cuales la bacteria inhibe la acción fúngica sobre el crecimiento y desarrollo de la planta (Hassan *et al.*, 1997; Essalmani y Lahlou, 2003).

Particularmente en Cuba, se han realizado un grupo de ensayos para el uso de biofertilizantes a base de bacterias promotoras de crecimiento vegetal con resultados importantes en especies como *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter*, *Gluconobacter diazotrophicus*, *Burkholderia cepacia* y *Pantoea* sp, los cuales marcan líneas de investigaciones futuras para los cultivos. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal favorecen a las plantas a través de diferentes mecanismos que se pueden resumir en: la fijación biológica del nitrógeno, síntesis de fitohormonas como las auxinas fundamentalmente el ácido indolacético (AIA), promoción del crecimiento de la raíz y proliferación de pelos radicales, mejora de la absorción de agua y nutrientes, solubilizan los fosfatos di y tricálcicos y otros minerales, inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos y producen sideróforos, que son los iniciadores de la resistencia sistémica inducida (Torriente, 2010).

Otro factor importante por el cual las rizobacterias ayudan a las plantas es que existen ciertas especies que las hacen nutrirse mejor; por ejemplo, *Pseudomonas* spp., las cuales, al solubilizar algunos nutrientes poco móviles del suelo, como el fósforo, mejoran el ingreso de este macronutriente hacia la planta, lo que se traduce en una mayor cantidad de biomasa. Otras especies, como *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp., aumentan el aporte de nitrógeno, influyendo directamente en el crecimiento, desarrollo y rendimiento. Recientes investigaciones demuestran que existen algunos mecanismos indirectos que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas, como la producción de ciertos metabolitos que, al funcionar como antagonistas de microorganismos perjudiciales, hacen que las plantas se desarrollen en un ambiente idóneo libre de patógenos y tengan un mayor crecimiento y desarrollo. (Hernández *et. al.*, 2003).

El uso a gran escala de estos microorganismos (rizobacterias) como biofertilizantes en cualquier sistema de producción agrícola traería grandes beneficios, puesto que son más baratos que los de origen inorgánico, tiene efectos positivos en las plantas (similares a los de un fertilizante químico) y no ejercen un impacto ecológico perjudicial en el ambiente ni en la salud humana. Adoptar este tipo de innovación tecnológica que se inclina hacia la conservación del ambiente, incrementará la

productividad de los cultivos y bajará los costos de producción, contribuyendo, en suma, a una agricultura sustentable que trata de usar los recursos naturales con respeto al ambiente y sin comprometer a nuestras generaciones futuras. (Hernández *et al.*, 2003).

La reducción progresiva del uso de fertilizantes y pesticidas, solamente es posible mediante el empleo de tecnologías limpias, las cuales incluyen el uso de plantas mejoradas genéticamente y de biofertilizantes. Este último método que consiste en el uso de inóculos fúngicos y bacterianos sobre el sustrato edáfico en el que se desarrollan las plantas o sobre la semilla antes de la siembra, constituyen uno de los sistemas biotecnológicos con más futuro para la mejora de la producción vegetal, evitando los efectos secundarios de los métodos actuales de fertilización y protección frente a plagas. Las bacterias rizosféricas promotoras del crecimiento vegetal pueden utilizarse como agentes protectores frente a diversos patógenos (Cook, 2002); fertilizadores del suelo gracias a su capacidad para movilizar nutrientes; productores de fitohormonas que modifican la fisiología de las plantas, permitiendo optimizar los procesos de floración, germinación y establecimiento de la plántula; Gutiérrez-Mañero *et al.*, (2001); por su efecto sobre el establecimiento de simbiosis, proceso de extrema importancia ecológica, como son las establecidas por *Frankia* con plantas no leguminosas, y en la alimentación humana, como las establecidas entre *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* con leguminosas.

El productor agropecuario que inocula con bacterias rizosféricas espera resultados equivalentes a los obtenidos con la inoculación de leguminosas con rizobios. Sin embargo, existen marcadas diferencias entre ambos microorganismos que se relacionan con el grado de interacción con la planta. A diferencia de las bacterias simbióticas que se encuentran dentro de la raíz, la colonización por organismos rizosféricos está fuertemente afectada por las condiciones de medio ambiente edáfico (Saubidet *et al.*, 2002; Dobbelaere *et al.*, 2002; Reis Jr. *et al.*, 2004), lo que podría ser la causa de los resultados contradictorios y variables encontrados en inoculaciones realizadas en condiciones de campo.

Capítulo II.

II. Materiales y Métodos

II.1. Procedencia de las cepas de rizobios

Para el experimento fueron utilizadas 10 cepas procedentes de leguminosas naturalizadas de Sancti Spíritus, Cuba, (*Centrosema*, *Neonotonia* y *Stylosanthes*). Estas cepas fueron confirmadas en trabajos anteriores como rizobios y ubicadas taxonómicamente en el género *Bradyrhizobium* sp. (Bécquer, 2002). Se utilizaron, así mismo, 3 cepas comerciales pertenecientes a diferentes géneros y especies de rizobios (Tabla I), donadas por laboratorios de Agriculture and Agri-Food Canada (Québec, Canadá).

Tabla I: Listado de cepas cubanas y comerciales utilizadas en el experimento

Cepas de rizobios	Género y especie
Nativas	
JJ4	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
JJ2	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
SP21	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
SP6	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
HA1	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
HG2	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
SP20	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
TE4	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
SP12	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
JK1	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
Comerciales	
ATCC10317	<i>Bradyrhizobium lupini</i>
61B7	<i>Sinorhizobium fredii</i>
25B6	<i>Bradyrhizobium</i> sp.

II.2. Procedencia de la semilla de maíz

Se utilizó la variedad híbrida de maíz T-66 (*Zea mays* L.), procedente de la Empresa de Semillas de Sancti Spíritus, y que respondía a los intereses agrícolas del momento en la provincia Sancti Spíritus.

II.3. Procedimiento experimental

II.3.1. Preparación de los inóculos e inoculación de las semillas

Las cepas crecieron en medio sólido levadura-manitol (Vincent, 1970) y resuspendidas en medio líquido levadura-manitol hasta lograr una concentración celular de 10^6 – 10^8 UFC/mL.

La inoculación fue realizada mediante la inmersión de las semillas por 24 horas en el inóculo a temperatura ambiente y que posteriormente se secaron a la sombra para su siembra inmediata. Para el control no inoculado y el control fertilizado (no inoculado) se utilizó solamente el medio líquido levadura-manitol.

La reinoculación de los tratamientos se efectuó a los 20 días de sembrado, con el fin de asegurar una presencia efectiva de las bacterias en la rizosfera, para la colonización radical, con un inóculo bacteriano en cantidad aproximada de 10 mL/planta, que contenía 10^6 – 10^8 UFC/mL. Para ello se reinoculó con una mochila aspersora, con la cual se dirigió el surtidor de la mochila a la base del tallo de la planta. Esta actividad se llevó a cabo en horas frescas de la mañana para evitar la desecación excesiva del inóculo.

II.3.2. Siembra del experimento

El experimento se sembró en el periodo comprendido de enero-marzo en un área perteneciente a la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spíritus ($21^{\circ} 53' 00''$ de latitud norte y los $79^{\circ} 21' 25''$ de longitud oeste y 40 msnm).

Los datos climáticos de la zona durante los meses que duró el experimento (tabla II) muestran temperaturas medias que oscilan entre 20,8 y 23,8 °C, y entre 27,4 °C y 30,4 (temperatura máxima promedio), así como la precipitación acumulada fue de 29,3 mm para los meses de enero, febrero y marzo.

Tabla II: Comportamiento de las variables climáticas durante el período experimental

Mes	T media (°C)	T máx absoluta (°C)	Humedad Relativa media (%)	Lluvia total mes (mm)	Lluvia máx 24 horas (mm)
Enero	20.8	31.6	74	-	-
Febrero	20.9	32.3	73	-	-
Marzo	23.8	34.4	74	29.3	12.6

II.3.3. Dosis de siembra

La dosis de siembra fue de 10 kg/ha. El marco de siembra usado fue de 70 cm entre surco, sembrado a chorrillo espaciado. Cada parcela medía 3 m x 15 m. Se aplicaron 4 riegos. A los 90 días de siembra se realizó la cosecha de forma manual. Se realizaron labores convencionales de cultivo: roturación, grada, cruce, recuce, grada, surcado.

II.3.4. Tipo de suelo

El suelo del área experimental correspondió al tipo Aluvial (Anon, 1979) (tabla III), lo cual corresponde a lo informado por Hernández *et al.* (1999) para este tipo de suelo.

Tabla III: Composición agroquímica básica del suelo experimental.

Tipo de suelo	P ₂ O ₅ (mg/100 g)	K ₂ O (mg/100 g)	Materia Orgánica (%)	pH
Aluvial (Anon, 1979)	2,63	10,00	1,61	5,4

II.3.5. Fertilización inorgánica del experimento

Se realizó una fertilización de fondo (N: 9, P: 13, K: 17) a los 21 días a todos los tratamientos con una dosis de 80 kgN/ha, donde se incluyó al control no inoculado y al control fertilizado. Aunque Mantelin y Touraine (2004) indicaron que los rizobios pueden incrementar el acceso de nutrientes a través de la estimulación del sistema de captación de iones de la planta, las características agroquímicas del suelo experimental se tuvieron en cuenta para hacer dicha fertilización y así estimular el crecimiento de las plantas de todos los tratamientos en sus primeras fases fenológicas.

II.3.6. Control de plagas y enfermedades

De manera profiláctica, se realizaron 3 aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* biovar. 26, a partir de los 15 días de siembra, cada 7 días, a razón de 6,0 L/ha. El biopreparado se aplicó con una mochila aspersora con el surtidor dirigido a todas las partes de la planta, con énfasis en la parte foliar, en una dilución con agua de 1:15 hasta llegar a 16 L de volumen total con un título inicial de 10⁹ esporas/mL (Anon., 2008).

II.3.7. Diseño experimental y análisis estadístico

Se aplicó un diseño experimental de bloques completamente aleatorizados (Somasegaran y Hoben, 1994), con 15 tratamientos (13 de éstos, inoculados) y 4 réplicas. Existió un control no inoculado y el control fertilizado consistió en una aplicación de Nitrógeno de 150 kg/ha (NH₄NO₃).

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente al utilizar análisis de varianza (ANOVA) (StatGraphics Plus, v. 5.1, 1994-2001, Statistical Graphics Corporation). Las diferencias entre medias fueron halladas por la prueba LSD (Least Significant Difference) de Fisher ($p < 0,05$). Los datos de la variable con conteo de dígitos (número de mazorcas/planta) fueron transformados por \sqrt{x} (Lerch, 1977). Se construyó un dendrograma mediante el método Ward, (distancia City-Block).

II.3.8. Variables evaluadas

Se evaluaron las siguientes variables agroproductivas: peso seco aéreo (PSA, g/parcela), longitud del tallo (LT, cm), número de mazorcas/planta (NM) y peso de las mazorcas (PM, kg/mazorca), así como el índice de efectividad de la inoculación (IEI), sobre la base del PSA, expresado en porcentaje (Davies *et al.*, 2005), el cual se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\text{IEI: } [\text{Tratamiento inoculado-Control no inoculado/Control no inoculado}] \times 100$$

Capítulo III

III. Resultados y discusión

III.1. Peso seco aéreo e índice de efectividad de la inoculación:

En la actualidad, la agricultura sustentable plantea mejorar la eficiencia de la fijación del nitrógeno mediante el uso de plantas leguminosas y rizobios competitivos, capaces de ser usados en biorremediación y fitorremediación y de esta manera extender las ventajas de la simbiosis a otros cultivos; en tal sentido, las investigaciones se han orientado al estudio del rizobios como promotores del crecimiento en plantas leguminosas y no leguminosas, (Santillana *et al.*, 2005).

