

**Universidad de Ciego Ávila
Centro de Bioplasmas**

**Estimulación del crecimiento de plantas de piña
(*Ananas comosus*, L. Merr) cv. Cayena lisa en
fase de aclimatización mediante la inoculación
de *Azotobacter chroococcum***

**Tesis Presentada en Opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias Agrícolas**

MSc. Rayza Margarita González Rodríguez

Ciego de Ávila
2013

**Universidad de Ciego Ávila
Centro de Bioplasmas**

**Estimulación del crecimiento de plantas de piña
(*Ananas comosus*, L. Merr) cv. Cayena lisa, en fase
de aclimatización mediante la inoculación de
*Azotobacter chroococcum***

**Tesis Presentada en Opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias Agrícolas**

Autor: MSc. Rayza Margarita González Rodríguez
Tutores: Dr. C. Bernardo Dibut Álvarez
Dr. C. Lázaro Eduardo Pulido Delgado

Ciego de Ávila
2013

Citación correcta Norma ISO 690

Según Sistema de Referencia Numérico

1. González-Rodríguez, Rayza M. Estimulación del crecimiento de plantas de piña (*Ananas comosus*, L. Merr) cv. Cayena lisa en fase de aclimatización mediante la inoculación de *Azotobacter chroococcum*. [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Ciego de Ávila: Universidad “Máximo Gómez Báez”. 2013.

Según Sistema de Referencia Apellido, año

González-Rodríguez, Rayza M. 2013. Estimulación del crecimiento de plantas de piña (*Ananas comosus*, L. Merr) cv. Cayena lisa en fase de aclimatización mediante la inoculación de *Azotobacter chroococcum*. [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Ciego de Ávila: Universidad “Máximo Gómez Báez”.

Dedicatoria

A mis dos grandes amores Christian y Sander por comprender mis ausencias y darme la fuerza que tanto necesité

A mi papi amado, el más incondicional de mi vida

A mama y tía que he tenido sus manos desde el día que nací

A Alfre por seguir mi camino y apoyar mis desafíos. Por el amor que compartimos

A mi mami porque su luz me guía siempre

A toda mi familia querida, mi joya más preciada

Gracias por su apoyo sin ustedes imposible haberlo logrado

Agradecimientos

A Dibut (Dr. Bernardo Dibut) por ser un amigo y tutor excelente. Porque no dudó en ofrecerme su confianza, experiencia y fortaleza en este reto que hemos compartido juntos.

A Pulido (Dr. Lázaro E. Pulido) por aceptar un día seguirme en mi cabalgata y estar ahí ofreciéndome sus consejos oportunos.

A Mayda, (técnico de laboratorio) amiga querida que en gloria estés. Porque seguiste mis pasos, me distes tu tiempo, experiencia y fuerza en esta batalla que hubiera deseado que acompañaras hasta el final.

A Alitza y Julia porque apoyaron mi retaguardia y calzaron la ausencia de Mayda. A Taletha mi querida estudiante que apoyó esta investigación y la convirtió en suya también.

A Jose (Dr. José C. Lorenzo Feijó) porque contar contigo se hizo vital, tus criterios, percepciones, y conocimientos fueron esenciales.

A Marrero (José Marrero) por permitirme aprender de sus manos la histología y regalarme sus conocimientos.

A Yaima, Diego y Fidel que cuidaron de mis experimentos como suyos y contribuyeron a mis resultados.

A Justo (Dr. Justo González) por guiarme, y aclarar mis dudas oportunamente siempre que lo necesité.

A Truji (Dr. Reynaldo Trujillo) por dedicarme parte de su tiempo y brindarme su sabiduría infinita.

A Carli (Dr. Carlos Aragón) porque como buen amigo me nutrí de sus conocimientos y de su valioso tiempo.

A Monguin (Dr. Ramón Santos) por confiar en mí, ofrecerme tus conocimientos y alentarme en todo momento.

A Yelenys (Dra Yelenys Alvarado) porque una vez más amiga estuviste ahí bien cerca, cultivando mi obra y nutriéndola de tus valiosos conocimientos.

A Oscarin (Dr. Oscar Concepción) amigo de la vieja guardia, por compartir tu escaso tiempo conmigo y brindarme tu apoyo incondicional.

A Lourdita (Dra Lourdes Yabor) gracias por siempre estar ahí, por criticar valiosamente mi obra para que fuera perfecta y levantar mi frente cuando veía inalcanzable el camino.

A Aurora (Dra Aurora Pérez) porque puso en mis manos su experiencia y vivencias y guió mis pasos.

Al Dr. Victor Olalde (laboratorio de Bioquímica Ecológica, CINVESTAV, Irapuato, México) por recibirme en su laboratorio. A todos mis colegas y amigos del CINVESTAV, que me brindaron su colaboración, y sobre todo su eterna amistad: Rosy, Kike, Yolanda, Oralia, Heriberto, Fernando, Susy, Mago, Horacio, Isabel, Aurora. Y a todos los que de una forma u otra apoyaron mi estancia.

A Tere y Blanquita (Dras. Ma. Caridad Nápoles y Blanca de la Noval) del INCA por su valiosísima contribución al mejoramiento de esta obra. Tenerlas cerca fue un gran apoyo, sentí que podía llegar a la meta. A la Dra Idíoleydís y los compañeros del laboratorio de Biofertilizantes, INCA por colaborar y brindarme su valoraciones para mejorar este trabajo.

A Romelio, Maritza, Martha, Marcos, Nicolás, Richard porque sus conocimientos y experiencia fueron valiosos para desarrollar esta tesis. A Dayamí, Nancy y Lianet por su orientación oportuna.

A Cristi (Dra. Ma. Cristina Pérez) porque aún desde lejos siempre estas cerca y solo basta llamarte para que ahí estés y disuelvas las resistencias.

A mis compañeros del laboratorio de Interacción Baby, Ermis, Nayanci por confiar en mí y orientar mi camino varias veces.

A Maita, Nuvia, Leya, Carol, Iris, Mariela, Luly, Yary, Janet porque han estado al alcance de mis manos en esta larga travesía.

A Ángel (el chino) que tantas veces puso su destreza en función de encuadernar esta tesis. A las muchachitas del Departamento de Economía donde siempre encontré las puertas abiertas. A Yordanis por apoyarme en momentos decisivos.

A Enedina mi ventolera que siempre llega con sus vientos a calzar mi tiempo y mis deberes.

A todos los que de una forma u otra han contribuido al desarrollo de esta obra. MUCHAS GRACIAS!!!!

ABREVIATURAS

ABA: Ácido absícico

AG₃: Ácido giberélico

AIA: Ácido indolacético

ANA: Ácido naftalenacético

ANOVA: Análisis de varianza.

ARC: Actividad reguladora del crecimiento

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosin trifosfato

BCA: Agentes de control biológico, por sus siglas en inglés: Biological Control Agents

BSA: Albúmina de suero bovino, por sus siglas en inglés: Bovine Serum Albumin

C₂: Ciclo fotosintético de oxidación del carbono

C₃: Metabolismo de los ácidos tricarbónicos

CAM: Metabolismo ácido de las crasuláceas

CI: Cutícula inferior

Cl_a: Clorofila a

Cl_b: Clorofila b

Cl_t: Clorofila total

CS: Cutícula superior

D: Ácido Aspártico

Eab: Epidermis abaxial

Ead: Epidermis adaxial

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

En: Endodermis

Ex: Exodermis

F: Fenilalanina

FBN: Fijación Biológica del Nitrógeno

Fm: Fluorescencia máxima

Fv: Fluorescencia variable

G: Glicina

HMA: Hongos Micorrízicos Arbusculares

HP: Hipodermis

I: Isoleucina

I-12: cepa *A. chroococcum* INIFAT 12

I-15: cepa *A. chroococcum* INIFAT 15

I-17: cepa *A. chroococcum* INIFAT 17

I-4: cepa *A. chroococcum* INIFAT 4

I-5: cepa *A. chroococcum* INIFAT 5

I-9: cepa *A. chroococcum* INIFAT 9

M: Médula

Me: Mesodermis externa

MF: Masa fresca

Mi: Mesodermis interna

MS: masa seca

NPK: Nitrógeno, fósforo, potasio

P: Prolina

PA: Parénquima acuífero

PC: Parénquima clorofílico

PGPM: Microorganismos promotores del crecimiento vegetal, por sus siglas en inglés: Plant Growth Promoting Microorganism

