

Universidad “José Martí Pérez”

Sancti Spíritus



Tesis en opción al Título Académico de
Máster en Ciencias Agrícolas
Mención: Granos

Título: Influencia de la inoculación con rizobios en sorgo
(*sorghum bicolor L Moench.*), bajo condiciones de
campo en Sancti Spíritus, Cuba.

Autor: Ing. Olga Lidia Colina Agramonte

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

2012

“Año 54 de la Revolución”

Universidad “José Martí Pérez”

Sancti Spíritus



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



Mención: Granos

**Título: Influencia de la inoculación con rizobios en sorgo
(*Sorghum bicolor* L , Moench), bajo condiciones de
campo en Sancti Spíritus, Cuba.**

Autor: Ing. Olga Lidia Colina Agramonte

2012

“Año 54 de la Revolución”

PENSAMIENTO

Nada sugiere tanta y tan hermosa literatura como un párrafo de ciencia.

José Martí.

Dedicatoria

A mis padres, por ser el motivos de mis días, luz a mis caminos, fuente de inspiración, por quienes lucho hasta el fin.



Agradecimientos

- *Le agradezco y le doy las gracias profundamente por la ayuda brindada, por su enseñanza y experiencia personal, al investigador Dr. Carlos J. Bécquer, además de ser el tutor del presente trabajo.*
 - *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 para determinar el efecto de la inoculación con rizobios en sorgo, para seleccionar las mejores cepas con vistas a su aplicación práctica. Se utilizaron 12 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 12 kg/ha. El marco de siembra fue de 50cm entre surco, a chorrillo espaciado. 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* y se halló la relación estadística entre variables. Se evaluaron la variables agroproductivas peso seco aéreo, índice de efectividad de la inoculación, longitud del tallo, longitud de la panoja y peso seco de la panoja. Se demostró la capacidad de un número significativo de cepas de influir positivamente en variables agronómicas de sorgo, ya que existieron tratamientos inoculados que superaron estadísticamente los valores del control absoluto y otros igualaron sus valores a los del control fertilizado. En general, la relación estadística entre variables fue débil, aunque existió una fuerte relación del peso de la panoja con respecto a la longitud del tallo en los tratamientos inoculados con las cepas de referencia, lo que indica la posible influencia de las hormonas producidas por los rizobios. Los resultados obtenidos demostraron las perspectivas positivas desde el punto de vista económico de la inoculación de sorgo.

Palabras clave: sorgo, *Bradyrhizobium*, variables agroproductivas, perspectivas económicas.

ABSTRACT

A field experiment was carried out with the aim of determining the effect of rhizobial inoculation onto sorghum in order to select the best strains for the agricultural practice. Twelve 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. The statistical relationship between variables was calculated. Agroproductive variables such as aerial dry weight, inoculation effectiveness index, length of stems, number of ears and ears weight were determined. Results showed the capacity of a significant number of strains to influence positively on agronomic variables of sorghum since several inoculated treatments were statistically higher as compared with the absolute control, as well as other inoculated treatments showed similar values to fertilized control. In general it was determined a weak statistical relation between variables. However, a strong relationship between weight of ears and length of stems was found which indicates a possible hormonal influence of rhizobia on plants. Obtained results demonstrated promising economic perspectives of rhizobial inoculation on sorghum.

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

ÍNDICE

Introducción.....	1
Capítulo I: Revisión Bibliográfica.....	6
I.1. Impacto ambiental de los fertilizantes químicos en la producción del cultivo del sorgo.....	6
I.2. Acercamiento a las características morfológicas y agrotécnicas del sorgo.....	7
I.3. La biofertilización: una alternativa necesaria.....	8
I.4. Tipos de biofertilizantes.....	13
I.4.1. <i>Azotobacter</i>	14
I.4.2. <i>Azospirillum</i>	15
I.4.3. <i>Pseudomonas spp</i>	17
I.4.4. Micorrizas.....	18
I.4.5. Rizobios.....	19
I.5. Características de algunos géneros representativos.....	20
I.5.1. Género <i>Azorhizobium</i>	20
I.5.2. Género <i>Mesorhizobium</i>	20
I.5.3. Género <i>Sinorhizobium</i>	21
I.5.4. Género <i>Bradyrhizobium</i>	21
I.5.5. Género <i>Rhizobium</i>	22

I.6. Reseña y efecto de los rizobios como biofertilizante.....	23
I.7. Inoculante bacteriano a base de cepas de rizobios.....	24
I.8. Sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal.....	26
Capítulo II: Materiales y Métodos.....	31
II.1. Procedencia de las cepas de rizobios	31
II.2. Procedencia de la semilla de sorgo.....	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.....	33
II.3.3. Dosis de siembra	34
II.3.4. Tipo de suelo	34
II.3.5. Fertilización inorgánica del experimento	34
II.3.6. Control de plagas y enfermedades.....	35
II.3.7. Diseño experimental y análisis estadístico	35
II.3.8. Variables evaluadas.....	35
Capítulo III: Resultados y discusión.....	36
III.1. Longitud del tallo, longitud de la panoja y peso seco de la panoja.....	36
III.2. Peso seco aéreo e índice de efectividad de la inoculación.....	40
III.3. Grado de relación estadística entre variables.....	43

III.4. Análisis de conglomerados.....	44
III.5. Impacto económico de la investigación.....	47
III.5.1. Bases de Cálculo.....	47
III.5.2. Algunas consideraciones generales.....	48
III.5.2.1. Factores suelo y fertilizante químico.....	48
III.6. Bases fisio-bioquímicas del efecto positivo de los rizobios en la planta.....	49
Conclusiones.....	51
Recomendaciones.....	52
Bibliografía.....	53