Es conocido que los rizobios producen fitohormonas que promueven el crecimiento vegetal y, posiblemente, incrementen los rendimientos a pesar de no haber sido detectada alguna fijación de N₂ en las especies no pertenecientes a la familia de las leguminosas (Matiru y Dakora, 2006). Höflich *et al.* (1994) observaron que la inoculación con *R. leguminosarum* incrementó de forma significativa la materia seca aérea del maíz, del trigo de primavera y de la cebada de primavera.

En el presente experimento, en la variable peso seco aéreo (fig. 1) se observó que todos los tratamientos inoculados presentaron valores estadísticamente superiores ($p < 0,05$) al control absoluto (0,48 kg/parcela), lo cual, en los tratamientos más sobresalientes representó un IEI (fig. 2) de 43,8% (JJ4: 0,69 kg/parcela); 41,7% (JJ2 y SP20: 0,68 kg/parcela) y 45,8% (25B6: 0,70 kg/parcela).

Estos resultados superan en gran medida a los obtenidos por Bécquer *et al.* (2008), en experimentos de invernadero con maíz (variedad local Canadiense 2338 F15), con tratamientos inoculados con cepas pertenecientes al mismo género que las del presente experimento (*Bradyrhizobium*), aisladas de ecosistemas ganaderos de Cuba; y a los de Bécquer *et al.* (2008) en experimentos de invernadero, con igual variedad de maíz que el anterior; y tratamientos inoculados con cepas pertenecientes

a los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, aisladas de ecosistemas ganaderos canadienses.

Dichos datos también fueron superiores a los obtenidos por Antoun y Prévost (2000), con la cepa P31 de *R. leguminosarum* al ser inoculada en maíz y los resultados obtenidos por Bhattacharjee *et al.* (2008), de un incremento de 20 % de PSA, al inocular *Bradyrhizobium* en arroz. Zamora y Martínez-Romero (2001) obtuvieron incrementos de 20-45 % en el PSA de maíz inoculado con *R. etlii*, lo cual hace muy similares los resultados obtenidos con la aplicación de *Bradyrhizobium* en maíz.

Por otra parte, estos mismos resultados son comparables con los obtenidos por Hafeez *et al.* (2004), al inocular plantas de algodón con cepas de *Rhizobium leguminosarum*, bv. trifolii. Aunque la familia vegetal es diferente, el hecho es que los cultivos estudiados tampoco pueden aprovechar las bondades de la fijación simbiótica del nitrógeno, por no disponer de las bases genéticas-bioquímicas necesarias para la formación de nódulos radicales, por lo que las ventajas de la aplicación de inoculantes bacterianos deben estar basadas principalmente en el efecto promotor del crecimiento vegetal de las cepas aplicadas, el cual puede variar de acuerdo al género de rizobio utilizado.

Es de destacar que el PSA de los tratamientos inoculados con las cepas JK1 (0,57 kg/parcela) y SP21 (0,51 kg/parcela), aunque no fueron los más sobresalientes en el peso seco aéreo; al presentar un IEl de 18,8% y 6,3% (fig. 2), coincidieron en cierta medida con los incrementos logrados por Bécquer *et al.* (2007) en maíz bajo condiciones semi-controladas con estas mismas cepas, lo cual indica necesariamente que se efectuó una correcta selección de las mismas y que el efecto de promoción del crecimiento vegetal se mantuvo estable a pesar de la diferencia de ambiente y de variedad de maíz.

Los valores del PSA en los tratamientos inoculados con las cepas nativas JJ4 (0,69 kg/parcela), JJ2 (0,68 kg/parcela), SP6 (0,62 kg/parcela), HA1 y HG2 (0,64 kg/parcela, cada uno), SP20 (0,68 kg/parcela), TE4 (0,61 kg/parcela); así como de los tratamientos inoculados con las cepas comerciales 25B6 (0,70 kg/parcela) y ATCC 10317 (0,62 kg/parcela), mostraron superíndices comunes con el control fertilizado (0,70 kg/parcela), resultado éste no logrado por los autores anteriormente mencionados (fig. 1) .

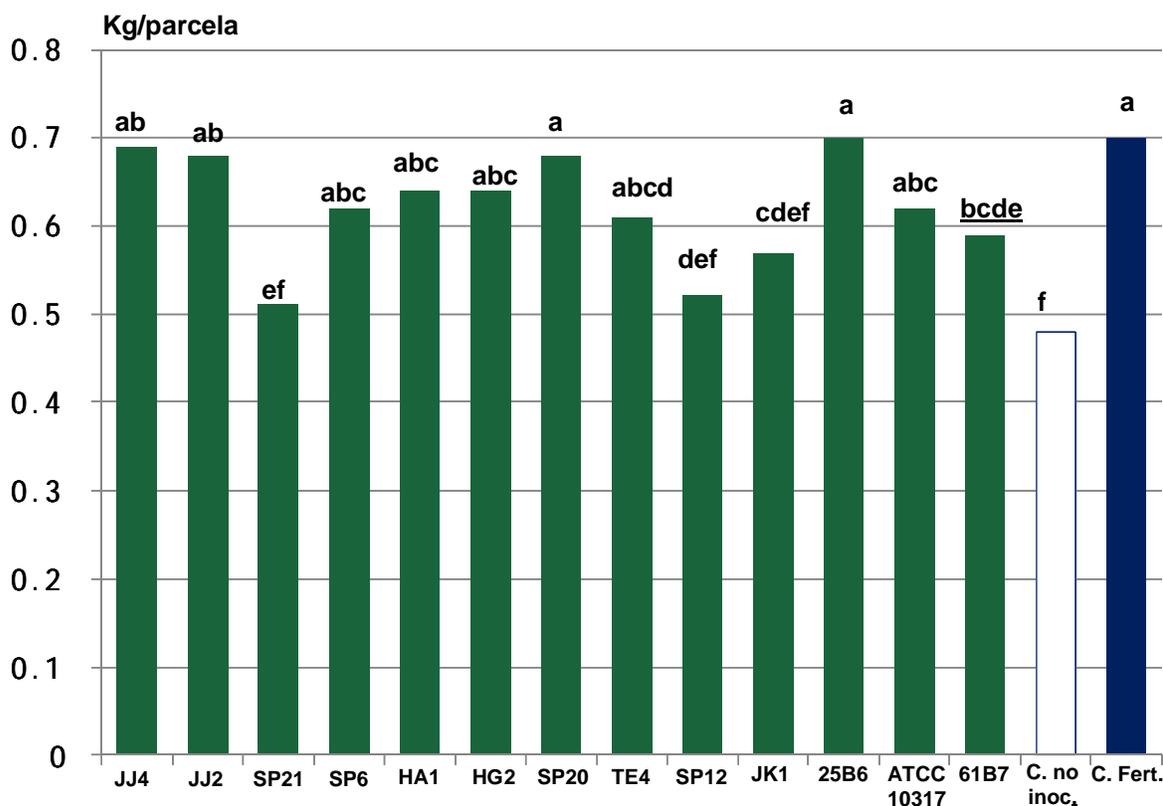


Fig. 1: Peso seco aéreo de maíz inoculado con rizobios nativos y comerciales (D. E.: 0.085, $p < 0,05$).

Los aumentos en el PSA, mostrado en el IEl (fig. 2) al aplicar las cepas de rizobios no debe asombrar, toda vez que Gutiérrez y Martínez (2001) encontraron incrementos de 42% de la materia seca de la parte aérea y de 49% de la materia seca de raíz en plantas de maíz inoculadas con *Rhizobium etli*. Reyes *et al.* (2008), en un experimento con maíz inoculado con diferentes bacterias rizosféricas, encontraron aumentos significativos de N en el tejido aéreo con la inoculación de *Rhizobium sp.* También, Biswas *et al.* (2000) observaron que la inoculación con

rizobios en diferentes variedades de arroz aumentó la conductancia estomática, lo que resultó en un incremento de la tasa fotosintética en un 12%.

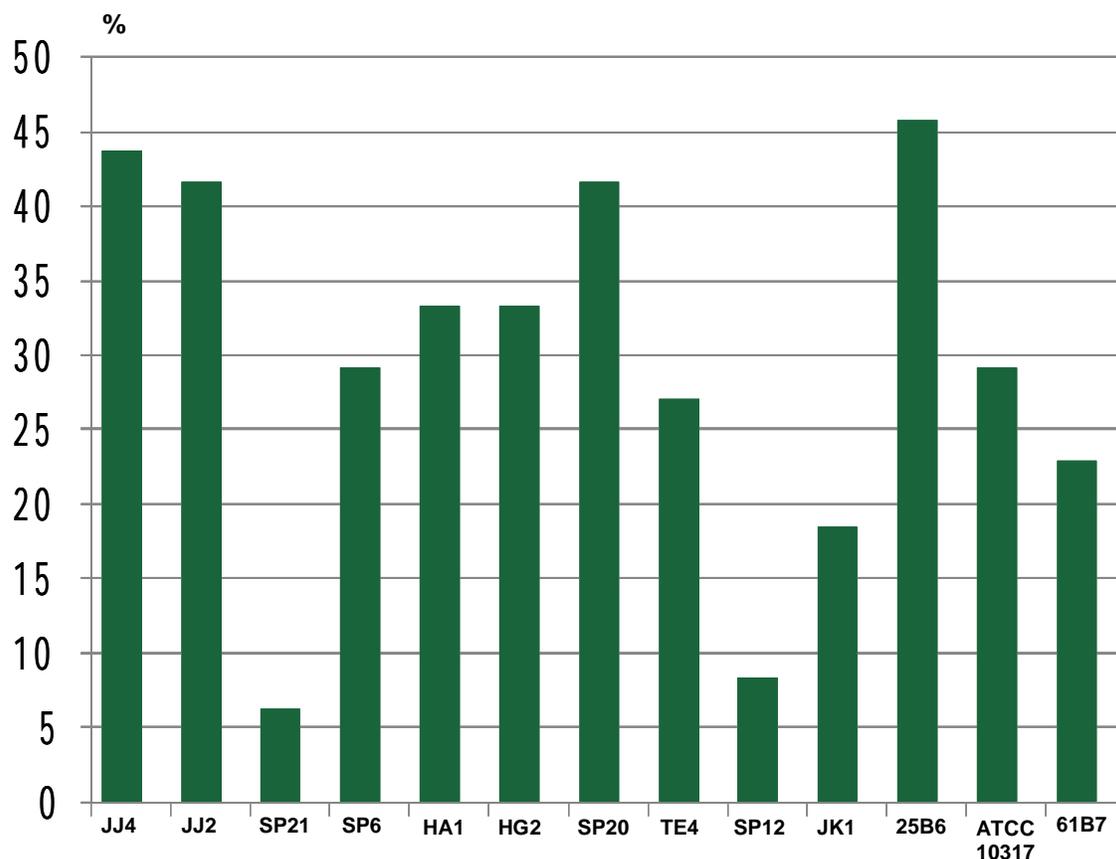


Fig. 2: Índice de Eficiencia de la Inoculación de las cepas aplicadas en el experimento sobre la base del PSA.