PGPR: Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, por sus siglas en inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PSII: Fotosistema II

S: Serina

SFR: Suelo Ferralítico Rojo

T: Treonina

TAA: Tecnología de aclimatización con la aplicación de *Azotobacter chroococcum*

TAV: Tecnología de aclimatización vigente

Tris-HCL: Tris-ácido clorhídrico

UFC: Unidades formadoras de colonias

V: Valina

Vit: Producción de vitaminas

SÍNTESIS

Con el objetivo de determinar la estimulación del crecimiento de plantas de piña (*Ananas comosus* L. Merr) en fase de aclimatización inoculadas con *Azotobacter chroococcum*, se desarrollaron un conjunto de experimentos en el Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila. Se emplearon en todos los casos plantas de piña cv. Cayena lisa, inoculadas con la bacteria y un control sin inocular. Del análisis de efectividad de diferentes cepas de *A. chroococcum*, el mejor comportamiento correspondió a la cepa INIFAT 5 (I-5). La frecuencia de aplicación cada cuatro semanas con esta cepa, propició la mayor estimulación en el crecimiento de las plantas. Las poblaciones de la bacteria en el sustrato disminuyeron significativamente a los 28 días después de la inoculación. Se pudo comprobar que *A. chroococcum* ejerció una acción estimuladora sobre 34 de los 38 indicadores bioquímicos, fisiológicos y morfológicos analizados, lo que permite explicar los efectos que a nivel agrobiológico provoca en el crecimiento de las plantas de piña. El empleo de la cepa INIFAT 5 incrementó la calidad de las plantas obtenidas y permitió acortar a cuatro meses el período de aclimatización y reducir el costo de producción en 6009,07 CUP en cada lote de plantas que se produce. Los resultados obtenidos constituyen los primeros reportes de caracterización de estos indicadores en plantas de piña inoculadas con bacterias estimuladoras del crecimiento vegetal.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Características generales e importancia económica del cultivo de la piña	5
2.1.1 <i>Requerimientos esenciales para el crecimiento del cultivo.....</i>	<i>7</i>
2.2 La biotecnología, una herramienta para la producción de plantas	8
2.2.1 <i>La fase de aclimatización de la piña.....</i>	<i>9</i>
2.3 <i>Los microorganismos empleados como biofertilizantes. Importancia de su uso</i>	<i>10</i>
2.4 Papel de la rizosfera en la efectividad de los biofertilizantes.....	13
2.5 La fijación biológica del nitrógeno atmosférico.....	15
2.6 Características taxonómicas y potencial bioquímico-fisiológico del género <i>Azotobacter</i>	16
2.6.1 <i>Características del género <i>Azotobacter</i></i>	<i>16</i>
2.6.2 <i>Efecto de <i>Azotobacter chroococcum</i> sobre el crecimiento de las plantas y su acción como estimulador del crecimiento.....</i>	<i>17</i>
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Efecto de diferentes cepas de <i>Azotobacter chroococcum</i> sobre el crecimiento de plantas de piña cv. Cayena lisa en fase de aclimatización.....	24
3.2 Efecto de la frecuencia de aplicación de la cepa seleccionada de <i>Azotobacter chroococcum</i> sobre el crecimiento de plantas de piña cv. Cayena lisa en fase de aclimatización	25
3.3 Comportamiento de las poblaciones de <i>Azotobacter chroococcum</i> en el sustrato en el período de crecimiento de las plantas de piña en fase de aclimatización	26
3.4 Determinación de los cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que se producen en las plantas de piña con la inoculación de <i>Azotobacter chroococcum</i>.....	27
3.4.1. <i>Análisis histológico.....</i>	<i>27</i>
3.4.2 <i>Determinación del contenido de minerales.....</i>	<i>28</i>
3.4.3 <i>Determinación de la concentración de aminoácidos y de proteínas totales.....</i>	<i>29</i>
3.4.4 <i>Determinación de la concentración de carbohidratos totales.....</i>	<i>30</i>
3.4.5 <i>Determinación del contenido de clorofilas a, b y totales.....</i>	<i>30</i>
3.4.6. <i>Determinación de la máxima eficiencia cuántica del fotosistema II (Fm/Fv), fotosíntesis neta y transpiración.....</i>	<i>31</i>
3.5 Análisis de factibilidad económica de la aplicación de <i>Azotobacter chroococcum</i> en la fase de aclimatización de plantas de piña.....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1 Efecto de diferentes cepas de <i>Azotobacter chroococcum</i> sobre el crecimiento de plantas de piña cv. Cayena lisa en fase de aclimatización.....	33

4.2 Efecto de la frecuencia de aplicación de la cepa seleccionada de <i>Azotobacter chroococcum</i> sobre el crecimiento de plantas de piña cv. Cayena lisa en fase de aclimatización	39
4.3 Comportamiento de las poblaciones de <i>Azotobacter chroococcum</i> en el sustrato en el período de crecimiento de las plantas de piña en fase de aclimatización	48
4.4 Determinación de los cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos, que se producen en las plantas de piña con la inoculación de <i>Azotobacter chroococcum</i>	51
4.4.1 <i>Análisis histológico</i>	51
4.4.2 <i>Determinación del contenido de minerales</i>	59
4.4.3 <i>Determinación de la concentración de aminoácidos y de proteínas totales</i>	62
4.4.4 <i>Determinación de la concentración de carbohidratos totales</i>	68
4.4.5 <i>Determinación del contenido de clorofilas a, b y totales</i>	69
4.4.6 <i>Determinación de la máxima eficiencia cuántica del fotosistema II (Fm/Fv), fotosíntesis neta y transpiración</i>	71
4.5 Análisis de factibilidad económica de la aplicación de <i>Azotobacter chroococcum</i> en la fase de aclimatización de plantas de piña	77
5. CONCLUSIONES	91
6. RECOMENDACIONES	92
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
8. ANEXOS	
9. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE TESIS.	
9.1. Publicaciones Científicas.	
9.2 Participación en eventos científicos	
9.3 Distinciones y reconocimientos	
9.4 Tesis tutoradas	
9.5 Síntesis del currículo del autor.	

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la piña (*Ananas comosus* (L.) Merril) es la especie económica más importante de la familia Bromeliaceae, su producción anual en el 2011 alcanzó 21,58 millones de toneladas (FAOSTAT, 2013). Ocupa el sexto lugar entre los frutales que se cultivan con fines comerciales y el área cultivable continúa aumentando en el mundo (Bartholomew, 2009). Cayena lisa es uno de los cultivares que posee caracteres de elevada importancia agronómica como son los altos rendimientos y calidad de la fruta (Firoozabady *et al.*, 2006). Sin embargo, en las últimas décadas el mercado de fruta fresca y la producción industrial con esta variedad cambió después que la corporación Delmonte introdujo la variedad MD-2 oficialmente en 1996 (Bartholomew, 2009). En Cuba, aunque su producción se incrementó en los últimos años, aún no se logra satisfacer la demanda de la fruta en el mercado. Entre las causas que inciden en la baja producción se encuentran la carencia de material vegetal de plantación a través de los métodos convencionales de propagación y las afectaciones fitosanitarias en las áreas de producción de semilla (Hernández *et al.*, 2010). Por ello, es necesario buscar alternativas con el fin de darle solución a la problemática existente.