INTRODUCCIÓN

En la literatura especializada, se informa que los rizobios son colonizadores de raíces, pero específicos en cuanto a plantas hospederas, y que, por lo tanto no pueden colonizar un amplio rango de especies de plantas (Mia y Shamsuddin, 2010). Sin embargo, Cocking (2003) observó que *Azorhizobium caulinodans* puede penetrar en el sistema radicular de los cereales y otros cultivos no pertenecientes a la familia de las leguminosas, por medio de una invasión intracelular en las células epidérmicas y así coloniza la planta de forma intercelular, incluyendo el xilema, lo cual incrementa la posibilidad de la formación de un nicho no nodular para la fijación endosimbiótica de nitrógeno en arroz, trigo, maíz, sorgo y otros cultivos. Según Matiru y Dakora (2004) los rizobios producen fitohormonas que promueven el crecimiento vegetal y posiblemente incrementan los rendimientos, a pesar de no haber sido detectada alguna fijación de N₂ en las especies no leguminosas. Los resultados obtenidos por diversos autores, entre los que se encuentran Biswas *et al.*, (2000), demuestran valores estadísticos superiores en el rendimiento de grano al inocular arroz con cepas pertenecientes a *Rhizobium* sp., *R. leguminosarum* y *Bradyrhizobium* sp.

Acorde con lo expresado por Matiru y Dakora (2004), la infección rizobiana en las 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 solo se conocen los beneficios de la inoculación en plantas de trigo y de maíz, con cepas nativas de *Bradyrhizobium* sp., procedentes de los ecosistemas ganaderos de Sancti Spiritus (Bécquer *et al.*, 2006; Bécquer *et al.*, 2008), por lo que se considera que esta investigación es novedosa para el país.

El sorgo pertenece a la familia Poaceae. Es un cultivo alimenticio importante en África, América Central, y Asia Meridional, siendo la quinta cosecha de cereal en el mundo, en cuanto a su producción, y su mayor productor es los Estados Unidos. Se adapta bien al crecimiento en áreas áridas o semiáridas cálidas.

El sorgo puede ser una opción favorable para nuestra agricultura al conocerse que es capaz de soportar las condiciones de sequía gracias a su sistema radical muy desarrollado y fibroso, puede explorar aproximadamente el doble del volumen que el maíz y llegar hasta los 75 cm de profundidad, además ha mostrado buena adaptación a las condiciones edafoclimáticas de Cuba.

En nuestro país las áreas sembradas de sorgo se han ido incrementando a partir del año 2001 hasta alcanzar la cifra de 850 828 ha en el 2004 con rendimientos que oscilan entre 1.1 y 2.0 t/ha.

El uso intensivo de fertilizantes químicos y pesticidas conlleva a problemas ambientales e incremento de los costos de producción en la agricultura. Las crisis económicas y los problemas ambientales que enfrenta el planeta obligan a que se haga énfasis en las técnicas sostenibles de producción. Ej.: Biofertilizantes a base de bacterias benéficas, 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). Miles de hectáreas cultivadas con soya, frijol, caupí, así como con leguminosas forrajeras, son inoculadas con rizobios en sistemas agrícolas.

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 hospedadas, 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).

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 sorgo?

Objetivo general:

Valorar el efecto de la inoculación de rizobios nativos y comerciales en una variedad cubana de sorgo 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.- Valorar el impacto económico de la investigación.

Hipótesis:

Es factible obtener resultados agronómicos superiores o reducir los costos de producción por la no utilización de fertilizantes químicos en sorgo mediante la inoculación de diferentes cepas de rizobios.

Tipo de investigación:

Aplicada.

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

Campo de acción. Aplicar el efecto promotor de crecimiento vegetal de rizobios en sorgo, 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.

Desde el punto de vista práctico, se determinó que la tolerancia a factores abióticos extremos de las cepas nativas, unido a su alta eficiencia simbiótica, puede incrementar la productividad de las leguminosas forrajeras, destinadas a ecosistemas bajo condiciones edafoclimáticas desfavorables, lo cual es un factor positivo desde el punto de vista agronómico.

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 orgo

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 (Searchinger, 2008).

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).

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).

Los antecedentes que existen en Cuba de fertilización del sorgo se limitan a los informados por el Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, el Instituto de Investigaciones del Arroz, el Instituto de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical y el Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova, los cuales coinciden en la aplicación de 140-150 kg/ha de nitrógeno, 60 kg/ha de P_2O_5 y 60 kg/ha de K_2O , sin existir preferencias de portadores (Nápoles, 2006). Según Chaviano (2005) este cereal tiene buena respuesta a la fertilización orgánica.

I.2. Acercamiento a las características morfológicas y agrotécnicas del sorgo.

El sorgo o zahína (*sorghum vulgare* o *sorghum bicolor*) pertenece a la Familia Poaceae, cuyas semillas se utilizan para hacer harina y como forraje. Es un cultivo alimenticio importante en África, América Central, y Asia Meridional siendo la quinta cosecha de cereal en el mundo, en cuanto a su producción, y su mayor productor es los Estados Unidos. Se adapta bien al crecimiento en áreas áridas o semiáridas cálidas (Nápoles, 2006). En nuestro país se utiliza indistintamente como fuente de grano para los monogástricos y de forraje para el ganado vacuno.

El sorgo es un cultivo alimenticio importante en África, América Central, y Asia Meridional, (Nápoles, 2006). Según este autor, el sorgo puede ser una opción favorable para nuestra agricultura al conocerse que es capaz de soportar las condiciones de sequía gracias a su sistema radical muy desarrollado y fibroso, puede explorar aproximadamente el doble del volumen que el maíz y llegar hasta los 75 cm de

profundidad, además ha mostrado buena adaptación a las condiciones edafoclimáticas de Cuba.

En Cuba existen problemas de salinidad en 1 millón de hectáreas, erosión de media a fuerte y compactación elevada de los suelos, así como aumentos de suelos no fértiles y desarborización (Monzote, 2000). En nuestro país las áreas sembradas de Sorgo se han ido incrementando a partir del año 2001 hasta alcanzar la cifra de 850 828 ha en el 2004 (Canet *et al*, 2005) con rendimientos que oscilan entre 1.1 y 2.0 t/ha. La necesidad de utilizar suelos de escasa fertilidad, obliga necesariamente a un correcto manejo agronómico en la nutrición de las plantas, donde el empleo de biofertilizantes debe ocupar un lugar primordial, por sus ventajas económicas y ecológicas.