III.2. Longitud del tallo:

En la variable longitud del tallo (fig. 3), aunque sólo el tratamiento inoculado con la cepa nativa SP20 (2,09 m), resultó estadísticamente superior al tratamiento fertilizado (1,99 m), los 10 tratamientos inoculados restantes fueron estadísticamente superiores ($p < 0,05$) al control absoluto (1,75 m), lo cual se puede considerar un resultado positivo, ya que se comprueba el efecto de los rizobios en el crecimiento vegetal.

Según Dobbelaere *et al.* (2003), los rizobios entre otros diazótrofos, son capaces de producir vitaminas hidrosolubles del grupo B, lo cual es también un factor que estimula el factor de crecimiento de las plantas, específicamente la longitud del tallo, la producción de materia seca y la capacidad de absorción de nutrientes.

Casán *et al.* (2009) observaron que una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* produjo cantidades significativas de ácido giberélico, el cual es un factor promotor del crecimiento del tallo en las plantas. Según Hoflich (1999), *R. leguminosarum* bv. trifolii R39 estimuló el crecimiento de maíz, trigo y cebada en un experimento en suelo arenoso.

Las bacterias diazotróficas pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Azotobacter* y *Azospirillum*, han sido consideradas de importancia agrícola por su acción como PGPRs al producir fitohormonas como las auxinas, citocininas, giberelinas y ACC-deaminasa, sustancias que favorecen el desarrollo del sistema radical y el crecimiento de las plantas (Dobbelaere *et al.*, 2003). Esto ocurre por un aumento de la división celular al alargar la raíz y promover la formación de pelos radicales, y en consecuencia, la resistencia al estrés osmótico por aumento de clorofila, K, Ca, azúcares solubles y contenido de proteínas (Kennedy *et al.*, 2004). Por lo que no se descarta tampoco el papel que puede jugar en la elongación del tallo la enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC)-deaminasa que producen las rizobacterias, entre ellas, los rizobios.

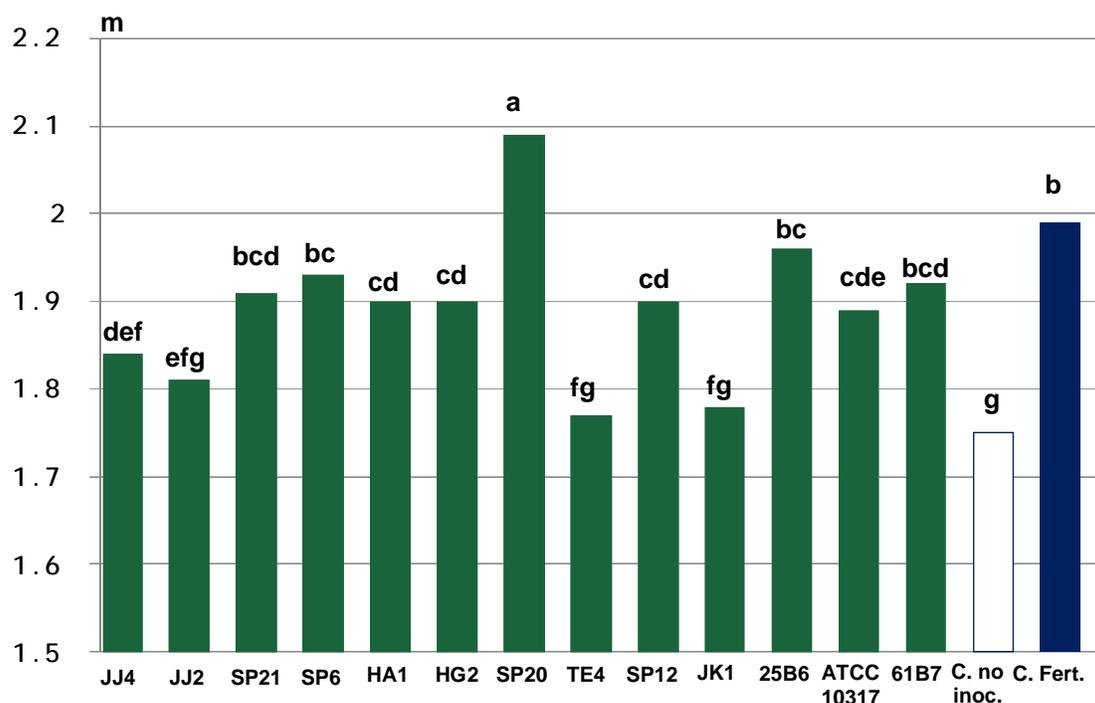


Fig. 3: Longitud del tallo de maíz inoculado con rizobios nativos y comerciales (D. E.: 0.097 p<0,05).

III.3. Número y peso de las mazorcas:

El número de mazorcas (fig. 4) no arrojó ningún valor con diferencias significativas, al parecer, esta variable pareció depender estrictamente del genotipo vegetal. Según Salantur *et al.* (2006), así como Matiru y Dakora (2006), el aumento de los rendimientos mediante el empleo de bacterias asociativas requiere de las combinaciones más correctas entre los genotipos vegetales y de cepas específicas. Mantelin y Touraine (2004) indicaron que estas bacterias pueden incrementar el acceso de nutrientes a través de la estimulación del sistema de captación de iones de la planta, lo cual necesariamente debe estar vinculado a especificidades del genotipo vegetal. Otros experimentos en esta temática son altamente recomendados de realizar en el futuro.

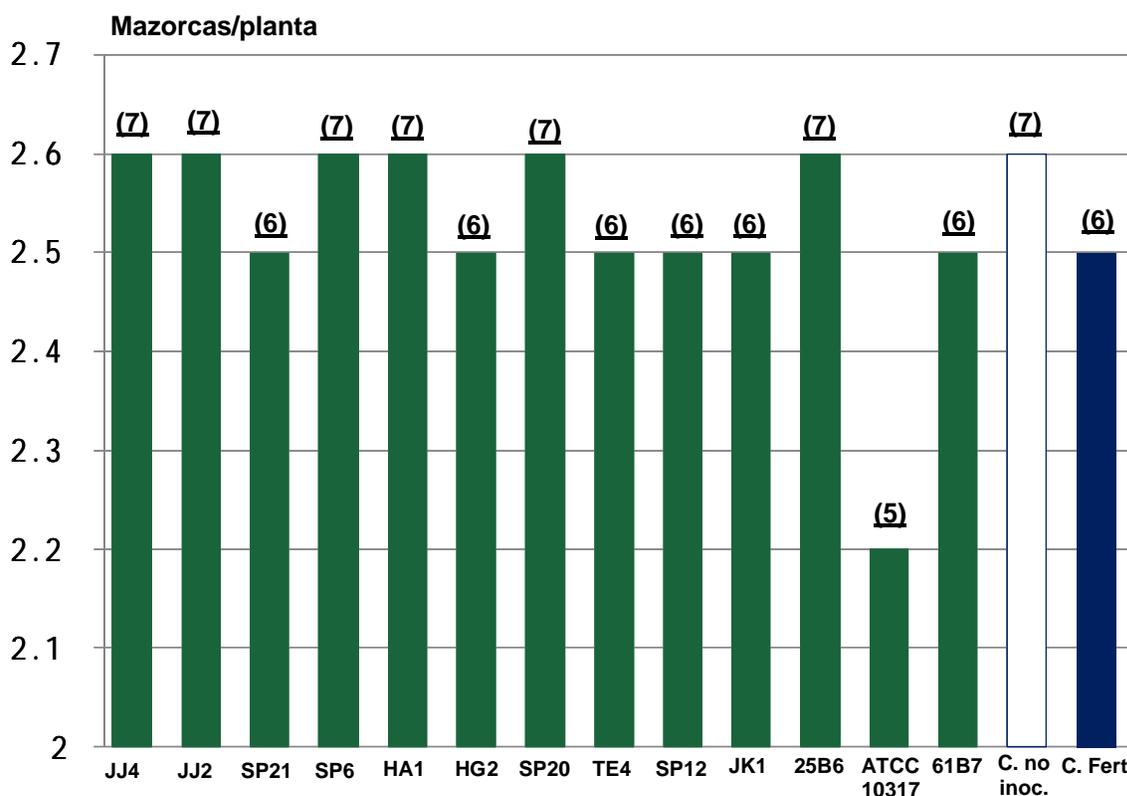


Fig. 4: Número de mazorcas de maíz inoculado con rizobios nativos y comerciales (Datos transformados: \sqrt{x} . D. E.: 0.065 $p \geq 0,10$). Se sitúan entre paréntesis encima de las barras los valores no transformados.

Sin embargo, el peso de mazorcas (fig. 5), variable estrechamente vinculada con el rendimiento de granos, mostró que excepto los tratamientos inoculados con la cepa nativa SP21 (1,06 kg/mazorca) y la cepa comercial 61B7 (0,96 kg/mazorca), el resto de los tratamientos inoculados fue estadísticamente superior al control absoluto (0,95 kg/mazorca). No existieron tratamientos superiores o con superíndices comunes al control fertilizado (1,62 kg/mazorca). Estos resultados pudieran estar vinculados con los de Hilali *et al.* (2001), quienes determinaron que el incremento en el rendimiento de grano en trigo inoculado con *R. leguminosarum* fue de 23-25% en comparación con el testigo absoluto. Otros autores, como Biswas *et al.* (2000), obtuvieron valores estadísticos superiores en el rendimiento de grano al inocular arroz con cepas pertenecientes a *Rhizobium* sp., *R. leguminosarum* y *Bradyrhizobium* sp. Mia y Samsuddin (2010) e informaron que la inoculación con rizobios conllevó al incremento de 16% en el rendimiento de grano en diferentes variedades de arroz.

El hecho de que existieron tratamientos en esta variable que presentaron altos valores con la inoculación, pero no en el peso seco aéreo, puede deberse a que los rizobios tienen la facultad de cambiar la estructura radical de la planta, lo que provoca una mejor absorción de nutrientes, y entonces se favorece directamente la producción de semillas por sobre otros procesos fisiológicos (Biswas *et al.*, 2000).