La multiplicación de las plantas a través del cultivo de tejidos constituye una de las mayores aplicaciones comerciales de la Biotecnología vegetal (Read, 2007), los métodos de micropropagación constituyen una eficiente alternativa para satisfacer la demanda de plantación de diferentes especies vegetales (George, 2008; Akin-Idowu *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2012). En el caso de la piña, aunque se ha elevado la disponibilidad de material vegetal con beneficios sobre la maduración uniforme de los frutos (Mhatre, 2007), los protocolos desarrollados no están exentos de problemas técnicos que aún limitan su eficiencia. Se ha avanzado en protocolos para la propagación mediante organogénesis y embriogénesis somática en diferentes cultivares (Escalona *et al.*, 1999; Sripaoraya *et al.*, 2003; González-Olmedo *et al.*, 2005; Firoozabady *et al.*, 2006; Sopic *et al.*, 2011) que se utilizan a nivel experimental o en la propagación comercial. A pesar de esto, la fase de aclimatización se extiende por periodos prolongados de tiempo debido a la lentitud del crecimiento de las plantas y a que los porcentajes de supervivencia no son elevados. En este sentido, la implantación de medidas que

aceleren el crecimiento de las plantas pueden disminuir el tiempo de aclimatización (Van Huylenbroeck *et al.*, 2000; Yanes *et al.*, 2001) y constituyen una vía impostergable de estudio e introducción en la estrategia de producción de piña.

En las últimas décadas, el incremento del rendimiento agrícola en los países desarrollados se ha basado, en el uso de estimuladores del crecimiento vegetal, entre otras tecnologías de nueva generación (Berg, 2009). Este amplio grupo de sustancias se obtienen a partir de extractos vegetales y por síntesis química en numerosos complejos industriales en el mundo, lo que ha generado un fuerte mercado internacional de estos productos. Así pueden mencionarse estimuladores del crecimiento obtenidos por diferentes vías como: síntesis, hidrólisis, manipulación por técnicas biotecnológicas de plantas superiores y algas marinas, etc. De igual forma, la literatura científica refiere otro grupo de estimuladores constituidos por algunas especies de bacterias y hongos que son capaces de producir sustancias fisiológicamente activas que aceleran el crecimiento de determinadas especies vegetales. Dentro de estos microorganismos se hayan *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., hongos micorrizógenos arbusculares, entre otros, cuya acción varía en dependencia de la especie vegetal y condiciones en que se utilicen. También se le atribuyen acciones diversas que abarcan desde la fijación biológica del nitrógeno, el incremento en la toma de agua y nutrientes por la planta, la producción de fitohormonas (Srivastava *et al.*, 2001; Berg, 2009) hasta modificaciones en la fisiología y exudación radical, lo que trae consigo cambios en la población microbiana de la rizosfera (Dibut, 2005; Castro-Sowinski *et al.*, 2007).

Por lo que, uno de los elementos más importantes que puede utilizar la agricultura sustentable en el manejo exitoso de los recursos agrícolas para satisfacer las necesidades humanas, mantener la calidad del ambiente y conservar los recursos naturales, que contribuyan a incrementar los rendimientos y disminuir el uso de fertilizantes, lo constituye el uso de los biofertilizantes o inoculantes microbianos (Izquierdo y De García., 1995; Zayed, 2012). Entre los biofertilizantes más empleados en la actualidad para el crecimiento y desarrollo de los cultivos se encuentran los elaborados a base del género *Azotobacter*. Estas bacterias están presentes en el suelo, donde se asocian al sistema radical de algunas especies vegetales y

ocasionan una aceleración del crecimiento y un aumento del rendimiento vegetal (Chen, 1997; Ahmad *et al.*, 2008). Otros autores como Samiran *et al.* (2012) refieren que el género *Azotobacter* tiene gran importancia desde el punto de vista agrícola debido a su capacidad de fijar nitrógeno.

Desde hace algunos años se ha introducido en Cuba la aplicación de los biofertilizantes en la agricultura (Dibut *et al.*, 2009), especial énfasis ha cobrado la utilización de bacterias rizosféricas de los géneros *Azotobacter* y *Azospirillum*, debido fundamentalmente al papel que éstas cumplen en la nutrición vegetal y su influencia en la actividad fisiológica de las plantas (Ahmad *et al.*, 2005; Adesemoye y Kloepper, 2009). El uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal podría contribuir a mejorar la calidad de las plantas de piña, influir en su crecimiento y por ende disminuir el tiempo requerido para su trasplante a campo. González *et al.* (1997), demostraron que la aplicación de *A. chroococcum* en el cultivo de piña cv. Cayena lisa en fase de aclimatización mejoraba el crecimiento de las plantas. Sin embargo, los estudios fueron muy incipientes y no se dió continuidad a los resultados obtenidos para establecer un esquema de aplicación del biofertilizante en las plantas de piña. Por otra parte se requerían estudios donde se incorporaran cepas empleadas para la producción de biofertilizantes en el país, de las cuales se tienen establecidos los protocolos para su producción.

En Cuba se han realizado investigaciones con el empleo de este microorganismo como base del biofertilizante DIMARGON[®], en un amplio grupo de cultivos que incluye hortalizas, viandas, gramíneas, cítricos y frutales. Se ha logrado un incremento de los rendimientos de un 30-50% y una disminución del tiempo de cosecha de estos cultivos (Dibut, 2005). En el caso específico de la piña Weber *et al.* (2010) demostraron que la inoculación de plantas de piña cv. 'Champaka' con bacterias de la especie *Asaia bogorensis* (cepa 219) beneficiaba su crecimiento en condiciones de cultivo con riego y fertilización orgánica.

Teniendo en cuenta estos precedentes y la necesidad de incrementar la eficiencia del proceso de producción de piña por métodos biotecnológicos donde se evaluarán biofertilizantes nacionales compatibles con el ambiente, se desarrolló la presente investigación.

HIPÓTESIS: La aplicación de un biofertilizante a base de *Azotobacter chroococcum* permite incrementar el crecimiento de plantas de piña cv. Cayena lisa en fase de aclimatización.

En base a la hipótesis planteada se ejecutó un conjunto de investigaciones dirigidas a alcanzar los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL: Determinar el efecto de la aplicación de un biofertilizante a base de *Azotobacter chroococcum* sobre el crecimiento de plantas de piña cv. Cayena lisa en fase de aclimatización.

Objetivos específicos

1. Determinar la efectividad de *Azotobacter chroococcum* sobre el crecimiento de plantas de piña cv. Cayena lisa en fase de aclimatización.
2. Determinar los cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que se producen con la aplicación de la bacteria en las plantas de piña.
3. Realizar un análisis de factibilidad económica del efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococcum* en la fase de aclimatización de plantas de piña.

Novedad científica: Se establece por primera vez las condiciones de aplicación de *Azotobacter chroococcum* para la fase de aclimatización de plantas de piña (*Ananas comosus* L. Merrill) cv. Cayena lisa y se caracterizan los cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que se producen en las plantas después de la inoculación con el microorganismo. Estas caracterizaciones constituyen los primeros informes con el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la aclimatización de plantas de piña.

Valor práctico: La aplicación del biofertilizante propuesto constituye una alternativa ecológica y eficiente para aumentar el material de plantación de plantas de piña durante la fase de aclimatización. Además reduce el tiempo de permanencia de las plantas en esta fase, lo que contribuye a disminuir los costos de producción. Permite incrementar el efecto económico teniendo en cuenta el acortamiento del ciclo productivo, el ahorro de mano de obra, de aplicación de insumos, disminución de riegos programados, entre otros beneficios.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características generales e importancia económica del cultivo de la piña

La piña o ananás (*Ananas comosus* L. Merrill); es nativa de América del Sur, específicamente oriunda del centro y sur de Brasil y norte de Argentina y Paraguay; pero Brasil es el centro de origen y diversidad genética. La palabra ananás es de origen guaraní, se adoptó el término "piña" por su semejanza a la piña de una conífera. El cultivo de ésta se extendió por el mundo en los siglos XVI y XVII durante la colonización española (Leal y Coppens d'Eeckenbrugge, 1996; Souza *et al.*, 2009).