Antes de la realización del presente trabajo, no existían antecedentes en Cuba sobre la utilización de rizobios en sorgo. No obstante, la necesidad de desarrollar este cultivo en suelos de escasa fertilidad, obliga necesariamente a un correcto manejo agronómico en la nutrición, que conduzca a una máxima precisión en las vías, fuentes, dosis y momento de aplicación de fertilizantes. El empleo de inoculantes bacterianos puede ser una de las mejores alternativas, desde el punto de vista económico y medioambiental.

I.3. 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 los 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 fríjol, 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](http://mubr.asm.org/2/attachment2.htm), 2007. <http://mubr.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.4. 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 inoculante 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 Vesícula 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.4.1. *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).

I.4.2. *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 NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{2-} , K^+ , Rb^+ y Fe^{+2} 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 afecto 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.4.3. *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.4.4. 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. (Hernandez *et al.*, 1997).

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 fósforo (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 micorrízico se observa mejor en suelos de baja fertilidad. El fósforo es uno de los nutrientes que las MVA transportan a través de sus hifas hacia las plantas (Miller y Allen 1992).

I.4.5. 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 radicicola*, casi al mismo tiempo, Frank (1889) la había

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

I.5. Características de algunos géneros representativos.

I.5.1. 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.5.2. 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.5.3. 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 *Glycine 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 meliloti* 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.5.4. 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 diazótrofos simbioses 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-hidroxitirato, 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 en paréntesis (Young y Haukka, 1996).

I.5.5. 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 absorber el tinte y tienen zonas no teñidas (de polihidroxibutirato), lo cual les da un aspecto lisado (Hamdi, 1985).

Algunas cepas de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium trifolii* (posteriormente *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* [Jordan, 1984]) contienen a menudo gránulos metacromáticos (en células jóvenes), son móviles, con flagelos polares o peritricos y se tiñen fácilmente con las tinturas básicas simples, aunque las más viejas necesitan más tiempo para absorber el tinte y tienen zonas no teñidas (de polihidroxibutirato), que 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.6. Reseña y efecto de los rizobios como biofertilizante

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.7. 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 nodulares 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 moléculas 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. Así mismo, 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.8. 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:

- 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.
- 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.
- 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).

Las bacterias edáficas de vida libre con un efecto beneficioso sobre las plantas se conocen como Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal o por su acrónimo en inglés: PGPRs, (Kloepper *et al.*, 1993).

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, también 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, por lo tanto, 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 12 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	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.
HA3	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
SP15	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
JK1	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
De referencia	
ATCC10317	<i>Bradyrhizobium lupini</i>
USDA 191	<i>Sinorhizobium fredii</i>
25B6	<i>Bradyrhizobium</i> sp.

II.2. Procedencia de la semilla de sorgo

Se utilizó la variedad variedad ISIAP Dorado (*sorghum bicolor L Moench*), procedente de la Finca de Semillas de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spíritus, y que respondía a los intereses agrícolas del momento en la provincia.

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 18 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 $79^{\circ} 21' 25''$ 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)
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 12 kg/ha. El marco de siembra usado fue de 50 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, recrude, 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

Por detectar danos incipientes de masticadores en la parte foliar de las plantas del experimento, se realizaron 3 aplicaciones de *Bacillus thuringiensis biovar. 26*, a partir de los 15 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 17 tratamientos (15 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 ($p < 0,05$). Se construyó un dendrograma mediante el método Ward, (distancia City-Block). Se hallaron análisis de regresión simple y de correlación para describir el posible impacto de un factor cuantitativo X sobre una variable dependiente Y (Ostle, 1984).

II.3.8. Variables evaluadas

Se evaluaron las siguientes variables agroproductivas: peso seco aéreo (PSA, g/parcela), longitud del tallo (LT, cm), longitud de la panoja (LP, cm) y peso seco de la panoja (PSP, kg), 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:

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

Para las mediciones de las variables se utilizaron balanzas técnicas de campo, capacidad máxima 10 kg (PSA), reglas graduadas a 3 m (LT) y a 1 m (LP). En la medición del tallo se tomó en cuenta desde la base de la exerceción hasta la base del primer entrenudo. En la variable longitud de la panoja se midió desde la base de la panoja hasta su vértice, descartando la exerceción.

CAPÍTULO III

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Longitud del tallo, longitud de la panoja y peso seco de la panoja

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, por lo que estas bacterias, al igual que otras pertenecientes a otras familias y géneros, se les conoce como PGPR (de su acrónimo en inglés) (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).

Las condiciones de déficit marcado de nutrientes en el suelo en el presente experimento, concuerdan en general, con algunas de las condiciones estresantes ambientales que se deben enfrentar en el cultivo de Sorgo en Sancti Spíritus y además, propician una mayor confiabilidad en los resultados experimentales, ya que no es de esperar una interferencia significativa por alta disponibilidad de macroelementos que pudiera enmascarar el efecto positivo de las cepas en base a sus propiedades como organismos promotores del crecimiento vegetal.

En el presente experimento, se observó que en longitud del tallo (tabla 3), excepto los tratamientos inoculados con las cepas TE4 (1,16 m), USDA 191 (1,13 m) y HA1 (1,12 m), el resto de los tratamientos resultaron estadísticamente superiores ($p < 0,05$) al control absoluto (1,13 m). Los tratamientos inoculados con las cepas HA3 (1,24 m), SP23 (1,23 m), 25B6 (1,26 m), HG2 (1,23 m) y SP8 (1,24 m), presentaron superíndices

comunes con el control fertilizado (1,25 m) y fueron estadísticamente superiores ($p < 0,05$) a los tratamientos inoculados con las cepas TE4 (1,16 m), SP12 (1,18 m), SP4 (1,19 m), JH2 (1,19 m), SP21 (1,18 m) y HA1 (1,12 m).