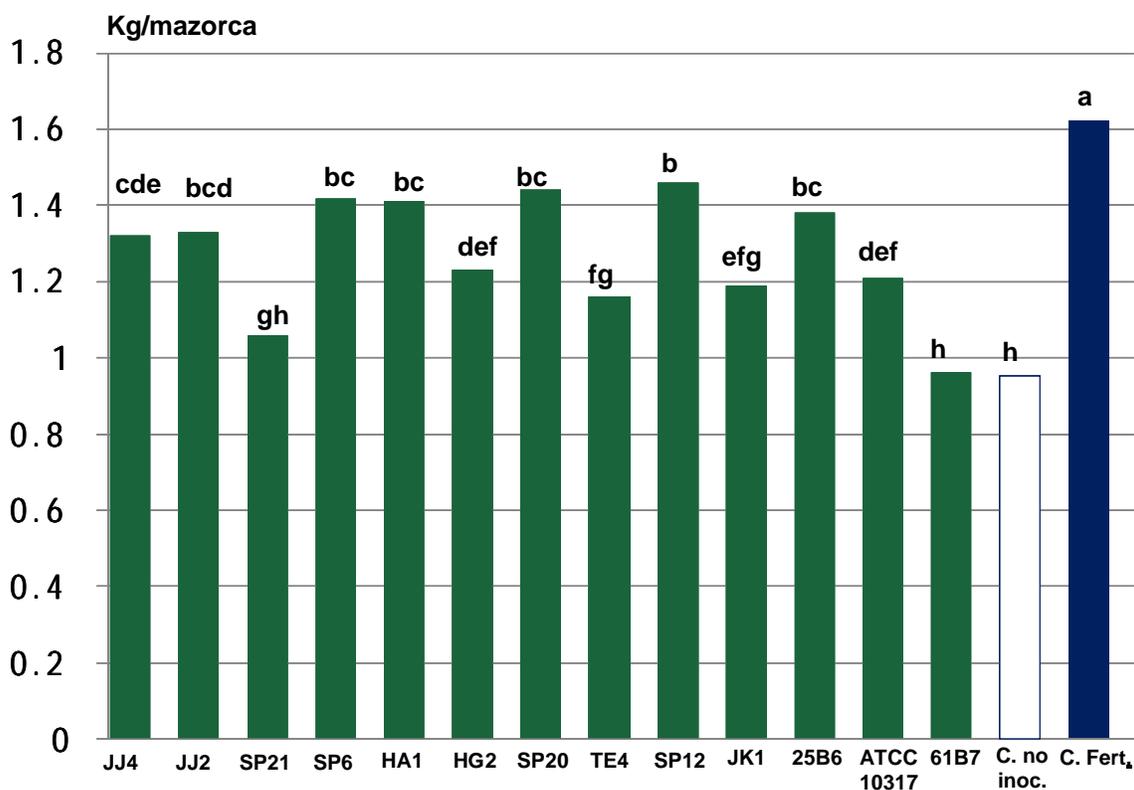


Fig. 5: Peso de mazorcas de maíz inoculado con rizobios nativos y comerciales (D. E.: 0.199 p<0,05).

III.4. Análisis de conglomerados:

El análisis de conglomerados es una herramienta exploratoria de análisis de datos el cual organiza diferentes objetos en grupos de tal forma que el grado de asociación entre dos objetos es máximo si estos pertenecen al mismo grupo de lo contrario, es mínima dicha asociación. El análisis de conglomerados puede ser usado para descubrir estructuras en datos sin proveer una explicación o interpretación, o sea, que este análisis simplemente descubre estructuras en los datos sin explicar por qué estos existen (Sneath, 1984).

Este tipo de análisis se utilizó por Bécquer (2002), Bécquer *et al.* (2007) y Bécquer *et al.* (2008) en experimentos de simbiosis leguminosa-rizobio, así como en experimentos de aplicación de cepas de rizobios en trigo y maíz para poder agrupar de forma más visible los tratamientos con resultados estadísticamente superiores más significativos. En el presente experimento, se utilizó esta herramienta estadística con el mismo propósito, aunque sin pretender dar alguna explicación de los procesos ocurridos al aplicar las diferentes cepas de rizobios a maíz en condiciones de campo.

En el análisis de conglomerados (fig. 6), se observó la formación de dos grupos, donde el marcado con el número 1 comprendió el tratamiento fertilizado y los tratamientos inoculados con las cepas JJ4, JJ2, SP6, HA1, 25B6 y SP20. Excepto HA1, las demás cepas corresponden exactamente a las seleccionadas por Bécquer *et al.* (2007) en condiciones de invernadero (25B6 y SP20), así como tres de ellas pertenecen a la misma leguminosa hospedera que las seleccionadas anteriormente (JJ4, JJ2 y SP6).

Estas cepas, que representaron el 46% de las cepas aplicadas, mostraron los mayores valores estadísticamente superiores en tres de las cuatro variables estudiadas, así como letras comunes o superiores al control fertilizado, por lo que pudieran ser seleccionadas para su aplicación en la práctica agrícola. Si tenemos en cuenta que Santillana *et al.* (2005) lograron que sólo el 37% de las cepas de rizobios

inoculadas en tomate, fueran efectivas en las variables estudiadas, podemos considerar de altamente positivo los resultados del presente experimento.

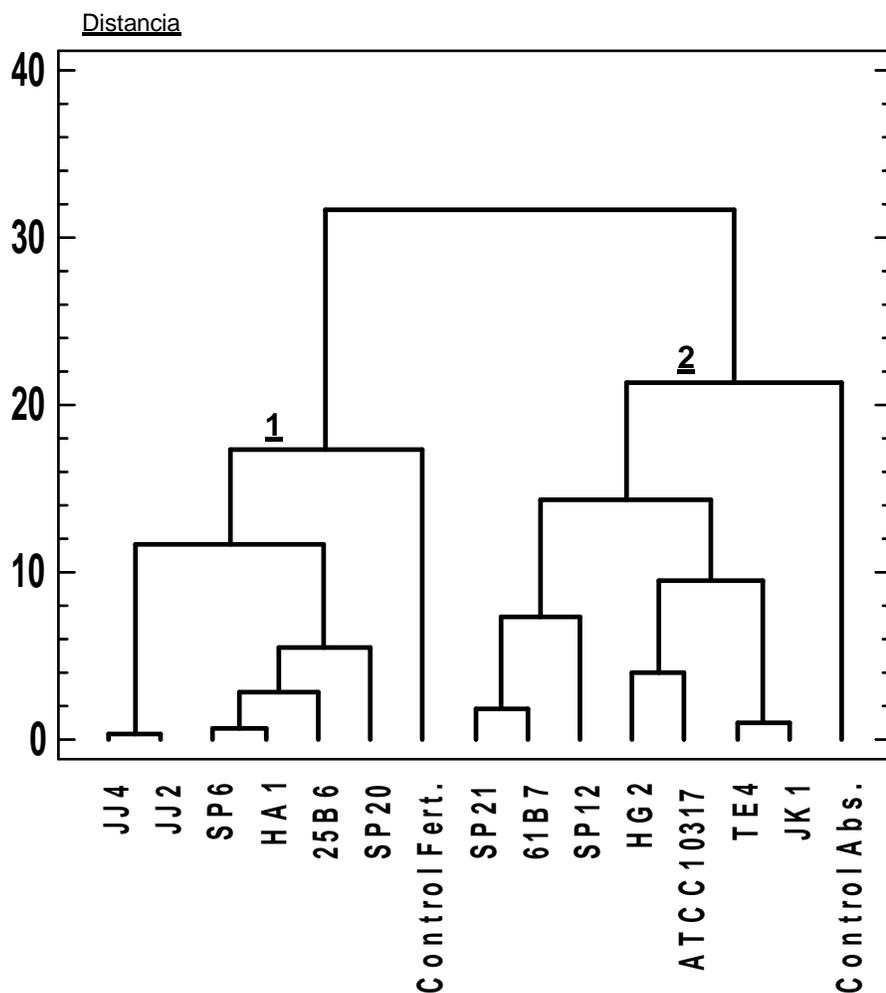


Fig. 6: Agrupación de los tratamientos mediante la construcción de un dendrograma. Método de Ward (distancia métrica *City-Block*). Se formaron dos grandes conglomerados, donde el 1 agrupó los tratamientos inoculados con resultados estadísticamente superiores en todas las variables (SP20, 25B6, HA1, SP6, JJ2, JJ4), así como el tratamiento fertilizado. El 2 agrupó tratamientos con menor significación estadística (SP21, SP12, HG2, TE4, JK1, 61B7, ATCC 10317), incluido el control absoluto.

III.5. Impacto económico de la investigación:

La tecnología que genera la presente investigación en fase de campo permitiría a los productores el ahorro sustancial de moneda libremente convertible por concepto de utilización de fertilizantes de origen biológico.

- **Precio de 1 t de fertilizante nitrogenado (químico)** en el mercado internacional: \$700,00 USD (Castro, 2008).
- **Precio de una bolsa (500 g) de inoculante bacteriano sólido** a base de rizobios (o 200 mL de cultivo líquido): \$13,40 CUP (Datos del Departamento Provincial de Suelos y Fertilizantes de Sancti Spíritus).

Cantidad aproximada de inoculante necesario para 10-12 kg de semilla de cereales: 40,0 L de inoculante líquido. Por lo que la siembra de 1 ha de maíz representaría el ahorro de \$587,00 USD.

III.5.1. Bases de Cálculo:

- **Aplicación de fertilizante químico:** 350 kgN/ha (NRAG 348). Si se utiliza Nitrato de Amonio (NH_3NO_4), entonces el contenido de N es de 34%. Por tanto, serían 1,03 t de fertilizante/ha, que equivaldría a un gasto de **\$721,00 USD**.
- **Aplicación de inoculante bacteriano:** Se aplicó un equivalente a 40,00 L/ha (o 40,00 L/10 kg de semilla), lo cual importaría un total de \$2680,00 CUP (**\$134,00 USD**).

$$721,00 \text{ USD} - 134,00 \text{ USD} = \mathbf{\$587,0 \text{ USD}}$$

Si se tiene en cuenta los rendimientos obtenidos, los cuales en los tratamientos inoculados fueron superiores, o al menos se igualaron a los tratamientos fertilizados químicamente, se infiere que la viabilidad económica de estos procedimientos no se basa solamente en el uso del biofertilizante, sino también en el valor de la cosecha como consecuencia de la acción de estas bacterias en el cultivo.

III.6. Algunas consideraciones generales:

III.6.1. Factores suelo y fertilizante químico:

El efecto evidente que algunas cepas ejercieron sobre las variables agroproductivas evaluadas, pudiera estar relacionado directamente con el tipo de suelo experimental, ya que en trabajos de Hillali *et al.* (2001), se obtuvieron resultados positivos de cepas de *Rhizobium leguminosarum* en trigo, en un suelo aluvial de Marruecos, mientras que esas mismas cepas mostraron efectos desfavorables en las plantas al ser aplicadas en un suelo arcilloso.

En el caso del suelo utilizado en el presente experimento, el cual fue deficitario en P_2O_5 y materia orgánica, se realizó una fertilización de fondo con fórmula completa, donde se evitaron errores experimentales con una dosis moderada de nitrógeno (80 kgN/ha), ya que la presencia de fertilizantes nitrogenados en cantidades excesivas puede afectar la supervivencia de determinadas bacterias rizosféricas en el suelo (Mehnaz *et al.*, 2010).

Aunque existen informes de que en experimentos con leguminosas, los tratamientos combinados de rizobios con fertilización química nitrogenada (60 kgN/ha) mostraron los mayores rendimientos (Provorov *et al.*, 1998), se conoce que el proceso simbiótico es muy sensible a la aplicación de nitrógeno inorgánico ya que se inhibe la nitrogenasa en la zona radical (Martínez-Viera, 1986). Sin embargo, los procesos asimbióticos que se forman con la inoculación de maíz, planta perteneciente a la familia Gramineae, no están sujetos a esa limitante, ya que el mayor efecto que se espera de los rizobios en la planta, no depende de la enzima nitrogenasa, sino de la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal (Matiru y Dakora, 2006).