El fruto de la piña se desarrolla a partir de pequeñas bayas fusionadas unas con otras. Es grande y de forma ovoide, con una dura y espinosa cáscara cerosa compuesta por muchas secciones octogonales.

Es una planta xerófita, suculenta, terrestre, herbácea perenne con unas 30 o más hojas. La piña pertenece a la clase *Monocotiledoneae*, al orden *Bromeliales*, a la familia *Bromeliaceae*, al género *Ananas* y a la especie *comosus* (Py *et al.*, 1987). Todos los tipos cultivados de piña pertenecen a la especie *Ananas comosus* (L.) Merrill (Coppens d'Eeckenbrugge y Leal 2003). Las hojas son puntiagudas y rodean un tallo grueso, se clasifican de acuerdo a su edad desde A hasta F. La hoja D es la hoja que se emplea para evaluar el estado nutricional de la planta con una adecuada precisión debido a que puede ser consistentemente identificada y a que es la hoja más joven fisiológicamente madura (Malézieux y Bartholomew, 2003). El tallo es corto con una longitud máxima de 35 cm y un diámetro medio de 5,5 a 7 cm, los entrenudos miden de 1 a 10 mm. En el tallo se encuentra el meristemo apical y los axilares; el meristemo apical está ubicado en la corona del fruto. También allí se encuentran yemas axilares, las yemas del tallo dan lugar a los órganos de propagación de las plantas, los que surgen en la parte basal del tallo se denominan criollos; los que se desarrollan superiores a éstos, claveles; y cerca de la base del fruto, basales (Py *et al.*, 1987). Cada uno de estos propágulos vegetativos requiere un período diferente desde la plantación hasta la floración y cosecha del fruto; generalmente para los claveles de 13 a 15 meses, y de 16 a 18 meses para la corona (Bartholomew *et al.*, 2003; Davey *et al.*, 2007). Las raíces de la planta de piña son del tipo adventicias, éstas forman un

sistema compacto hasta la base del tallo con numerosas raíces vigorosas y con limitadas ramificaciones. Bajo buenas condiciones, el sistema radical puede extenderse en el suelo de 1-2 m lateralmente y hasta 0,85 m de profundidad (Coppens d'Eeckenbrugge y Leal, 2003).

La taxonomía de la piña ha sido compleja e inconsistente, basado fundamentalmente en su origen y evolución. Se reagrupa en el género simple de *Ananas*, teniendo en cuenta las características de la inflorescencia, la cual está fusionada en un fruto múltiple o sincarpio (Coppens d'Eeckenbrugge y Leal, 2003). Este género contiene dos especies nominadas *macrodontes* y *comosus* y cinco variedades denominadas *ananassoides*, *bracteatus*, *comosus*, *erectofolius* y *paraguazensis*. Esta clasificación elimina los cinco grupos nominados como Cayena, Reina, Española, Pernambuco y Perolera, propuestos por Py *et al.* (1987), la cual se basó fundamentalmente sobre características hortícolas (Davey *et al.*, 2007).

La piña es la tercera fruta tropical más importante en la producción mundial después del banano y el cítrico. El 70% de la piña producida en el mundo es consumida como fruta fresca (Bartholomew *et al.*, 2003). La tolerancia a la sequía y la fácil transportación de los propágulos vegetativos facilitó su amplia difusión por el mundo en países como Tailandia, Filipinas, Malasia, el norte de Sumatra, Hawai, Brasil, Sudáfrica, Kenya, México y Puerto Rico (Crestani *et al.*, 2010). Los principales productos de piña comercializados son las rodajas en conserva, trozos de piña, paquetes sólidos de piña molida, el jugo y la fruta fresca (Rohrbach *et al.*, 2003). El cultivar Cayena lisa se ha difundido por todo el trópico hasta convertirse en uno de los de mayor interés comercial. El 96% de las piñas que se empleaban para la industria provenían de este cultivar (Bartholomew *et al.*, 2003; Rohrbach y Johnson, 2003; Firoozabady *et al.*, 2006). Sin embargo, en los últimos años la introducción en el mercado de fruta fresca y la producción industrial de la piña de la variedad MD-2 por la corporación Delmonte, modificó la utilización en el mercado de la fruta del cultivar Cayena lisa (Bartholomew, 2009).

La piña se propaga asexualmente a través de coronas (penacho de hojas que se encuentra en el extremo superior del fruto), por retoños o bulbillos de la base del fruto (yemas ubicadas en el extremo superior del pedúnculo), por hijos axilares (retoños que salen de las yemas del tallo) y a través de plantas obtenidas por cultivo de tejidos (Rodríguez *et al.*, 2009). En Cuba, en la

actualidad, se propagan por métodos convencionales las variedades Champaka, MD-2, Serrana, Española roja y Cayena lisa (Instructivo técnico, 2011).

2.1.1 Requerimientos esenciales para el crecimiento del cultivo

Entre los elementos nutricionales que requiere la piña para su crecimiento se hayan *macronutrientes* tales como: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, y azufre; y *micronutrientes*: boro, zinc, cobre, manganeso y molibdeno. El nitrógeno, potasio, fósforo, magnesio, hierro, cobre, zinc y boro son los más comúnmente aplicados en solución foliar (Swete-Kelly, 1993). El calcio es relativamente inmóvil en las plantas, por lo que no se aplica foliarmente, éste no puede ser capaz de trasladarse a los tejidos donde está deficiente por lo que se aplica directamente al suelo (Malézieux y Bartholomew, 2003). Los nutrientes tales como fósforo, potasio y magnesio, pueden ser aplicados de forma inorgánica, al igual que el nitrógeno (Hepton *et al.*, 1993).

Otro de sus requerimientos lo constituyen las características del suelo, el cultivo prospera en suelos ácidos con un pH entre 5 y 6. La piña no tolera poco drenaje, y por su rusticidad, no es afectada por muchas enfermedades parasitarias o no parasitarias. Sin embargo, en suelos con poco drenaje puede verse afectada por la enfermedad conocida como pudrición del corazón de la piña la que constituye una de las causas más importantes que afecta el cultivo y provoca pérdidas considerables en su producción (Gómez-Lim y Litz, 2004; Botella y Fairbairn, 2005; Firoozabady *et al.*, 2006).

La temperatura es el principal factor climático que determina el crecimiento de las diferentes partes de la planta y por consiguiente su desarrollo (Py *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 2009). En un estudio de los principales problemas relacionados con el avance del cultivo en la región del Caribe, se determinó que la tasa de crecimiento relativo es lenta, pues la temperatura afecta el crecimiento de la planta y la calidad del fruto. El rango de temperatura óptima para el crecimiento del cultivo oscila de 28 y 32°C (Davey *et al.* 2007).

2.2 La biotecnología, una herramienta para la producción de plantas

Teniendo en cuenta la totipotencia celular, se han desarrollado diversas aplicaciones de la Biotecnología en el reino vegetal. Una de las aplicaciones de mayor generalización y repercusión mundial ha sido en la propagación masiva de plantas a través de la micropropagación *in vitro* (George, 2008; Hussain *et al.*, 2012). El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos, con el empleo de medios nutritivos artificiales (George, 2008).

La técnica de micropropagación de plantas ha sido ampliamente utilizada para la obtención en un corto periodo de tiempo de gran cantidad de material vegetal. La multiplicación de las plantas es la más popular de las aplicaciones del cultivo de tejidos, sus bases fueron establecidas desde los años 1950 y 1960 y fue en las décadas del 70 y 80 que se estableció una verdadera industria de micropropagación (Akin-Idowu *et al.*, 2009). La micropropagación de plantas tiene varias ventajas con respecto a la propagación convencional, las cuales se pueden definir como: altos coeficientes de multiplicación que permiten manipular grandes volúmenes de plantas en cortos períodos de tiempo, introducción rápida de nuevas variedades o clones, producción independiente de las condiciones ambientales, incremento en los rendimientos debido al rejuvenecimiento y al saneamiento del material vegetal, uniformidad en las plantas producidas y mayor facilidad en la comercialización. La micropropagación consta de cuatro etapas bien definidas: Fase 0 (preparativa), Fase 1 (establecimiento), Fase 2 (multiplicación), Fase 3: (elongación o inducción de raíces) y la Fase 4 (aclimatización). La última fase es decisiva para garantizar la propagación comercial, pues de este resultado dependerá en gran medida la calidad de las plantas y la eficiencia total del proceso (Hazarika, 2003). Sin embargo, el éxito de éste procedimiento se ha limitado por los bajos porcentajes de supervivencia que alcanzan las plantas durante la aclimatización y la lentitud del crecimiento en esta etapa (Baldotto *et al.*, 2010b).