De acuerdo a estos datos, se corrobora lo expresado por Dobbelaere *et al.* (2003), de que los rizobios pueden estimular el crecimiento y rendimiento de las plantas no pertenecientes a las leguminosas ya que 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. Por otra parte, no se debe dejar de tener en cuenta de que las características agroquímicas del área experimental, donde se nota la baja disponibilidad de fósforo y de materia orgánica, podría haber dado lugar a que gran parte del beneficio obtenido por la planta en los tratamientos inoculados, estribara en la solubilización de fosfatos por los rizobios, propiedad que según Richardson (2001), es la forma de acción más común implicada en la promoción del crecimiento vegetal por las rizobacterias, que incrementa el aprovechamiento de nutrientes por la planta hospedera.

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.

La variable longitud de la panoja (tabla 3), muestra los tratamientos inoculados con las cepas USDA 191 (22,0 cm), SP4 (22,2 cm), JH2 (22,6 cm), HA3 (23,8 cm), ATCC 10317 (23,0 cm), HA1 (23,6 cm) y SP15 (23,0 cm) los cuales resultaron estadísticamente superiores ($p < 0,05$) al control absoluto (20,4 cm). De éstos, HA3, ATCC 10317, HA1 y SP15 mostraron valores con superíndices comunes con el control fertilizado (24,2 cm). No se cuenta con patrones de comparación para esta variable, pero los autores infieren que la influencia de las hormonas producidas por los rizobios puede ser una de las causas, al presentar estos tratamientos inoculados valores estadísticamente superiores al control absoluto y tener superíndices comunes con el tratamiento fertilizado. El género *Bradyrhizobium* ha sido reportado por diversos autores (Costacurta y Vanderleyden, 1995; Patten y Glick, 1996; Minamisawa *et al.*, 1996), como productor de ácido indolacético. Todos los tratamientos inoculados con superioridad estadística, excepto el de la cepa USDA 191 (*Sinorhizobium fredii*), pertenecen al género *Bradyrhizobium*, por lo que esta propiedad fisiológica pudiera incidir también de forma positiva en los resultados.

En cuanto al peso seco de la panoja (tabla 3), los resultados obtenidos indican que el tratamiento inoculado con la cepa SP23 (4,20 kg) fue estadísticamente superior ($p < 0,001$) al control absoluto (1,50 kg), y al resto de los tratamientos inoculados, excepto HG2 (4,05 kg), JH1 (4,00 kg), 25B6 (3,70 kg) y el control fertilizado (3,50 kg), con los cuales compartió superíndices comunes. En esta variable agronómica, también se evidencia el efecto positivo en la planta de la mayor parte de las cepas inoculadas, donde se resaltan los valores estadísticamente superiores de las 4 cepas anteriormente mencionadas, todas pertenecientes al género *Bradyrhizobium*.

Tabla 3: Resultados en, longitud del tallo, longitud de la panoja y peso seco de la panoja obtenidos en sorgo inoculado con rizobios de Sancti Spiritus, Cuba y cepas de referencia

Tratamientos	Longitud del Tallo (m)	Longitud de la Panoja (cm)	Peso Seco Panoja (kg/parcela)
TE4	1.16 ef	18.6 g	3,27 bcd
SP8	1.24 ab	21.4 ef	2,80 de
HG2	1.23 ab	21.6 def	4,05 ab
JH1	1.20 bcd	21.2 ef	4,00 ab
SP12	1.18 de	21.8 def	3,00 cde
SP4	1.19 cde	22.2 cde	1,75 fg
JH2	1.19 cde	22.6 bcde	2,83 de
SP23	1.23 ab	21.6 def	4,20 a
HA3	1.24 ab	23.8 ab	2,53 ef
SP21	1.18 de	20.4 f	2,83 de
HA1	1.12 g	23.6 abc	2,37 ef
SP15	1.21 bcd	23.0 ab	2,80 de
25B6	1.26 a	21.6 def	3,70 abc
ATCC 10317	1.23 abc	23.0 ab	2,65 de
USDA 191	1.13 fg	22.0 de	2,40 ef
Control Absoluto	1.13 fg	20.4 f	1,50 g
Control Fertilizado	1.25 a	24.2 a	3,50 abcd
95 % conf. LSD	EE: ±0,01	EE: ±0,53	EE: ±0,24

abcdefg Medias con letras diferentes dentro de cada fila difieren entre sí a $p < 0,05$.

III.2 Peso seco aéreo e índice de efectividad de la inoculación

En peso seco aéreo (tabla 4) se observa como los tratamientos, excepto aquellos inoculados con las cepas TE4 (619,5 g/parcela) y SP8 (590,0 g/parcela), resultaron estadísticamente superiores ($p < 0,05$) al control absoluto (431,0 g/parcela). Por otra parte, el resto de los tratamientos inoculados presentaron letras comunes con el control fertilizado (729,7 g/parcela), por lo que se denota el efecto positivo de las cepas inoculadas, al igualarse estadísticamente estos tratamientos con el tratamiento fertilizado. Feng Chi et al. (2005) determinaron que cepas de Azorhizobium, Sinorhizobium y Mesorhizobium inoculadas en arroz, incrementaron significativamente

el peso seco aéreo de este cereal, por lo que se corrobora, en general el efecto positivo de esta bacteria en los cereales.

Al calcular el índice de efectividad de la inoculación de los tratamientos inoculados (tabla 4), se determinó que aunque todos los tratamientos inoculados presentaron incrementos que superaron a los valores del control absoluto, los que sobresalieron en sus valores (más del 70% de efectividad) correspondieron a los tratamientos inoculados con las cepas nativas: HG2 (74,00 %), JH1 (78,65 %), SP23 (90,28 %), HA1 (74,00 %) y SP15 (72,00 %), mientras que sólo los tratamientos inoculados con la cepa de referencia: ATCC 10317 (100,00 %) y HA3 (102,09 %), presentaron un 100 % de efectividad, o sobrepasaron este valor. Nótese que estos últimos tratamientos coincidieron en que en todas las variables anteriores, presentaron superíndices comunes con el control fertilizado y fueron superiores estadísticamente al control absoluto, lo cual, a consideración de los autores señalan a las correspondientes cepas inoculadas como las más promisorias de todas las evaluadas para su aplicación en la práctica.