Según Biswas *et al.* (2000), en experimentos con arroz inoculado con diferentes géneros de rizobios, los tratamientos inoculados y con una dosis alta de N mostraron los valores estadísticamente más altos, por lo que estos autores sugieren una

interdependencia entre la inoculación y la fertilización nitrogenada, condicionada quizás por el mayor desarrollo radical provocado por los rizobios y que es independiente de la fijación de dinitrógeno. Dados estos precedentes, se pueden considerar similares los resultados actuales con los obtenidos por los autores anteriormente mencionados al inicio y al final del párrafo anterior. No obstante, este tema de estudio requiere de mayor profundización en el futuro.

III.6.2. Bases fisio-bioquímicas del efecto positivo de los rizobios en la planta:

En este experimento tres tratamientos inoculados con cepas nativas y un tratamiento inoculado con una cepa comercial presentaron un índice de efectividad de la inoculación superior al resto de los tratamientos, así como otras cepas, tanto nativas como comerciales, mostraron un efecto positivo estadísticamente significativo en otras variables. Estos resultados pudieran deberse a una mayor secreción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal con efecto en todas las partes de la planta; o a la secreción por estas cepas de determinadas fitohormonas mayormente dirigidas al desarrollo de las partes aéreas, con un efecto superior en comparación al del resto de las cepas. Según Biswas *et al.* (2000) los microorganismos diazótrofos pueden promover el crecimiento vegetal mediante la transferencia del N₂ fijado, o mediante el mejoramiento de la absorción de nutrientes a través de la modulación de actividades hormonales en las plantas inoculadas.

Otra posibilidad es en cuanto al mecanismo de entrada de los rizobios en las raíces de los cereales, ya que se conoce que dicho mecanismo es diferente al realizado en la simbiosis leguminosa-rizobio (Reddy *et al.*, 1997), el cual depende principalmente de la capacidad de la bacteria (cepas) para romper las paredes de la célula vegetal, y no de reacciones bioquímicas basadas en dependencias genéticas específicas.

Por último, un factor que actualmente se aplica para combatir los efectos de la sequía y de la salinidad en los cultivos, la ACC-deaminasa, queda como otra explicación al efecto positivo de las cepas de rizobios en maíz. Con respecto a este tema, Shaharoon *et al.* (2006) encontraron una correlación positiva significativa entre la

actividad de ACC-deaminasa de células de PGPRs y la elongación de las raíces de maíz. Se supone que esta sustancia hidroliza el ACC endógeno en amonio y α -acetobutirato en lugar de etileno, el cual es inhibidor del desarrollo vegetal en estado de estrés ambiental, por lo que el crecimiento de tallos y raíces se incrementa. La presencia de ACC-deaminasa ha sido reportada en diversas especies de rizobios, así como en *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y otras rizobacterias (Blaha *et al.*, 2006; Stiens *et al.*, 2006).

Este trabajo investigativo, con características puramente agronómicas, da lugar, sin embargo, a interrogantes que requieren de una profundización a nivel de laboratorio, donde aspectos tan básicos, como la determinación de los compuestos específicos que se producen en los rizobios, con efecto positivo en el crecimiento, productividad y tolerancia a factores ambientales estresantes por la planta, podrían conllevar a la aplicación de mejores alternativas de inoculación en la práctica agrícola.

Por otra parte, los resultados obtenidos pueden ser aplicados directamente en contextos ambientales similares a los del experimento, al disponer el especialista de un grupo de cepas de rizobios con probada eficacia en maíz en variables agronómicas importantes, con un posible impacto económico y ambiental, que dependerá en la práctica del uso racional que se les dé a estos recursos biológicos.

Conclusiones:

- 1.- En la variable peso seco aéreo se observó que todos los tratamientos inoculados presentaron valores estadísticamente superiores al control absoluto.
- 2.- Los tratamientos JJ4, JJ2, SP20, 25B6 superaron al resto de los tratamientos en el IEI de 43.8%, 41.7% y 45.8%, respectivamente.
- 3.- Las cepas nativas JJ4, JJ2, SP6, HA1, HG2, SP20 y TE4, así como las cepas comerciales 25B6 y ATCC 10317, mostraron un efecto notable en el peso seco aéreo.
- 4.- Existió una influencia notable de las cepas inoculadas en la variable longitud del tallo, donde 10 tratamientos inoculados fueron estadísticamente superiores al control absoluto.
- 5.- Excepto los tratamientos inoculados con la cepa nativa SP21 y la cepa comercial 61B7, el resto de los tratamientos inoculados en el peso de la mazorca fueron estadísticamente superior al control absoluto.
- 6.- En el análisis de conglomerados se formaron dos grupos, de los cuales el número 1 agrupó a los tratamientos inoculados con las cepas JJ4, JJ2, SP6, HA1, 25B6 y SP20, de mayor significación estadística en las variables estudiadas.
- 7.- El 46 % de los tratamientos aplicados mostraron los mayores valores estadísticamente superiores en tres de las cuatro variables estudiadas, así como letras comunes o superiores al control fertilizado.
- 8.- Los resultados obtenidos demostraron las perspectivas positivas desde el punto de vista económico de la inoculación de maíz con rizobios.

Recomendaciones:

- 1.- Aplicar en la práctica agrícola las cepas JJ4, JJ2, SP6, HA1, 25B6 y SP20 en cultivos de maíz, bajo condiciones edafoclimáticas similares a las del experimento.
- 2.- Efectuar ensayos de campo en otras localidades con diferentes tipos de suelo para comprobar la efectividad de las cepas seleccionadas.
- 3.- Realizar experimentos con cepas altamente eficientes donde se evalúe la producción de compuestos específicos con efecto positivo en el crecimiento y productividad vegetal.

Bibliografía:

1. **Aguirre-Medina, J. F. y Velasco-Zebadúa, E.** 1994. Componentes morfológicos y fisiológicos del rendimiento en *Leucaena leucocephala* al inocularse con micorriza VA y/o *Rhizobium loti*. J. Agricultura. Técnica. México. 20: 43-45.
2. **Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, D.** 2000. Biofertilizantes: Importancia y Utilización en la agricultura. Agricultura Técnica en México. 26: 191-203.
3. **Albrecht, S. L., Okon, Y., Lonquist, L. y Burris, R. H.** 1981. Nitrogen fixation by corn-*Azospirillum* associations in a temperate climate. Corp Sci. 21: 301-306.
4. **Altieri, M.** 2009. Los impactos ecológicos de los sistemas de Producción de Biocombustibles a base de monocultivos a gran escala en América. Agroecología 4: 59-67.
5. **Anon.** 1979. Clasificación genética de los suelos de Cuba. Academia de Ciencias de Cuba. Instituto de Suelos. La Habana, Cuba.
6. **Anon.** 2007. Metodología para la producción de biofertilizantes a base de cepas de *Rhizobium*. Primera Versión, <http://mubr.asm.org/2/attachment2.htm>. Consultado 12 de Octubre de 2011.
7. **Anon.** 2008. Lista oficial de plaguicidas autorizados 2008-2010. Registro Central de Plaguicidas. República de Cuba. 421 p.
8. **Antoun, H.; Beauchamp, C.J.; Goussard, N.; Chabot, R. and Lalonde, R.** 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Rhaphanus sativus* L.). Plant and Soil. 204:57
9. **Antoun, H. and D. Prévost.** 2000. PGPR activity of *Rhizobium* with nonleguminous plants. Proceedings of the 5th International PGPR workshop, Villa Carlos Paz, Cordoba, Argentina. Oct. 29-Nov. 3. pp. 62-69.

10. **Antoun, H. and Kloepper, J. W.** 2001. Plant growth promoting rhizobacteria. Encyclopedia of Genetics. Brenner, S. and Miller, J.F., Eds.). Academic Press, New York. p. 1477
11. **Antoun, H. and Prévost, Danielle.** 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Pp. 1-34. In: PGPR: biocontrol and biofertilization. Siddiqui, Z. A. (Ed.). 318 p.
12. **Anya, A. O.; Archambault, D. J.; Bécquer, C. J. and Slaski, J. J.** 2009. Plant growth-promoting diazotrophs and productivity of wheat on the Canadian prairies. In: Microbial strategies for crop improvement. M. S. Khan *et al.* (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Chapter 4:287-300.
13. **Bacilio- Jimenez, M; Aguilar- Flores, S; Del Valle, M. V; Perez, A.; Zepeda, A. and Zenteno, E.** 2001. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. Soil Biol. Biochem. 33:167-172.
14. **Baldani V. L. D., Baldani J. I., Döbereiner, J.** 1987. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. Biol. Fertil. Soils, 4:37-40.
15. **Barton, L. L, Johnson G. V. y Orbock Miller, S.** 1986. The effect of *Azospirillum brasilense* on iron absorption and translocation by sorghum. J. Plant Nut. 9:557-565.
16. **Bashan, Y., Holguin, G, Puente, M. E., Carrillo, A., Alcaraz-Méndez, L., López-Cortes, A., y Ochoa, J. L.** 1993. Critical Evaluation of plant inoculation with beneficial bacteria from the genus *Azospirillum*. En Agroecología, sostenibilidad y educación. Ferrera-Cerratos, D y Quintero L. R. (ed) Centro de Edafología. Colegio de Posgraduados. Montecillos, Estado de México.
17. **Bashan, Y., Holguín, G. y Ferrera-Cerrato, R.** 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. I. *Azospirillum*. Terra. 14 (2): 159-194.
18. **Bashan, Y.** 1986. Enhancement of wheat roots colonization and plant development by *Azospirillum brasilense* Cd following temporary

- depression of the rhizosphere microflora. Appl. Environ. Microbiol. 51:1067-1071.
19. **Basham, Y; Puente, M. E.; Rodríguez-Mendoza, M. N.; Toledo, G.; Huguin, G; Ferrera-Cerrato, R. and Pedrin, S.** 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1938-1945.
 20. **Bashan, Y.** 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotech. Advances. 18: 729-770.
 21. **Bashan, Y. and Holguin, G.** 1997. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996). J. Microbiol. 43(2):103-121.
 22. **Bécquer, C. J.** 2002. Caracterización y selección de rizobios adaptados a ecosistemas ganaderos de Sancti Spíritus, Cuba. Tesis en Opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de La Habana. 140 p.
 23. **Bécquer, C.J.; Salas, Beatriz; Archambault, D.; Slaski, J. y Anyia, A.** 2006. Inoculación de trigo (*Triticum aestivum* L.) con rizobios adaptados a ecosistemas ganaderos de Sancti Spíritus, Cuba. Rev. Pastos y Forrajes. 29:255.
 24. **Bécquer, C.J.; Salas, Beatriz; Archambault, D.; Slaski, J. y Anyia, A.** 2007. Inoculación de trigo (*Triticum aestivum*, L.) con rizobios adaptados a ecosistemas ganaderos de Alberta, Canadá. Rev. Pastos y Forrajes, Vol. 30, No 1, p. 133.
 25. **Bécquer, C. J.; Salas, Beatriz; Ávila, U.; Palmero, L. A.; Nápoles, J. A.; Ulloa, Lisbet.** 2008. Selección de cepas de rizobios aislados de ecosistemas ganaderos de Cuba, inoculados en trigo (*Triticum aestivum* L.). II: Ensayo de campo. Rev. Pastos y Forrajes. 31:63-72.
 26. **Bécquer, C. J.; Salas, Beatriz; Archambault, D.; Slaski, J.; Anya, A.** 2008. Selección de cepas de rizobios aislados de ecosistemas ganaderos de Sancti Spíritus, Cuba, inoculados en maíz (*Zea mays* L.). Fase I: Ensayo de invernadero. Rev. Pastos y Forrajes. 31: 229-246.