Para el caso de la piña se han desarrollado varios protocolos de micropropagación (Daquinta y Benega, 1997; Escalona *et al.*, 1999; Botella y Fairbairn, 2005; Wang *et al.*, 2009) que utilizan esta metodología y los sistemas de inmersión temporal.

2.2.1 La fase de aclimatización de la piña

La aclimatización es la etapa final de un protocolo de micropropagación durante la cual las plantas se adaptan a los nuevos ambientes de las casas de cultivo (condiciones *ex vitro*) y por último a las de campo (Moreira, 2007). Esta etapa es el principal factor que contribuye al exitoso establecimiento del cultivo de tejidos de plantas. Las condiciones ambientales óptimas son difíciles de definir porque interfieren diversos factores como intensidad y calidad de la luz, fotoperíodo, humedad relativa, temperatura y concentración de CO₂. Éstos influyen independientemente y muchas veces no pueden ser controlados por el hombre; finalmente, las diferencias entre las especies de plantas también es un factor importante (Wainwright, 1988).

Por otra parte, el mal funcionamiento de las relaciones hídricas y el pobre desarrollo del sistema fotosintético son las principales causas de la pobre supervivencia alcanzada en esta fase (Souza *et al.*, 2001). Las plantas cultivadas *in vitro*, necesitan un largo periodo de adaptación o aclimatización previo al trasplante a campo debido al incompleto desarrollo morfológico que presentan, como por ejemplo un reducido sistema radical, hojas con cutícula muy fina y células epidérmicas con paredes periclinales externas y baja densidad estomática (Barboza, 2006).

Las plantas, como resultado del ambiente en condiciones *in vitro*, desarrollan una anatomía y fisiología diferente a las cultivadas en condiciones de campo o casas de cultivo (Majada *et al.*, 2001; Barboza, 2006). Los desórdenes observados afectan a todos los órganos de la planta, aunque con diferentes implicaciones en el crecimiento *ex vitro*. Las plantas en condiciones *in vitro* pueden mostrar carencia de tejido vascular funcional, con pobre conexión entre el tallo y el sistema radical, los cuales con frecuencia restringen la absorción de agua y sales (Torres, 2007).

Las raíces formadas en condiciones *in vitro* contienen numerosos granos de almidón, abundantes espacios intercelulares y son generalmente hipertróficas, con una longitud muy grande y tejido vascular primario, mientras que las raíces que se forman en condiciones *ex vitro* presentan células más uniformes y compactas, con tejidos vasculares primarios y secundarios (McClelland *et al.*, 1990). Las raíces pueden ser inducidas *in vitro* o *ex vitro* por las auxinas,

pero las inducidas *ex vitro* están mejor adaptadas para sobrevivir la etapa de aclimatización (Preece y Sutter, 1991). De forma general se considera que las plantas *in vitro* realizan escasa fotosíntesis, no obstante se ha confirmado la capacidad fotosintética de varias especies (Carvalho *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003; Aragón *et al.*, 2005; González-Olmedo *et al.*, 2005).

El período de aclimatización varía de 6 a 8 meses en casas de cultivo hasta lograr que las plantas alcancen una altura de 200 a 300 mm lo cual es una medida apropiada para su transferencia al campo (Teixeira *et al.*, 2001). La lentitud del crecimiento en esta fase es el principal factor limitante para una mayor generalización de la propagación *in vitro* de piña (Baldotto *et al.*, 2010b). La aplicación de medidas que aceleren el crecimiento de las plantas, pueden disminuir el tiempo de aclimatización y permitiría utilizar el mismo espacio de las casas de cultivo más veces en el año (Yanes *et al.*, 2001).

En el caso de la piña se han realizado algunos estudios para optimizar el proceso de micropropagación de la misma tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. Yanes *et al.* (2000) elaboraron una tecnología de aclimatización de piña donde establecieron que los principales aspectos que hay que tener en cuenta para lograr un buen crecimiento de las plantas son: la calidad del material *in vitro*, el tipo de sustrato, la nutrición mineral y biológica, los reguladores del crecimiento, la intensidad de la luz y la humedad.

También se han realizado otros estudios basados en la fisiología de la piña para optimizar el proceso de aclimatización teniendo en cuenta el metabolismo de este cultivo. En dependencia de las condiciones ambientales en que se desarrolle el cultivo, la piña puede mostrar un metabolismo CAM o comportarse como plantas C3 (Aragón *et al.*, 2012).

A pesar de que han sido evaluados varios factores en la aclimatización de este cultivo, aún existen dificultades en esta etapa fundamentalmente por la larga permanencia de las plantas en esta fase, así como la supervivencia la cual continúa siendo baja.

2.3 Los microorganismos empleados como biofertilizantes. Importancia de su uso

En el suelo habita una comunidad microbiana diversa que ejerce una acción directa sobre las plantas fundamentalmente en la zona alrededor de las raíces o rizosfera. Algunas bacterias que

habitan alrededor o dentro de las raíces pueden influir en el crecimiento de las plantas tanto de forma negativa como positiva. Las bacterias que ejercen acciones favorables sobre el crecimiento y desarrollo de cultivos de importancia económica son denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Lucy *et al.*, 2004; Dobbelaere y Okon, 2007).

Uno de los elementos más importantes que puede utilizar la agricultura sustentable consiste en el manejo exitoso de los recursos agrícolas para satisfacer las necesidades humanas, mientras se mantiene la calidad del ambiente y se conservan los recursos naturales (Berg, 2009). El uso de biofertilizantes o inoculantes microbianos se consideran como biotecnologías “apropiables”; término creado para las herramientas biotecnológicas que contribuyen al desarrollo sustentable. Las mismas son técnicamente factibles dentro del nivel científico-técnico de un país y proveen beneficios tangibles a los destinatarios, son ambientalmente seguras, socioeconómica y culturalmente aceptables (Izquierdo y de García, 1995; Berg, 2009).

En Cuba se han efectuado diversos estudios sobre la microflora de los suelos en los últimos 30 años. Dibut *et al.* (2009), organizaron colecciones de especies microbianas con características de biofertilizantes o estimuladores del crecimiento vegetal, mediante aislamientos realizados en gran número de regiones y suelos del país. Se ha hecho una selección de las cepas más eficientes basado en diferentes estudios bioquímicos y fisiológicos y se investigan nuevos medios de cultivos que permitan una rápida multiplicación de las bacterias así como que aumenten la síntesis de sustancias activas; todo esto ha propiciado que el uso de estos microorganismos haya tomado auge y se haya extendido su aplicación en gran número de cultivos (Pazos y Hernández, 2001; Pérez y Casas, 2005).

Los biofertilizantes pueden definirse como productos a base de microorganismos que viven normalmente en el suelo, aunque en poblaciones bajas y que al incrementar sus poblaciones por medio de la inoculación artificial, son capaces de poner a disposición de las plantas, mediante su actividad biológica, una parte importante de las sustancias nutritivas que necesitan para su desarrollo. Además suministran sustancias hormonales o promotoras del crecimiento (Dibut, 2005). Hardy y Eaglesham (1996), Hernández *et al.* (2006) y Leungvutiviroj *et al.* (2010), 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 los Hongos Micorrícicos Arbusculares (HMA) y los de acción indirecta que incluyen los solubilizadores de fósforo, los fijadores de nitrógeno atmosférico de vida libre y los estimuladores de crecimiento vegetal entre los que se destacan *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum* sp. entre otros.