Si se comparan estos resultados con los encontrados por otros autores en experimentos con otros cereales, se constata que estos datos fueron superiores a los encontrados por Prévost et al. (2000), al inocular maíz con cepas comerciales de *Bradyrhizobium japonicum*, donde se obtuvieron incrementos en el peso seco aéreo de la planta desde un 6,7 % hasta 8,7 % en comparación con el control absoluto.

Por otra parte, estos mismos resultados son comparables con los obtenidos por Afeez 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.

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. 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%.

Tabla 4: Resultados en peso seco aéreo e índice de efectividad de la inoculación en los tratamientos inoculados (%) obtenidos en sorgo inoculado con rizobios de Sancti Spíritus, Cuba y con cepas de referencia

Tratamientos	Peso Seco Aéreo (g/parcela)	Índice de Efectividad de la Inoculación (%)
TE4	619,5 de	43,74
SP8	590,0 de	36,89
HG2	749,9 abcd	74,00
JH1	770,0 abcd	78,65
SP12	661,1 cd	53,39
SP4	669,0 bcd	55,22
JH2	722,0 abcd	67,52
SP23	820,0 abc	90,26
HA3	871,0 a	102,09
SP21	660,0 cd	53,13
HA1	749,9 abcd	74,00
SP15	741,3 abcd	72,00
25B6	691,2 abcd	60,37
ATCC 10317	860,0 ab	100,00
USDA 191	680,0 abcd	57,77
Control Absoluto	431,0 e	
Control Fertilizado	729,7 abcd	
95 % conf. LSD	EE: ±67,39	

abcdefg Medias con letras diferentes dentro de cada fila difieren entre sí a $p < 0,05$

III.3. Grado de relación estadística entre variables

En la tabla 5, se observa que la correlación y el grado de dependencia de los tratamientos inoculados con cepas nativas o de referencia, entre las variables longitud de la panoja y longitud del tallo fue débil (cepas nativas: $R^2= 0, 68\%$; $r= 0,08$. cepas de referencia: $R^2= 0, 041\%$; $r= 0,02$).

En cuanto a la correlación y al grado de dependencia entre peso seco aéreo y longitud del tallo en los tratamientos inoculados con las cepas nativas (tabla 5), fue también débil ($R^2= 8, 50\%$; $r=0,29$), así como en las cepas de referencia ($R^2= 12, 21\%$; $r= 0,35$). No obstante, se observa que la relación del peso de la panoja con respecto a la longitud del tallo en los tratamientos inoculados con las cepas de referencia, fue fuerte ($R^2=64,07\%$; $r= 0,35$). Estos resultados pueden estar vinculados con la secreción específica de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal por las diferentes cepas de rizobios y su forma de incidir en variables agronómicas de la planta, en relación con las condiciones ambientales presentes, lo cual de por sí constituye tema de investigaciones más profundas.

Ya que los análisis de regresión siempre presuponen la intervención de errores involucrados en la medición de las variables independientes, o de factores relacionados con dichas variables, difíciles de identificar (Castillo, 2005), sólo se puede inferir discretamente en la interpretación de los resultados obtenidos.

En este trabajo se tomó en cuenta la inoculación como factor causal. Este factor indudablemente conllevó a cambios en el sistema radical, y posiblemente a variaciones en la longitud del tallo y el peso seco de la panoja. Una investigación más profunda es altamente recomendable para hallar las causas específicas de las variaciones en la variable dependiente que se estudia.

Tabla 5: Ecuaciones de regresión lineal de las variables longitud de la panoja y peso seco aéreo (Y) con la variable longitud del tallo (X), en los tratamientos inoculados con cepas nativas, así como en los tratamientos inoculados con cepas de referencia.

Indicadores	Ecuación de regresión lineal	R ² , %	r
Longitud de la Panoja (cepas nativas)	$Y = 18,2539 + 2,94939 * x$	1,33*	0,12
Longitud de la Panoja (cepas de referencia)	$Y = 21,9396 + 0,215827 * x$	0,04*	0,02
Peso Seco Aéreo (cepas nativas)	$Y = -84,4091 + 670,606 * x$	8,50*	0,29
Peso Seco Aéreo (cepas de referencia)	$Y = 119,045 + 517,6989 * x$	12, 21*	0,35
Peso Seco Panoja (cepas nativas)	$Y = -5,24421 + 6,91444 * x$	11, 33*	0,34
Peso Seco Panoja (cepas de referencia)	$Y = -6,87122 + 8,11151 * x$	64, 07*	0,35

* $p \geq 0,1$

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 sorgo en condiciones de campo.

En el análisis de conglomerados (Fig. 1), 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 HG2, SP23, JH1, 25B6, HA3 y ATCC 10317.

Estas cepas, que representaron el 40% de las cepas aplicadas, mostraron los mayores valores estadísticamente superiores en al menos dos 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.