27. **Beijerinck, M. W.** 1890: Künstliche infection von *Vicia faba* mit *Bacillus radicola*: Ernährungsbedingungen dieser Bacterie. Botanische Zeitung. 48:837-843.
28. **Bethlenfalvay, G. J.** 1993. The mycorrhizal plant-soil system in sustainable agriculture. In: Agroecología, sostenibilidad y educación. Ed. D. Ferrera-Cerratos y L. R: Quintero. Centro de Edafología. Colegio de Posgraduados. Montecillos, Estado de México.
29. **Bhattacharai, T.** 1999. *Azospirillum* wheat association. Pp. 121-137 In: BN Prasad (ed.). Biotechnology and Biodiversity in Agriculture/Forestry. Harcourt Brace & Company Publishers. London.
30. **Bhattacharai, T. and Hess, D.** 1993. Yield responses of Nepalese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. Plant Soil, 151:67-76.
31. **Bhattacharjee R. B., Singh A, Mukhopadhyay.** 2008. Use of nitrogenfixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: Prospects and challenges. Appl. Microbiol Biotechnol. 80: 199-209.
32. **Biswas, J.C.; Ladha, J.K. & Dazzo, F.B.** 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sc. Soc. of America J.* 64:1644.
33. **Biswas, J. C.; Ladha, J. K. and Dazzo, F. B.** 2000a. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sc. Soc. of America J.* 64:1644-1650.
34. **Biswas, J. C.; Ladha, J. K.; Dazzo F. B.; Yanni, Y. G. and Rolfe, B. G.** 2000b. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agronomy J.* 92:880-886.
35. **Blaha, D.; Combaret, C. P.; Mirza, M. S. and Loccoz, Y. M.** 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 455–470.

36. **Blas, C.** 2007. DDGS de maíz (granos de destilería, DDG, y solubles, DDS). Universidad Politécnica de Madrid, España, www.produccionanimal.com.ar. Consulta: 18-09-2009.
37. **Bordeleau, L. M. and Prévost, Danielle.** 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and soil*. 161: 115-125.
38. **Bowen, G. D. and A. D. Rovira.** 1999. The Rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in agronomy*. 66: 1-102.
39. **Bressani, R.** 1994. Opaque 2 corn in human nutrition and utilization. In: Quality protein maize. 1964-1994. Proc. of the international symposium on quality protein maize. EMBRAPA/CNPMS, Sete Lagoas MG Brasil. p. 41-63.
40. **Brown, M. S. y Bethlenfalvay, G. J.** 1988. The Glycine-Glomus-*Rhizobium* symbiosis. VII. Photosynthetic nutrient use efficiency in nodulate mycorrhizal soybeans. *Plant Physiol*. 86:1292-97.
41. **Caballero-Mellado, J., Carceño M. G., Cordero E., y Mascarúa, M.** 1999. Aplicación de *Azospirillum* en el cultivo de gramíneas. En IV Simposio internacional y V reunión nacional sobre agricultura sostenible. Morelia, Mich. México. Memorias in extenso.
42. **Caballero-Mellado, J. M. G.; Carcano-Montiel, M. A. Mascarua-Esparza.** 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. *Symbiosis*, 13: 243-253.
43. **Cassán, F.; Perrig, D.; Sgroy, Verónica; Masciarelli, O.; Penna, C. y Luna, Virginia.** 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology* 45: 28 – 35.
44. **Castro, R.** 2008. Discurso pronunciado en la Sesión Anual del Parlamento Cubano. Periódico Granma. 4 p.
45. **Chabot, R., Antoun, H., Kloepper, J. W. and Beauchamp, Chantal.** 1996. Root colonization of Maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2767-2772.

46. **Chen, W. X. ; Yan, G. H. and Li, J. L.** 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:85-91.
47. **Chirinos, J.; Leal, Á.; Montilla, Joan.** 2006. Uso de Insumos Biológicos como Alternativa para la Agricultura Sostenible en la Zona Sur del Estado Anzoátegui. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas El Tigre, Estado Anzoátegui. Revista Digital CENIAP HOY N° 11 mayo-agosto. p. 1-7.
48. **Chotte, J. I; Schwartzmann, A.; Bally, E. and Monrozier, L J.** 2002. Changes in bacterial communities and *Azospirillum* diversity in soil fractions of a tropical soil under 3 or 19 years of natural fallow. Soil Biol. Biochem. 34:1083-1092.
49. **Cocking, E. C.** 2004. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. Plant and Soil. 252:169
50. **Cook, R. J.** 2002. Advances in plant management in the twentieth century. Ann. Rev. Phytopathol. 38: 95-116.
51. **Crowley, D. E., y Wang, C.; Reid, C. P. P. and Szaniszlo, P. J.** 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. Plant and soil 130: 179-198.
52. **Da Silva, P. M., Tsai, S. M. y Bonetti, R.** 1999. Respuesta a la inoculación y a la fertilización nitrogenada para incrementar la producción y la fijación biológica de nitrógeno en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). En: Peña-Cabriales, J. J. y Zapata, F. (Eds.). Aumento de la fijación biológica del nitrógeno en el frijol común en América latina. Arreglos regionales Cooperativos para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nuclear en América Latina y el Caribe. p. 137-144.
53. **Davidson, R. L.** 1978. Root Systems. The forgotten component of pastures. In: Plant relations in pastures. J. R. Wilson (ed) CSIRO. Australia. p. 86-94.
54. **Davies F.T., Calderón C.M. and Huamán Z.** 2005. Influence of Arbuscular Mycorrhizae Indigenous to Peru and a Flavonoid on Growth, Yield

- and Leaf Elemental Concentration of “Yungay” Potatoes. Hort Science. 40(2): 381-385
55. **De La Cruz, R. E.; Manalo, M. Q., Aggangan, N. S. y Tambalo, J. D.** 1988. Growth of three legume trees inoculated with VA mycorrhizal fungi and *Rhizobium*. Plant and Soil 108:111-115.
 56. **Dibut, B., M. C. Acosta., R. Martínez y H. Ljunggren** 1995. Producción de aminoácidos y citoquininas por una cepa cubana de *Azotobacter chroococcum* Cultivos Tropicales. 16 (1). p. 16-18.
 57. **Dobbelaere, S; Croonenborghs, A.; Thys, A.; Ptacek, D.; Okon, Y. and Vanderleyden, J.** 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. Biol. Fert. Soils 36: 284-297.
 58. **Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. y Okon, Y.** 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences 22: 107-149.
 59. **Döbereiner, Johanna.** 1968. Non symbiotic nitrogen fixation in tropical soils. Pesq.agropec. bras. 3:1.
 60. **Döbereiner, J. Urquiaga, S., Boddey, R. M. and Ahmad, N.** 1995. Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. Nitrogen economy in tropical soil. Fertilizer Research. 42:339-346.
 61. **Dommergues, Y. R.** 1978. Impact and soil management and plant growth. In: Interactions between nonpathogenic soil microorganisms and plants. Y. R. Dommergues and S. V. Krupa (eds). Elsevier. The Netherlands. p. 443-458.
 62. **Dreyfus, B.** 1998. How to exploit the diversity of tropical symbiosis for sustainable agriculture: fallow legumes and rhizobia associated to wild rice. In: Biological Nitrogen Fixation for the 21st century. Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation. Institut Pasteur, Paris, France, July 20-25. 617-618 pp.
 63. **Edge, T. A. and Wyndham, R. C.** 2002. Predicting survival of a genetically engineered microorganism, *Pseudomonas chlororaphis* 3732RN-

- L11, in soil and wheat rhizosphere across Canada with linear multiple regression models. *Can. J. Microbiol* 48: 717-727.
64. **Elkan, G. H. and Kuykendall, L. D.** 1981. Carbohydrate metabolism. In: *Nitrogen Fixation*. Vol. II. Edited by Oxford University. Press, London. Pp. 147-166.
65. **Essalmani, H. and Lahlou, H.** 2003. Mécanismes de bioprotection des plantes de lentille par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* sp. *Lentis. C.R. Biologies*. 326 : 1163-1173.
66. **Faggioli, Valeria S., Cazorla, Cristian R., Vigna, Andrés y Berti, María F.** 2004. Fertilizantes biológicos en maíz. Ensayo de inoculación con cepas de *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens*. INTA EEA Marcos Juárez – Área Suelos y Producción Vegetal. Universidad Nacional de Villa María. Cátedra de Microbiología – Facultad de Agronomía – UBA.
67. **Faggioli, V., Freytes, G. y Galarza, C.** 2008. Las micorrizas en trigo y su relación con la absorción de fósforo del suelo. Publicación Técnica INTA EEA Marcos Juárez. Disponible online.
68. **Ferraris, N. G.; Couretot, L. y Díaz, Zorita.** 2008. Respuesta de trigo a tratamientos con *Azospirillum* sp. según niveles tecnológicos. CD Rom. VII Congreso Nacional de Trigo. V Simposio Invernal de Cereales de siembra Otoño –Invernal. I Encuentro del Mercosur.
69. **Ferrari, N. G.** 2008. Inoculación con Microorganismos con efecto promotor de crecimiento (PGPM) en Trigo. Conocimientos actuales y experiencias realizadas en la Región Pampeana Argentina. Área de Desarrollo Rural INTA EEA Pergamino. Av Frondizi km 4,5 (2700).
70. **Ferrer, R. y Herrera, R. A.** 1991. Breve reseña sobre los biofertilizantes. Instituto de Ecología y Tesis de maestría 55 Sistemática. ACC. La Habana. Cuba s.p.
71. **Ferrero, R. y Alarcón, A.** 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sun* 8 (2): 175-183.K.

72. **Fischer, K. S. and Palmer, A.** 1984. Tropical Maize. In PR Goldsworthy and NM Fischer (Eds.) The Physiology of Tropical Field Crops. John Wiley and Sons, NY. 213-248 p.
73. **Font Quer, P.** 1977. Diccionario de Botánica. 6ª. reimpresión. Editorial Labor S. A., Barcelona, España. 1244 p.
74. **Fornasero, L.V.; Toniutti, M. A.; Gambaudo, S. P. Micheloud, H. A.** 2007. Fertilización Biológica. Bacterias promotoras de crecimiento vegetal Cátedra de Diagnóstico y Tecnología de Tierras, FCA, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Argentina, 2007. <http://www.engormic.com>. 2007. Consultado el 7 de mayo de 2012.
75. **Frank, B.** 1889: Uber die pilzsymbioseder leguminosen. Ver. Deut. Bot. Gesell. 7: 332-346.
76. **Fuentes, L. M. R.** 2002 El Cultivo del Maíz en Guatemala. Una guía para su manejo agronómico. Instituto de Ciencia y Tecnologías Agrícolas (ICTA)..
77. **Fulchieri, M and Frioni, L.** 1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. Soil Biol. Biochem 26:921-923.
78. **García, G. M. N., Moreno, M. P., Peña-Cabriales, J. J y Sánchez-Yáñez, J. M.** 1995. Respuesta del maíz (*Zea mays* L) a la inoculación con bacterias fijadoras de N₂. TERRA 13: 71-79.
79. **García, F. O.; Picone, L. I. y Berardo, A.** 2006. Fósforo. Pág. 99-121. En: H. E. Echeverría y F. O. García (eds.) Fertilidad de Suelos y Fertilización de cultivos. Editorial INTA, Buenos Aires, Argentina. 521p.
80. **González, A. G.** 2009. Uso de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal, Inoculantes en el cultivo de Maíz (Rizofos Liq). Desarrollo y Servicio Técnico de RIZOBACTER ARGENTINA S.A. (<http://www.engormix.com/rizobacter-argentina/sh12255-comercialización.hym>). Consultado el 8 de mayo de 2012).