También se han comenzado a evaluar combinaciones de microorganismos biofertilizadores con buenos resultados (Remans *et al.*, 2008; Zayed, 2012); con el objetivo de potenciar el efecto que cada uno de estos, de forma independiente, ejerce sobre el crecimiento de los cultivos en los cuales se han aplicado. El empleo de bacterias estimuladoras del crecimiento vegetal aplicadas como biofertilizantes ha sido evaluado en fase de aclimatización para el cultivo de la piña en otros cultivares fuera del país.

La importancia de los biofertilizantes según Izaguirre-Mayoral *et al.* (2008) radica en su capacidad para suministrar 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. Por otro lado, se reducen los problemas económicos y ecológicos que se derivan de la aplicación indiscriminada de los fertilizantes industriales (Berg, 2009).

Herrera (1998), refirió las ventajas de los preparados a base de diferentes cepas de microorganismos utilizados como biofertilizantes y expresó los beneficios en las condiciones de producción agrícola del país, con mayor referencia a los que se utilizan en Cuba en mayor o menor grado, entre los que se encuentran: *Azotobacter chroococcum*, *Rhizobium spp*, *Bradyrhizobium spp*, *Azospirillum spp.*, Hongos micorrizógenos arbusculares, *Gluconacetobacter diazotrophicus* y bacterias solubilizadoras de fósforo. Estos microorganismos han sido utilizados en una amplia gama de cultivos como hortalizas, gramíneas, frutales, cereales, cítricos, leguminosas entre otros, y se ha comprobado su capacidad de suministrar nitrógeno y reducir el uso de la fertilización nitrogenada. Por otro lado han estimulado el crecimiento y permitido incrementar los rendimientos agrícolas de los cultivos (Viñals y Villar 1999).

2.4 Papel de la rizosfera en la efectividad de los biofertilizantes

El término rizosfera fue descrito por primera vez por Hiltner (1904), como la porción de suelo influenciada por las raíces. La rizodeposición es descrita por varios autores como la transferencia de carbono desde las raíces de las plantas al suelo, comprende los exudados (pequeñas moléculas), secreciones (macromoléculas tales como enzimas), lisados de células muertas y mucilagos (Dobbelaere y Okon, 2007). La rizodeposición promueve el crecimiento y la actividad microbiana en la rizosfera y es considerada como la zona de hábitat microbiano más activa del suelo (Lucy *et al.*, 2004; Smalla *et al.*, 2006; Van Loon *et al.*, 2007; Hartmann *et al.*, 2008).

La capacidad de los microorganismos para suministrar nutrientes y estimular el crecimiento de las plantas depende de su exitoso establecimiento sobre las raíces. Lynch (1990) propuso la división de la rizosfera en endorizosfera (tejidos conductores como xilema y floema, endodermis, epidermis y extremo de la raíz) y ectorizosfera (pelos radicales, mucílagos exudados por la planta y los microorganismos, restos de células de la raíz y la superficie de la raíz o rizosfera).

Se concibe también el término espermosfera para nombrar a la zona que rodea a la semilla en estado de germinación, donde los microorganismos desarrollan una intensa actividad que afecta el futuro crecimiento de la planta. Se considera que en esta fase comienza realmente la actividad rizosférica (Piceno y Lowell, 2000; Riggs *et al.*, 2001). En general, se considera que sólo entre el 4 y 10% de la superficie de la raíz está colonizada por microorganismos (Mettingm, 1993), por lo que resulta muy necesario estudios de establecimiento de microorganismos rizosféricos en cultivos de interés económico.

Todas estas interacciones entre las plantas y los microorganismos están gobernadas por las condiciones del ambiente, el estado fisiológico y vigor de las plantas, las características del suelo, el régimen hídrico, el clima, el uso de pesticidas, la sanidad de las plantas; y el manejo agronómico (Jousset *et al.*, 2006; Rasche *et al.*, 2006). Igualmente, los microorganismos interaccionan entre ellos, donde desencadenan procesos de naturaleza antagónica o sinérgica, muy importantes para las plantas (Raaijmakers *et al.*, 2009).

El empleo de técnicas novedosas como el cultivo independiente y estudios por técnicas tradicionales de las comunidades microbianas han servido para comprender la estructura de las comunidades microbianas y su función en la rizosfera (Jousset *et al.*, 2006; Rasche *et al.*, 2006). Berg y Smalla (2009) describieron las relaciones e interacciones que ocurren en la rizosfera de las plantas (Figura 1). Estos autores refieren que en el suelo influyen varios factores tanto bióticos como abióticos en la estructura y funcionamiento de la diversidad de comunidades bacterianas, por ejemplo el clima y la época del año, los animales y plantas arvenses, tratamientos con pesticidas, tipo de suelo, especies de plantas, así como etapas del desarrollo vegetal y estado fitosanitario de las plantas (Jousset *et al.*, 2006; Rasche *et al.*, 2006). La composición de los exudados radicales varía de planta a planta, y esto influye en la población de microorganismos alrededor de las raíces.

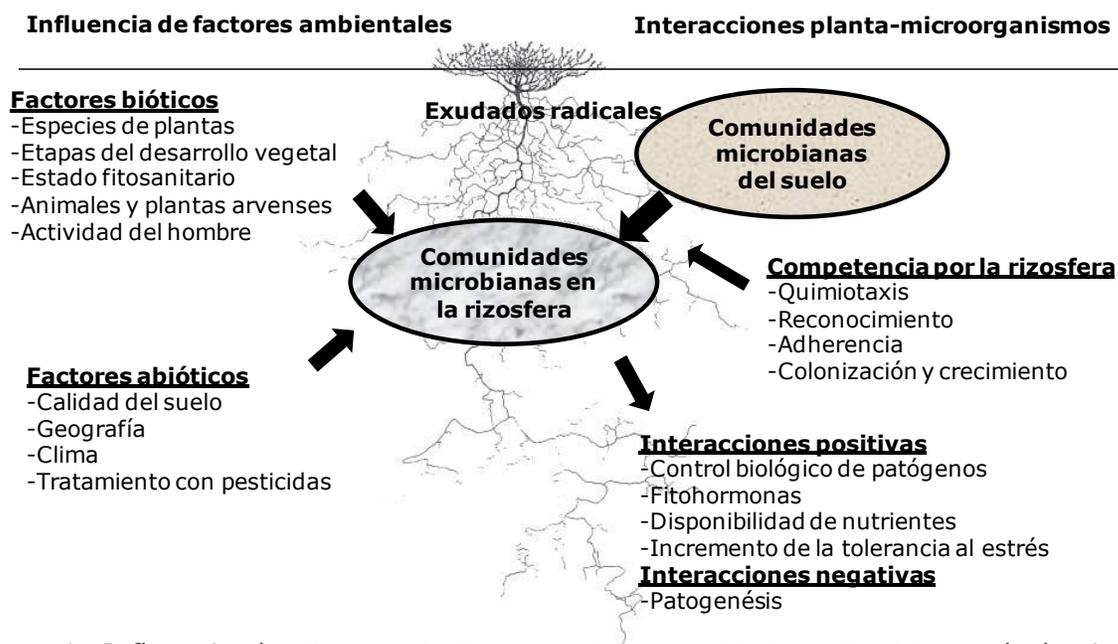


Figura 1. Influencia de diversos factores en la comunidades microbianas de la rizosfera. Un modelo de como las comunidades microbianas son seleccionadas del suelo por exudados radicales y por la competencia en la rizosfera. (Tomado de Berg y Smalla, 2009).

En la rizosfera habita una comunidad microbiana diversa donde varios géneros han sido utilizados como biofertilizantes. La interacción de microorganismos rizosféricos, como los hongos formadores de micorrizas arbusculares, hongos del género *Trichoderma*, bacterias del

género *Pseudomonas*, *Azospirillum* y *Bacillus*, entre otros, usualmente catalogados como agentes de control biológico (BCA) y microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM), han sido ampliamente estudiados (Loper *et al.*, 2007; Cassán y García-Salamone, 2008; Ryan *et al.*, 2009; Cano, 2011).