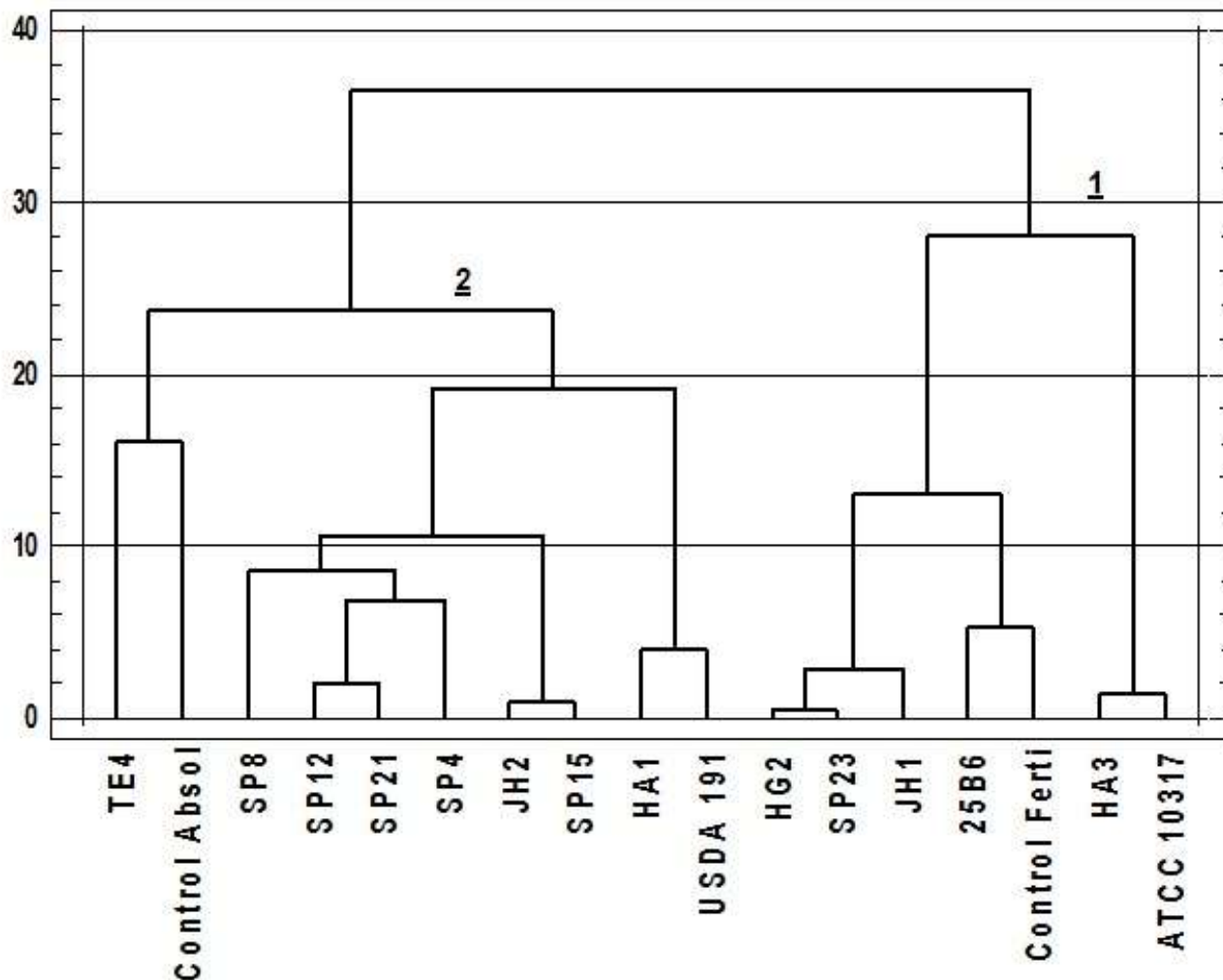


Fig. 1: Agrupación de los tratamientos mediante la construcción de un dendrograma. Método de Ward (distancia métrica *City-Block*). Se formaron dos grandes conglomerados, donde el 1 agrupó los tratamientos inoculados con resultados estadísticamente superiores en el mayor número de variables (HG2, SP23, JH1, 25B6, HA3 y ATCC 10317), así como el tratamiento fertilizado. El 2 agrupó tratamientos con menor significación estadística (TE4, SP8, SP12, SP21, SP4, JH2, SP15, HA1 y USDA 191), incluido al 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 sorgo 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.5.2 Algunas consideraciones generales

III.5.2.1. 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. Bases fisio-bioquímicas del efecto positivo de los rizobios en la planta

En este experimento un tratamiento inoculado con una cepa nativa y un tratamiento inoculado con una cepa de referencia presentaron un índice de efectividad de la inoculación superior al resto de los tratamientos, así como otras cepas, tanto nativas como de referencia, 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 diazotrofos 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 sorgo. 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. Se supone que esta sustancia hidroliza el ACC endógeno en amonio y α -cetobutirato 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 sorgo 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. Los resultados obtenidos demostraron la capacidad de un número significativo de cepas de influir positivamente en variables agronómicas de sorgo, ya que existieron tratamientos inoculados que superaron estadísticamente los valores del control absoluto y otros igualaron sus valores a los del control fertilizado. En la variable agroproductiva más importante (peso de las panojas), existieron tratamientos inoculados con las cepas nativas HG2, JH1 y SP23 que tuvieron tendencia a presentar mayor significación estadística con respecto al control fertilizado.

2. El índice de efectividad de la inoculación de todas las cepas fue positivo, aunque se destacaron los tratamientos inoculados con las cepas SP23, HA3 y ATCC 10317, con 90% y más del 100% de incremento del peso seco aéreo con relación al control absoluto. Estos resultados en la práctica agrícola, sobre todo las cepas HG2, SP23, JH1, 25B6, HA3 y ATCC 10317, en condiciones similares a las del experimento. Aunque para la utilización de este cultivo como fuente de grano para la confección de piensos, o para semilla, se requieren otras evaluaciones encaminadas a medir el efecto de los rizobios en el rendimiento de grano, por lo que las cepas que se destacaron en este experimento pueden no tener el mismo efecto en dicha variable.

3. Los resultados obtenidos demostraron las perspectivas positivas desde el punto de vista económico de la inoculación de sorgo con rizobios.

Recomendaciones

Se recomienda aplicar estos resultados en la práctica agrícola, sobre todo las cepas HG2, SP23, JH1, 25B6, HA3 y ATCC 10317, en condiciones similares a las del experimento. Aunque para la utilización de este cultivo como fuente de grano para la confección de piensos, o para semilla, se requieren otras evaluaciones encaminadas a medir el efecto de los rizobios en el rendimiento de grano, por lo que las cepas que se destacaron en este experimento pueden no tener el mismo efecto en dicha variable.