81. **Gregory, P. J.** 1994. Root growth and activity. In: K. J. Boote, J. M. Bennet, T. M. Sinclair, and G. M. Plausen (eds). Physiological and determination of crop yield. Madison, Wisconsin, USA. p. 66-93.
82. **Gutiérrez A. and Martínez E.** 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). Journal of Biotechnology. 91: 117-126.
83. **Gutiérrez- Mañero, F. J., Ramos –Solano, B., Provanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F. R. and Talon, M.** 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. Physiol. Plant. 111:208-211.
84. **Hafeez, F.; Safdar, Y. M. E.; Chaudhry, A. U. and Malik, K. A.** 2004. Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. Australian Journal of Experimental Agriculture 44: 617 – 622
85. **Hamdi, Y. A.** 1985. La fijación biológica del nitrógeno. FAO. 160 p.
86. **Hardson, G.** 1999. Métodos para aumentar la fijación simbiótica de nitrógeno. En: Peña-Cabriales, J. J. y Zapata, F. (Eds.) Aumento de la fijación biológica del nitrógeno en el frijol común en América Latina. Arreglos Regionales Cooperativos para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nuclear en América Latina y el Caribe. p. 1-18.
87. **Hassan, Dar G., Zargar, M. Y. and Beigh, G. M.** 1997. Biocontrol of *Fusarium* Root Rot in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using Symbiotic *Glomus mosseae* and *Rhizobium leguminosarum*. Microb. Ecol. 34: 74-80.
88. **Hellriegel, H. and Wilfarth, H.** 1888: Untersuchungen über die Stickstoff-Nahrung der Gramineen und Leguminosen. Beilageheft zu der Zeitschrift des Vereins der Rübenezucker-Industrie Deutschen Reiche. 1:234.
89. **Hernández, A.; Rives, N.; Caballero, A.; Hernández, A.; Heydrich, M.** 2004. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. Revista Colombiana de Biotecnología. 6: 6 - 13

90. **Hernández, M. I.; Luis, G. y Escalona, A. Miguel A.** 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. La Ciencia y el Hombre. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana, Volumen XVI, Número 1.
91. **Hernández, G.** 1997. Introducción a la Reunión Internacional de Rhizosfera. En: Resúmenes IV Congreso de la Soc. Cub. De la Ciencia del Suelo y Reunión Internac. De Rhizosfera. Matanzas. P. **1-8**.
92. **Hernández, M.; Pereira, M. y Tang, M.** 1994. Utilización de microorganismos Biofertilizantes en los cultivos tropicales. Pastos y Forrajes. 17: 183 – 192.
93. **Hernández, A.; Jiménez, J. M.; Bosch, D. y Rivero, L.** 1999. Nueva revisión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. 23 p.
94. **Hilali, A.; Prévost, Danielle; Broughton, W. J. and Antoun, H.** 2001. Effects de l'ínoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii sur la croissance du blé dans eux sols du Maroc. Can. J. Microbiol. 47: 590-593.
95. **Höflich, G.** 1999. Colonization and growth promotion of non-legumes by *Rhizobium* bacteria. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (eds). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
96. **Höflich, G.; Wiehe, W. and Köhn, G.** 1994. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. Experientia. 50:897.
97. **Jain, D. K.; Prévost, Danielle and Bordeleau, L. M.** 1990. Role of bacterial polysaccharides in the derepression of ex-planta nitrogenase activity with rhizobia. FEMS Microbiology Ecology. 73: 167-174.
98. **Jordan, D. C.** 1984. Rhizobiaceae. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. V. 1. Ed. N. R. Kreig. Pp. 234-256. Willians and Wilkins, Baltimore, USA.

99. **Jordan, D. C. and Allen, O. N.** 1980. Genus *Rhizobium* Frank. In: Buchanan and Gibson (ed.). Bergey's Manual of determinative bacteriology, 8th ed. The Williams and Wilkins Co.; Baltimore. pp. 128-129.
100. **Justina, L.** 2005. Universidad Jesús Montané Oropesa. Sede La Fe. Isla de La Juventud. Cuba.  Impactos Negativos de los Agroquímicos y su efecto en la Sociedad. Pág. 1-4.
101. **Kalpunik, Y., Sarig, S., Nur, I., Okon, Y. y Henis, J.** 1982. The effect of *Azospirillum* inoculation on growth and yield of corn. Isr. J. Bot. 31:247-255.
102. **Kalpunik, Y.; Sarig, S., Nur, I., and Okon, Y.** 1983. Effect of *Azospirillum* inoculation on yield of field-grown wheat. Can. J. Microbiol. 29:895-899.
103. **Kalpunik, Y. and Okon, Y.** 2002. Plant growth promotion by rhizosphere bacteria. In: Waisel, Y., A. Eshell and U. Kafkafi (eds). Plant roots. The hidden half. Third edition revised and expanded. Marcel Dekker. New York. P. 869-895.
104. **Kaushik, R; Saxena, A. K. and Tilak, K. V. B. R.** 2002. Can *Azospirillum* strains capable of growing at a sub-optimal temperature perform better in field-grown-wheat rhizosphere. Biol. Fert. Soils 35:92-95.
105. **Kennedy, I.R.; Choudhury, A.T.M.A. y Kecskés, M. L.** 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? Soil Biology and Biochemistry 36: 1229-1244.
106. **Kevin, V. J.** 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil. 255:571-586
107. **Kopp, S and Abril, A.** 1997. Efecto de la inoculación con *Azospirillum* spp. sobre gramíneas forrajeras de un pastizal de altura de las Sierras de Córdoba, Argentina. Rev. Arg. Microbiol. 29:103- 107.
108. **Kozdroj, J; Trevor, J. T. and Van Elsas, J. D.** 2004. Influence of introduced potential biocontrol agents on maize seedling growth and bacterial community structure in the rhizosphere. Soil Biol.Biochem 36:1775-1784.

109. **Kramer, P. J.** 1983. Water relations of plants. Academic Press, Santa Clara, CA, USA. 489 p.
110. **Kuykendall, L. D.; Saxena, B; Devine, T. E. and Udell, S. E.** 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum*, Jordan 1982, and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov, Can. J. Microbiol. 38, 501-505.
111. **La Favre, A. ; Sinclair, M. J.; La Favre, J. S. and Eaglesmann, A. R. J.** 1991. *Bradyrhizobium japonicum* native to tropical soils: novel sources of strains for inoculants for US-type soybean. Trop. Agric. (Trinidad). Vol. 68.N 3.
112. **Larios L.; Gordón, R.; Obando, R. Osorio, M.; López, G. y J. Bolaños** 1997. Eficiencia de Uso de Nitrógeno en el cultivo del maíz bajo distintos métodos de aplicación. In: Síntesis de resultados experimentales del PRM 1992. CIMMYT-PRM. Guatemala. 338 p.
113. **Lin, W., Okon, Y. Hardy, R. W. F.** 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 45:1775-1779.
114. **Linderman, R. G.** 1993. Effect of microbial interactions in the mycorrhizosphere on plant growth and health. En: Agroecología, sostenibilidad y educación. Ed. Ferrera-Cerratos y Quintero, L. R. Centro de Edafología. Colegio de Posgraduados. Montecillos, Estado de México.
115. **Lindström, K.; Paulin, L.; Roos, C. and Suominen, L.** 1995a. Nodulation genes of *Rhizobium galegae*. In: Nitrogen Fixation Fundamentals and Applications, Thikhonovich, I. A. et al., Kluwer, The Netherlands. p. 807.
116. **Loredo, O. C. S.; Beltrán, L. y Peña del Río, A.** 2007. Uso de biofertilizantes para la producción de maíz forrajero en condiciones de temporal. Folleto científico Núm. 2 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noreste. Campo Experimental San Luis. 60 pág.
117. **Mantelin, S & B Touraine.** 2004. Plants growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55:27-34.

118. **Martin, J. L.** 2007. Utilization of dried distillers grains for developing beef heifers. *J. Anim. Sci.*85:2298.
119. **Martínez, M.** 2008. Evaluación de los granos de destilería deshidratados con solubles (DDGS) en el comportamiento productivo e indicadores de salud en cerdos en crecimiento. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 42 (4):389
120. **Martínez-Morales, L. J.; Soto-Urzúa, L.; Baca, B. E. and Sánchez, J. A.** 2003. Indole-3-butyric acid, (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* 228(2):167-173
121. **Martínez-Romero, Esperanza and Caballero-Mellado, J.** 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 2: 113-140.
122. **Martínez-Romero, Esperanza and Palacios, R.** 1990. The *Rhizobium* genome, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 9:59.
123. **Martínez, R. y Dibut, B.** 1995. Beneficio de la utilización de los biofertilizantes en Cuba. *Memorias Primer Encuentro Internacional sobre Agricultura Urbana y su impacto en la alimentación de la Comunidad.* Habana. Cuba, p. 61-67.
124. **Martínez Viera, R.** 1986. *Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo.* Editorial Científico Técnica. La Habana, Cuba. 167 p.
125. **Matiru, Vivienne & Dakora, F.** 2004. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African J. Biotechnol.* 3:1
126. **Matiru, Vivienne and Dakora, F.** 2006. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African J. Biotechnol.* 3:1-7.
127. **Mehnaz, Samina; Kowalik, T.; Reynolds, B. and Lazarovits, G.** 2010. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. *Soil Biology & Biochemistry.* 42:148-1856.

128. **Mertz, T.** 1994. Thirty years of opaque 2 maize. In: Quality Protein Maize. 1964-1994. Proc. of Symp. of Quality Protein Maize. EMBRAPA/CNPMS, Sete Lagoas M. G. Brasil. p. 1-10.
129. **Mia, M. A. B. and Shamsuddin, Z. H.** 2010. *Rhizobium* as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production. African Journal of Biotechnology 37: 6001-6009.
130. **Miller, S. L. and Allen, E B.** 1992 Mycorrhizal Functioning. M F Allen Ed. Chapman & Hall. 301-332. 534 p.
131. **Ministerio de la Agricultura.** 2009. Guía técnica para la producción del cultivo del maíz. 15 p.
132. **Molouba, F., J. Lorquin, A. Willems, B. Hoste, E. Giraud, B. Dreyfus, M. Gillis, P. De Lajudie and C. Masson-Boivin.** 1999. Photosynthetic bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. Appl. Environ. Microbiol. 65:3084-3094.
133. **Muñoz, R. R.** 2006. Referente Regional de Comercialización. Informe de coyuntura del Mercado de granos. INTA EEA Pergamino. Pág. 1-9.
134. **Murty, M. G. and Ladha, J. K.** 1988. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. Plant Soil, 108:281-285.
135. **Neves, Ma Cristina, P. and Rumjanek, Norma G.** 1997. Diversity and adaptability of Soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. Soil Biol. Biochem. 29:5/6. 889-895 pp.
136. **Nick, G.; de Lajudie, P.; Eardly, B. D.; Suomalainen, S.; Paulin, L.; Zhang, X.; Gillis, M. and Lindström, K.** 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., two new species isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. Int. J. Syst. Bacteriol. 49:1359-1368.
137. **Okon, Y.** 1994. *Azospirillum*/plant associations. Edited by Yaacov Okon.