Las interacciones entre los microorganismos son complejas y se pueden presentar efectos sinérgicos que potencialicen los beneficios para la planta o, por el contrario, efectos antagónicos o, simplemente, que no ocurra ningún efecto (Ehlers, 2006; Thakore, 2006; Cano, 2011).

Como se aprecia en este acápite la rizosfera juega un papel decisivo en la efectividad de los microorganismos y su relación con las plantas. Es por ello que conocer el comportamiento de las poblaciones de *Azotobacter chroococcum* en la rizosfera del sustrato empleado para el cultivo de plantas de piña en fase de aclimatización, constituyó uno de los objetivos en el desarrollo de esta investigación.

2.5 La fijación biológica del nitrógeno atmosférico

La fijación de nitrógeno es el proceso mediante el cual el nitrógeno libre en la atmósfera se combina químicamente con otros elementos para formar compuestos orgánicos, lo cual se realiza a través de las enzimas de algunos microorganismos (Frobisher, 1969). La idea de utilizar ese mecanismo para incrementar el rendimiento de los cultivos por medio de la inoculación al suelo de bacterias fijadoras de nitrógeno, data de finales del siglo pasado (Elmerich, 2007).

Muchos microorganismos tienen gran importancia en la fijación biológica del nitrógeno (FBN), ya que en la atmósfera que rodea cada hectárea de la superficie terrestre hay 80 000 t de nitrógeno en forma molecular que no es accesible para las plantas hasta que no es fijado por un grupo especializado de ellos (Reis *et al.*, 2000). La importancia agronómica de este proceso es tan grande que se considera que si la fijación biológica no se hubiera realizado continuamente en el transcurso de la explotación agrícola durante milenios, el suelo habría perdido su capacidad de producir hace ya mucho tiempo (Altieri, 1997).

Además de su importancia en la fertilidad del suelo, la FBN es uno de los mecanismos de reposición del nitrógeno que se pierde mediante la desnitrificación, absorción por los cultivos,

percolación y erosión, por lo tanto es un proceso básico para que la vida continúe en la tierra (Echegaray, 1995).

Entre los distintos sistemas biológicos que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa contribuye con la mayor cantidad de nitrógeno al ecosistema y a la producción de alimentos. En la mayoría de los sistemas agrícolas la fuente primaria (80%) del nitrógeno fijado biológicamente ocurre a través de dicha simbiosis (Dardanelli *et al.*, 2008).

La fijación biológica del nitrógeno puede ser realizada además por microorganismos que no requieren la cooperación de otras formas vivas para fijar nitrógeno atmosférico. Aunque la mayor actividad ocurre cuando estos microorganismos se encuentran asociados a las plantas en la rizosfera y la filosfera, y aprovechan la excreción de compuestos carbonados y de otras sustancias por las raíces y las hojas para realizar este proceso (Villadas *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007). Entre las bacterias asimbióticas con más posibilidades de ser aplicadas en estos momentos en la agricultura sustentable se encuentran los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Azotobacter*, entre otros (Ahmad *et al.*, 2008).

2.6 Características taxonómicas y potencial bioquímico-fisiológico del género

Azotobacter

2.6.1 Características del género *Azotobacter*

Frobisher (1969) señaló que el género *Azotobacter* fue descubierto por Beijerinck en 1901. *Azotobacter* es uno de los primeros géneros conocidos como fijadores asimbióticos de nitrógeno y constituye uno de los géneros que más se han utilizado como promotores del crecimiento vegetal (Ahmad *et al.*, 2008). Son microorganismos del suelo de vida libre que requieren de sustancias orgánicas como fuente de energía, pero si hay abundancia de nitrato y amonio en el suelo, los emplean con facilidad y no fijan nitrógeno. Son bacterias Gram negativas, móviles; las colonias son viscosas, convexas, lisas o arrugadas y poseen pequeñas inclusiones granulares, el color se presenta en diferentes matices de pardo, producen pigmentos que en ocasiones se difunden en el medio de cultivo (Agar-Asbhy) selectivo para este género (Rubenchick, 1960; Becking, 1974). Abundan en suelos bien aireados, neutros o ligeramente

alcalinos (pH 6,0-7,5) aunque existen algunas cepas ácido resistente que crecen a pH inferiores a 5,0. Sin embargo, según Martínez, *et al.* (1985) en Cuba aunque el género está representado en los principales suelos, no se desarrolla bien en los muy ácidos y con limitantes nutricionales. Según Becking (1974), la familia de las *Azotobacteriaceas* comprende cuatro géneros: *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia* y *Derxia*, los cuales se identifican a través de diferentes pruebas bioquímico-fisiológicas como: asimilación de azúcares simples, nitratos, producción de indol, ácido indol acético, catalasa, actividad reductora de acetileno, producción de poli β hidroxibutirato, crecimiento en peptona, entre otras (Thompson y Skerman, 1981).

Su clasificación taxonómica es:

Reino: Mónera

División: Cyanobacteria

Grupo 7: Bacilos cortos y Gram negativos

Orden: Eubacteriales

Familia: *Azotobacteraceae*

Género: *Azotobacter*

El género *Azotobacter* comprende a las especies: *Azotobacter armeniacus*, *Azotobacter chroococcum* (especie tipo), *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter beijerinckii*, *Azotobacter paspali*, *Azotobacter macrocytogenes*, *Azotobacter nigricans subsp. achromogenes*, *Azotobacter nigricans subsp. vinelandii* y *Azotobacter salinestris* (Thompson y Skerman, 1981).

2.6.2 Efecto de *Azotobacter chroococcum* sobre el crecimiento de las plantas y su acción como estimulador del crecimiento

Se conoce el importante papel que desempeña *Azotobacter* en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Ahmad *et al.*, 2008). Se destaca el empleo de la bacteria en los más diversos agroecosistemas, los valores varían de acuerdo con la cepa y su afinidad por el cultivo, lo que indica la especificidad del microorganismo por los exudados de la planta (Dibut, 2005). Rubenchick (1960), evaluó en experimentos realizados en Rusia, la respuesta en el rendimiento con el empleo de *Azotobacter*, de ellos en el 81% se observó un aumento del rendimiento de los cereales, hortalizas y cultivos de importancia industrial. Esto resultados trajeron como

consecuencia la preparación de un inoculante comercial llamado Azotobacterín, que se aplicó durante muchos años en esta región (Mishustin y Silnikova, 1971).

En Cuba se desarrolla, desde 1990, un programa de elaboración y aplicación de *Azotobacter* a base de cepas seleccionadas que son capaces de suministrar hasta 50% de los requerimientos de nitrógeno de las plantas mediante la fijación biológica. Esto permite ahorros considerables de fertilizantes, al mismo tiempo que reduce la contaminación ambiental y los daños a la salud humana, ya que disminuyen las elevadas proporciones de nitratos aplicadas en los cultivos agrícolas (Bohlool *et al.*, 1992). Sin embargo, su utilización a gran escala no se ha diversificado, así como su empleo en la producción de plantas procedentes del cultivo *in vitro* ha sido enmarcada en algunas especies solamente. Muchas de las cepas seleccionadas se han probado con gran éxito, tanto en la investigación como en fase de semillero y producción de posturas, así como sobre el crecimiento de las raíces, área foliar y altura de las plantas en general, en cultivos como café, tomate, frutales y cebolla (Corrales *et al.*, 1994; Pulido *et al.*, 2003; Cupull *et al.*, 2006). A la vez, se ha informado la reducción entre un 25 y un 50% del fertilizante nitrogenado, así como un efecto estimulador del rendimiento, la floración y fructificación de algunas hortalizas, en especial tomate y otros cultivos, cuando se inoculó el suelo o la raíz con estas bacterias (Dibut, 2005).