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., Holguín, 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 Huguin, 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 radicicola*: 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. **Bhattarai, T.** 1999. *Azospirillum* wheat association. Pp. 121-137 In: BN Prasad (ed.). *Biotechnology and Biodiversity in Agriculture/Forestry*. Harcourt Brace & Company Publishers. London.
 30. **Bhattarai, 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. **Canet, R.; Alemán, L. y Armenteros, M^a de los Ángeles.** 2005. Situación actual y perspectiva de la producción de sorgo (*Sorghum bicolor* Moench) en Cuba. Memorias VI Taller Internacional sobre Recursos Fitogenéticos (FITOGEN'2005), Sancti Spíritus, Cuba. pp. 166-167
-

-
44. **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* 4 5: 2 8 – 3 5
 45. **Castillo, J. J.** 2005. Modelos ecuacionales de regresión. En: *Econometria. Primera Parte*. Ed. Felix Varela. 597 p.
 46. **Castro, R.** 2008. Discurso pronunciado en la Sesión Anual del Parlamento Cubano. Periódico Granma. 4 p.
 47. **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.
 48. **Chaviano, Mariela.** 2005. El Sorgo: contribución al desarrollo sostenible y ecológico de la producción popular de arroz. *Rev. Agr. Org.* 1: 8-11.
 49. **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.
 50. **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.
 51. **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.
 52. **Cocking, E. C.** 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil.* Springer Netherlands. 252: 169-175.
 53. **Cocking, E. C.** 2004. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil.* 252:169
-

-
54. **Costacurta, A. and Vanderleyden, J.** 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21: 1-18.
 55. **Cook, R. J.** 2002. Advances in plant management in the twentieth century. *Ann. Rev. Phytopathol.* 38: 95-116.
 56. **Crowley, D. E., y Wang, C.; Reid, C. P. P. and Szaniszlo, P. J.** 1991. Mechanisms of iron aquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant and soil* 130: 179-198.
 57. **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.
 58. **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.
 59. **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
 60. **De La Cruz, R. E.; Manalo; M. Q., Aggangan, N. S. y Tambalo, J. D.** 1988. Growth of three legume trees inoculates with VA mycorrhizal fungi and *Rhizobium*. *Plant and Soil* 108:111-15.
 61. **Dibut, B., M. C. Acosta., R. Martínez y H. Ljinggren** 1995. Producción de aminoácidos y citoquininas por una cepa cubana de *Azotobacter chroococcum* *Cultivos Tropicales.* 16 (1). p. 16-18.
 62. **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.
63. **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.
64. **Döbereiner, Johanna.** 1968. Non symbiotic nitrogen fixation in tropical soils. *Pesq.agropec. bras.* 3:1.
65. **Döbereiner, J. Urquiaga, S., Boddey, R. M. and Ahmad, N.** 1995. Alternatives for nitrogen of croops in tropical agriculture. Nitrogen economy in tropical soil. *Fertilizer Research.* 42:339-346.
66. **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.
67. **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.
68. **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.
69. **Elkan, G. H. and Kuykendall, L. D.** 1981. Carbohydrate metabolism. In: *Nitrogen Fixation.* Vol. II. Edited by Oxford University. Press, London. Pp. 147-166.
70. **Essalmani, H. and Lahlou, H.** 2003. Mécanismes de bioprotection des plantes de lentile par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* sp. *Lentis. C.R. Biologies.* 326 : 1163-1173.

-
71. **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.
 72. **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.
 73. **Feng, Chi ; Shen Shi-Hua; Cheng Hai-Ping; Jing Yu-Xiang; Yanni, Y. G.; Dazzo, F. B.** 2005. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. environ. Microbiol.* 71: 7271-7278.
 74. **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.
 75. **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).
 76. **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.
 77. **Ferrero, R. y Alarcón, A.** 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sun* 8 (2): 175-183.K.
 78. **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.

-
79. **Font Quer, P.** 1977. Diccionario de Botánica. 6ª. reimpresión. Editorial Labor S. A., Barcelona, España. 1244 p.
80. **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.
81. **Frank, B.** 1889: Uber die pilzsymbioseder leguminosen. Ver. Deut. Bot. Gesell. 7: 332-346.
82. **Fuentes, L. M. R.** 2002 El Cultivo del Maíz en Guatemala. Una guía para su manejo agronómico. Instituto de Ciencia y Tecnologías Agrícolas (ICTA)..
83. **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.
84. **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.
85. **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.
86. **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).
87. **Gregory, P. J.** 1994. Root growht and activity. In: K. J. Boote, J. M. Bennet, T. M. Sinclair, and G. M. Plausen (eds). Physiological and determination of crop yiel. Madison, Wisconsin, USA. p. 66-93.
-

-
88. **Gutiérrez A. and Martínez E.** 2001. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biotechnology*. 91: 117-126.
 89. **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.
 90. **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
 91. **Hamdi, Y. A.** 1985. La fijación biológica del nitrógeno. FAO. 160 p.
 92. **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.
 93. **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.
 94. **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.
 95. **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

96. **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.
97. **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**.
98. **Hernández, M.; Pereira, M. y Tang, M.** 1994. Utilización de microorganismos Biofertilizantes en los cultivos tropicales. Pastos y Forrajes. 17: 183 – 192.
99. **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.
100. **Hilali, A.; Prévost, Danielle; Broughton, W. J. and Antoun, H.** 2001. Effects de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii sur la croissance du blé dans eux sols du Maroc. Can. J. Microbiol. 47: 590-593.
101. **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.
102. **Höflich, G.; Wiehe, W. and Köhn, G.** 1994. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. Experientia. 50:897.
103. **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.