138. **Ortega, E; Villegas, E; Vasal, S. K.** 1986. A comparative study of protein changes in normal and quality protein maize during tortilla making. *Cereal Chemistry* 63: 446-451.
139. **Pandey, A., Sharma E. y Palni. S.** 1998. Influence of bacterial inoculation of maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. *Soil. Biol. Biochem.* 3: 379-384.
140. **Perrine F., Rolfe B., Hynes, M. and Hocart, C.** 2004. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of indolacetic acid and tryptophan following aqueous chloroformate derivatisation of *Rhizobium* exudates. *Plant Physiology and Biochemistry.* 42: 723-729.
141. **Peterson, R. L., Massicotte, H. B. y Melville, L. H.** 2004. Arbuscular mycorrhizas. En: *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology.* NRC-CNRC. Research Press.Otawa. Canada. Chap.3: 57-79
142. **Plata-Guzmán, D.; Farias-Rodríguez, R.; Cárdenas-Navarro, R. y Sánchez-Yáñez, J. M.** 1997. Respuesta de maíz (*Zea mays* L.) a la inoculación con rizobacterias de teocintle (*Zea mays* sp. mexicana L). *Monografias.com S.A.* <http://www.monografias.com>.
143. **Prévost, D., Saddiki, S. and Antoun, H.** 2000. Growth and mineral nutrition of corn inoculated with effective strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proceedings of the 5th International PGPR workshop.* Villa Carlos Paz, Cordoba Argentina. 3:7.
144. **Provorov, N. A.; Saimnazarov, U. B.; Bahromov, I. U.; Pulatova, D. Z.; Kozhemyakov, A. P. and Kurbanov, G. A.** 1998. Effect of rhizobia inoculation on the seed (herbage) production of mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) grown at Uzbekistan. *Journal of Arid Environments.* 39: 569-575.
145. **Purseglove, J. W.** 1972. *Tropical Crops: Monocotyledons.* Longman, London.
146. **Ramírez, H. A.** 2008. Granos secos de destilería con solubles en dietas para bovinos lecheros.
147. **Read, D.** 1998. Plants on the web. *Nature.* 396: 22-23.

148. **Reddy, P. M.; Ladha, J. K.; So, R. B.; Hernández, R. J.; Ramos, M. C.; Ángeles, O. R.; Dazzo, F. B. and de Bruijn, F. J.** 1997. Rhizobial communication with rice roots: Induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. *Plant and Soil*. 194:81-87.
149. **Reis Junior, F. B.; Silva, M. F.; Teixeira, K. R. S.; Urquiaga, S. and Reis, V. M.** 2004. Identification of *Azospirillum amazonense* isolates associated to *Brachiaria* spp. at different stages and growth conditions, and bacterial plant hormone production. *R. Bras. Ci. Solo* 28:103-113.
150. **Reis, V. M., Baldani, J. I.; Baldani, V. L. D. and Dobereiner, J.** 2000. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Crit. Rev. Plant. Soil*. 19: 227-247.
151. **Remy, W., T. N. Taylor, H. Hass and Kerp. H.** 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhiza. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, Vol 91, p. 11841-11843.
152. **Reyes, Isbelia; Álvarez, Luimar; El-ayoubi, Hind y Valery, A.** 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, 20: 37-48.
153. **Rinaudo, G.; Orenza, S.; Fernández, M. P.; Meugnier, H. and Bardin, R.** 1991. DNA homologies among members of the genus *Azorhizobium* and other stem-nodulating bacteria isolated from the tropical legume *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:114-120.
154. **Rodríguez, A. J.; Rojas, M. M.; Trujillo, I.; Manzano, J.; Heydrich, M.** 2003. Caracterización de la Comunidad Microbiana Endófitas de la caña de azúcar. En: *Memorias. V Taller Internacional sobre Recursos Filogenéticos FITOGEN 2003*. Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes. La Habana. Cuba.
155. **Rome, S.; Fernández, M.; Brunel, B.; Normand, P. and Cleyet-Marel, J. C.** 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:972-980.

156. **Ruiz, L.; Simón, J.; Rivera, R.; Carvajal, Dinorah.** 2010. El uso de la canavalia como abono verde inoculada con rhizobium y micorrizas. INIVIT. Santo Domingo, Villa Clara, Pag. 15-24.
157. **Rupela, O. P. y Dart, P.J.** 1989. Research on symbiotic nitrogen fixation by chickpea at ICRISAT, Hyderabad, India, 28 Feb- 2 March, pág.161-178.
158. **Salantur, A.; Ozturk, A. and Akten, S.** 2006. Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. *Plant Soil Environ.*, 52: 111–118.
159. **Santillana, Nery; Arellano, Consuelo y Zúñiga, Doris.** 2005. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*, 4: 47-51.
160. **Sarig, S., Blum, A. and Okon, Y.** 1988. Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *J. Agric. Sci. Camb.* 110:271-277.
161. **Saubidet, M; Fatta, N. and Barneix, A. J.** 2002. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant Soil* 245:215-222.
162. **Schulze, J and Pöschel, G.** 2004. Bacterial inoculation of maize affects carbon allocation to roots and carbon turnover in the rhizosphere. *Plant Soil* 267:235-241.
163. **Searchinger, T.; Heimlich, R.; Houghton, R. A.; Dong, F.; Elobeid, A.; Fabiosa, J.; Tokgoz, S.; Hayes, D.; and Yu, T.** 2008. Use of US cropland for biofuels increases greenhouse gases through emission from land-use change. *Science* 319: 1238-1240.
164. **Shaharoon, B., Arshad, M. and Zahir, Z.** 2006. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Letters in Applied Microbiology*, 42: 155–159.

165. **Sneath, P.** 1984. Numerical taxonomy. In: N. R. Krieg and J. G. Hott (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. pp. 11-118.
166. **Somasegaran, P. and Hoben, H. J.** 1994. *Handbook for Rhizobia*. Springer-Verlag. New York. 450 p.
167. **Sprent, I. J.** 1994. Evolution in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory?. *Plant and Soil*. 161: 1-10.
168. **Sprent, J. I.** 2001. *Nodulation in legumes*. Royal Botanic Gardens, Kew. 146 p.
169. **Stancheva, I., Dimitrov, I. Kaloyanova, N.; Dimitrova, A y Angelov, M.** 1992. Effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on photosynthetic enzyme activities and grain yield in Maize. *Agronomie* 12:319-324.
170. **Stiens, M., Schneiker, S., Keller, M., Kuhn, S., Puhler, A., Schluter, A.** 2006. Sequence analysis of the 144-kilobase accessory plasmid psmesm11a, isolated from a dominant *Sinorhizobium meliloti* strain identified during a long-term field release experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3662–3672.
171. **Teaney III, G. B. and Furhmann, J. J.** 1993. Soybean response to nodulation by Rhizobitoxine-producing bradyrhizobia as influenced by nitrate application. *Plant and Soil*. 154: 219-225.
172. **Torriente, Doris.** 2010. Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. *Perspectivas de su uso en Cuba. Cultivos Tropicales*. 31: 19-26.
173. **TRAXCO,** 2010. <http://www.traxco.es/blogposibles-averias-de-un-pivot>. Biofertilizante. Consultado el 7 de mayo de 2012.
174. **Treto, E.; Arzola, N.** 1993. La nutrición de las plantas por la vía de la agricultura orgánica. Conferencias y mesas redondas. Primer Encuentro Nacional de Agricultura Orgánica. ISCAH, La Habana, Cuba. p. 23.

175. **Tsagou, V; Kefalogianni, I.; Sini, K. and Aggelis, G.** 2003. Metabolic activities in *Azospirillum lipoferum* grown in presence of NH_4^+ . Appl. Microbiol. Biotechnol. 62:574 -578.
176. **Uribe, V. G.** 2004. Los Biofertilizantes en la Producción de Maíz en Yucatán. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Sureste. Campo Experimental Uxmal. Folleto Técnico. pp. 27.
177. **Utkhede, R. S.; Koch, C. A. and Menzies, J. G.** 1999. Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Phytium aphanidermatum*. Can. J. Plant Pathol. 21: 265-271.
178. **Van Peer, R.; Niemann, G. J. and Schippers, B.** 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of a carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. Phytopathology 81: 728-734.
179. **Vasal, S. K.** 2002. High quality protein corn. In: Hallauer, AR. ed. Specialty corns. 2 ed. CRC Press, Boca Ratón, Fl. USA. p. 85-129.
180. **Vasal, S. K.; Vergara, N.; Mc Lean, S.** 1994. Estrategias en el desarrollo de híbridos tropicales de maíz. Agronomía Mesoamericana 5:184-189.
181. **Velazco, Ana.** 1993. Biofertilización con *Azospirillum brasilense*. En: Curso de Agricultura Orgánica. ISCAH. La Habana, Cuba. p. 16
182. **Vincent, J. M.** 1970. A manual for the practical study of root nodules bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh. 164 p.
183. **Vivienne, N.; Matiru, F. D. and Dakora, S.** 2004. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. Afr. J. Biotechnol. 3(1):1-7.
184. **Waisel, Y.; Eshell, A. and Kafkafi, U.** 2002. Plants roots. The hidden half. Third edition revised and expanded. Marcel Dekker. New York. 1120 p.
185. **Wang, T., Romero-Martínez, J. and López-Lara, I.** 2001. *Rhizobium* y su destacada simbiosis, cap. 8. In E. Martínez-Romero and J.

Martínez-Romero (eds.). Microbios. Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México.

186. **Werner, D.** 1992. Physiology of nitrogen-fixing legume nodules. Compartments and functions- In: Stacey, G. Burris, R. H. and Evans, H. J. (Eds). Biological nitrogen fixation. Chapman & Hall. New York, N. Y. U. S. A. pp 399-431.
187. **Yanni, Y.; Rizk R.; Fattah, F.K. and Squartine, A.** 2001. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice root. Australian Journal of Plant Physiology. 28: 845-870.
188. **Young, C. C., Juang, T. C y Chao, C. C.** 1988. Effects of *Rhizobium* and vesiculararbuscular mycorrhiza inoculations on nodulation, symbiotic nitrogen fixation and soybean yield in subtropical-tropical fields. Biol. Fertil. Soils. 6:165-69.
189. **Young, J. P. W.** 1996. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. Plant and Soil. 186 : 45-52.
190. **Young, J. P. W. and Haukka, K.** 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. J. Phytol. 133: 87-94.

Otros sitios consultados:

<http://www.comaiz.mx/importancia-maíz>. 2007. Importancia del maíz. Consultado el 8 de mayo de 2012.

<http://www.controlbiológico.com/directorio-provedores-agri.htm>. 2012. Agricultura orgánica. Bacteria *Azospirillum brasilense* y *Azotobacter chococum* promotoras del crecimiento vegetal. Consultado el 8 de mayo de 2012.

<http://es.wikipedia.org/wiki/ambiente>. 2011. Rizobio. Consultado el 7 de mayo de 2012.

<http://apuntes.rincóndelvago.com/rhizobium.html>. 1998. *Rhizobium* Consultado el 8 de mayo de 2012.

Nota: Zamora y Martínez Romero (Año 2001) están por citar.