-
104. **Jordan, D. C.** 1984. Rhizobiaceae. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. V. 1. Ed. N. R. Kreig. Pp. 234-256. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
105. **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.
106. **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.
107. **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.
108. **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.
109. **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.
110. **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.
111. **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.
112. **Kevin, V. J.** 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil. 255:571-586
113. **Kloepper, J. W.** 1993. Plant growth – promoting rhizobacteria as biological control agents. Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural
-

-
- and Environmental Management. F. B. meeting, Jf., ed. Marcel Dekker Inc. New York. USA. Pp. 255-274.
114. **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.
115. **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.
116. **Kramer, P. J.** 1983. Water relations of plants. Academic Press, Santa Clara, CA, USA. 489 p.
117. **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.
118. **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.
119. **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.
120. **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.
121. **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.
-

-
122. **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.
123. **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.
124. **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.
125. **Martin, J. L.** 2007. Utilization of dried distillers grains for developing beef heifers. *J. Anim. Sci.*85:2298.
126. **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
127. **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
128. **Martínez-Romero, Esperanza and Caballero-Mellado, J.** 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 2: 113-140.
129. **Martínez-Romero, Esperanza and Palacios, R.** 1990. The *Rhizobium* genome, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 9:59.
130. **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.
-

-
131. **Martínez Viera, R.** 1986. Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo. Editorial Científico Técnica. La Habana, Cuba. 167 p.
132. **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
133. **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.
134. **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.
135. **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.
136. **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.
137. **Miller, S. L. and Allen, E B.** 1992 Mycorrhizal Functioning. M F Allen Ed.
138. Chapman & Hall. 301-332. 534 p.
139. Minamisawa K.; Ogawa, K. L.; Fukuhara, H. and Koga, J. 1996. Indolepyruvate pathway for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Bradyrhizobium elkanii*. *Plant Cell Physiol.* 37: 449-453.
140. **Ministerio de la Agricultura.** 2009. Guía técnica para la producción del cultivo del maíz. 15 p.
141. **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.
-

-
142. **Muñoz, R. R.** 2006. Referente Regional de Comercialización. Informe de coyuntura del Mercado de granos. INTA EEA Pergamino. Pág. 1-9.
143. **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.
144. **Nápoles, J. A.** 2006. Estudio de alternativas de fertilización orgánica y biológica en *Sorghum bicolor* L. Moench. Tesis en opción al grado de Maestro en Ciencias Agrícolas. Universidad Agrícola de Ciego de Ávila. 66 p.
145. **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.
146. **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.
147. **Okon, Y.** 1994. *Azospirillum/plant associations*. Edited by Yaacov Okon.
148. **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.
149. **Ostle, B.** 1984. *Estadística aplicada*. Ed. Científico Técnica. 629 p.
150. **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.
151. Patten, C. L. and Glick, B. R. 1996. Bacterial biosynthesis of indol-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220.
152. **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.
-

-
153. **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
154. **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>.
155. **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.
156. **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.
157. **Purseglove, J. W.** 1972. Tropical Crops: Monocotyledons. Longman, London.
158. **Ramírez, H. A.** 2008. Granos secos de destilería con solubles en dietas para bovinos lecheros.
159. **Read, D.** 1998. Plants on the web. Nature. 396: 22-23.
160. **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.
161. **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.
-

-
162. **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.
163. **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.
164. **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.
165. **Richardson, A. E.** 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 28, 897–906.
166. **Rinaudo, G.; Orenga, 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.
167. **Rodríguez, A. J.; Rojas, M. M.; Trujillo, I.; Manzano, J.; Heydrich, M.** 2003. Caracterización de la Comunidad Microbiana Endófito 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.
168. **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.
169. **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.
170. **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.
-

-
171. **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.
172. **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.
173. **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.
174. **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.
175. **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.
176. **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.
177. **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.
178. **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.
179. **Somasegaran, P. and Hoben, H. J.** 1994. *Handbook for Rhizobia*. Springer-Verlag. New York. 450 p.

-
180. **Sprent, I. J.** 1994. Evolution in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory?. *Plant and Soil*. 161: 1-10.
181. **Sprent, J. I.** 2001. Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens, Kew. 146 p.
182. **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 Maite. *Agronomie* 12:319-324.
183. **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 Wold release experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3662–3672.
184. **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.
185. **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.
186. **TRAXCO,** 2010. <http://www.traxco.es/blogposibles-averias-de-un-pivot>. Biofertilizante. Consultado el 7 de mayo de 2012.
187. **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.
188. **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.
189. **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.
-

-
190. **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.
 191. **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.
 192. **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.
 193. **Vasal, S. K.; Vergara, N.; Mc Lean, S.** 1994. Estrategias en el desarrollo de híbridos tropicales de maíz. Agronomía Mesoamericana 5:184-189.
 194. **Velazco, Ana.** 1993. Biofertilización con *Azospirillum brasilense*. En: Curso de Agricultura Orgánica. ISCAH. La Habana, Cuba. p. 16
 195. **Vincent, J. M.** 1970. A manual for the practical study of root nodules bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh. 164 p.
 196. **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.
 197. **Waisel, Y.; Eshell, A. and Kafkafi, U.** 2002. Plants roots. The hidden half. Third edition revised and expanded. Marcel Dekker. New York. 1120 p.
 198. **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.
 199. **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.

200. **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.
201. **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.
202. **Young, J. P. W.** 1996. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. Plant and Soil. 186 : 45-52.
203. **Young, J. P. W. and Haukka, K.** 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. J. Phytol. 133: 87-94.

Otros sitios consultados:

1. <http://www.comaiz.mx/importancia-maíz>. 2007. Importancia del maíz. Consultado el 8 de mayo de 2012.
2. <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.
3. <http://es.wikipedia.org/wiki/ambiente>. 2011. Rizobio. Consultado el 7 de mayo de 2012.
4. <http://apuntes.rincóndelvago.com/rhizobium.html>. 1998. *Rhizobium* Consultado el 8 de mayo de 2012.