Barea *et al.* (1977), afirmaron que el aporte en nitrógeno de *Azotobacter* ejercido de forma directa y aislada, en el sentido estricto, es bastante bajo y por tanto el uso de dicha bacteria como abono no lo justifica. No obstante, el beneficio que reporta su uso puede estar originado por mecanismos de otros tipos, lo que es confirmado por Ahmad *et al.*, (2005), Sheng y He, (2006) y Shaharooma *et al.*, (2008) quienes plantean que además del efecto nitro fijador de la bacteria, en su proceso de producción se liberan una gran cantidad de sustancias bioestimuladoras tales como auxinas (ácido indolacético), giberelinas, citoquininas, fosfolípidos, ácidos grasos y otras, así como sustancias fungistáticas. Estas sustancias promueven el crecimiento vegetal y muchas veces son las responsables, más que el nitrógeno, de su efecto sobre la germinación, floración, elevación de los rendimientos y la protección de enfermedades en las plantas (Spaepen *et al.*, 2009).

Dibut *et al.* (1995) estudiaron el efecto quimiotáxico de distintas cepas cubanas de *Azotobacter chroococcum* frente a los exudados radicales de cebolla, a partir de lo cual seleccionaron dos cepas, como las más promisorias. Posteriormente se evaluaron varias cepas con fines comerciales, las cuales de acuerdo con los diferentes estudios realizados, resultaron en productos eficientes para una amplia gama de cultivos (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Uso en Cuba de inoculantes a partir de *Azotobacter chroococcum* (Dibut, 2005).

Nombre del producto	Cepas	Cultivos
Biostín	INIFAT 12	tomate, pimiento, cucurbitáceas, hortalizas
Oniobiostín	INIFAT 9	cebolla, ajo, col
Azotoriza	INIFAT 17	plátano, arroz
Acestin	INIFAT 6	malanga

Tabla 2. Producción de sustancias con actividad reguladora del crecimiento (ARC) y producción de vitaminas (Vit) por *A. chroococcum*, cepa INIFAT 12 (Dibut *et al.*, 1995).

Tipo de sustancia	Concentración ARC ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Concentración Vit (mg.100mL^{-1})
Auxina (Eq. a AIA)	14,47	-
Giberelina (Eq. a AG_3)	30,20	-
Citoquinina (Eq. a Kinetina)	32,50	-
Tiamina	-	5,7
Riboflavina	-	44,0
Piridoxina	-	18,0
Ácido Fólico	-	3,5

Es amplia la información existente sobre el efecto agrobiológico provocado por *Azotobacter spp.* sobre una gran variedad de cultivos, sin embargo no se han encontrado referencias sobre la actividad beneficiosa de esta bacteria en el cultivo de la piña a partir del cultivo de tejidos. Zayed, (2012) evaluó el uso de 6 inoculantes microbianos, entre ellos *Azotobacter chroococcum*, en el cultivo de *Moringa oleifera* y pudo comprobar que la bacteria y su combinación con otras especies, incrementó el contenido de biomasa de las plantas, el contenido de proteínas y de minerales tales como N, P, Zn, Cu entre otros.

Otros resultados refieren que el uso de bacterias promotoras del crecimiento estimulan mecanismos de resistencia en las plantas al activar genes responsables con la respuesta al ataque de patógenos. Esta resistencia puede ser el resultado de varios factores como pueden ser la competencia por los nutrientes, producción de sideróforos, antibiosis o producción de enzimas líticas (Walters, 2010). Otros autores refieren que algunas de estas bacterias son capaces de producir enzimas como quitinasas, proteasas, lipasas, entre otras, que participan en la lisis de la pared de los hongos. Estas mismas enzimas son las que se activan en la planta ante la presencia de condiciones de estrés (Van Loon *et al.*, 2006). Históricamente inoculantes microbianos se han utilizado para lograr control biológico y promoción del crecimiento en plantas. Sin embargo, el impacto de estos inoculantes en la absorción de nutrientes es un tema novedoso que no ha sido ampliamente estudiado (Viator *et al.*, 2002).

Aunque existen varias referencias sobre la aplicación de *Azotobacter chroococcum* en diversos cultivos de interés agrícola, su aplicación en plantas cultivadas *in vitro* no ha sido ampliamente estudiada. En el caso específico del cultivo de la piña en fase de aclimatización existen algunos trabajos precedentes con otros microorganismos, como por ejemplo, con el empleo de hongos micorrízicos arbusculares en plantas de piña en fase de aclimatización, con buenos resultados (Noval *et al.*, 1995). Con el empleo de *Burkholderia* sp. en el cv. Victoria donde se logró incrementar el crecimiento de las plantas así como el contenido de N, P, K con la combinación de ácidos húmicos y esta bacteria (Baldotto *et al.*, 2010a). Weber *et al* (2010) evaluaron el efecto de *Asaia bogorensis* en la var. Champaka en fase de aclimatización sobre indicadores del crecimiento y diferentes sustratos orgánicos donde la inoculación estimuló el crecimiento de las plantas. Sin embargo, hasta donde se tiene conocimiento un estudio más amplio donde no sólo se determine la efectividad de las cepas comerciales de *A. chroococcum* existentes en Cuba, sino también se evaluén los cambios que a nivel morfológico, bioquímico y fisiológico podrían inducir estas bacterias en el cultivo de la piña, no han sido anteriormente informados en la literatura. Como se ha podido demostrar en este acápite, estas bacterias tienen una serie de propiedades que las hacen de gran utilidad como biofertilizantes. Su capacidad bioestimuladora ha sido comprobada y evaluada en varios cultivos de interés agrícola, por lo que conocer y

evaluar su efecto estimulador sobre el crecimiento de plantas de piña en fase de aclimatización es uno de los objetivos de esta investigación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Generalidades

Los experimentos se desarrollaron en el Laboratorio de Interacción Planta-Patógeno y en el área de aclimatización del Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila, UNICA (Cuba), así como en el laboratorio de Bioquímica Ecológica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Irapuato (México) y en el Laboratorio de Fertilidad de suelos del Colegio de Postgraduados, Montecillo (México).

Material vegetal

Para cada experimento se utilizaron plantas de piña cv. Cayena lisa provenientes de la micropropagación, cultivadas en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) según el procedimiento descrito por Daquinta y Benega (1997). En el momento de su trasplante a la fase de aclimatización se encontraban en medio de cultivo de elongación que contenía 10 mL.L^{-1} de sales Murashige y Skoog (1962), 10 mL.L^{-1} de myo-inositol, 2 mL.L^{-1} de tiamina, $0,5 \text{ mL.L}^{-1}$ de ANA y 30 g.L^{-1} de sacarosa (Figura 2)



Figura 2. Planta *in vitro* de piña al momento de ser extraída de la fase de elongación *in vitro*. La barra representa 2 cm.

Luego de lavar bien el sistema radical con agua corriente para eliminar los restos de medio de cultivo adherido a las raíces, se seleccionaron plantas de 8-9 cm de longitud y de 1-2 g de masa fresca (Yanes *et al.*, 2000). Éstas se plantaron en frascos plásticos de 83 cm^3 de capacidad, los que contenían como sustrato una mezcla de Cachaza:Suelo Ferralítico Rojo típico (SFR), en la proporción 1:1 (v:v). La caracterización química del sustrato se realizó en el Laboratorio de

Análisis Químico, del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de Plantas, del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) (Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización química de la mezcla de Cachaza:Suelo Ferralítico Rojo típico (SFR) que se empleó como sustrato en el desarrollo de todos los experimentos.

Mezcla	
Cachaza:Suelo Ferralítico Rojo (1:1)	
Ca (cmol.kg ⁻¹)	14,8
Mg (cmol.kg ⁻¹)	12,5
P (mg.kg ⁻¹)	1232
Materia orgánica (%)	19,5
pH	7,3

Los frascos plásticos con las plantas procedentes del cultivo *in vitro*, se colocaron en casa de cultivo con una intensidad de luz de 458 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, una humedad relativa del 90% y temperatura entre 28-32°C, hasta concluir los experimentos. El riego se realizó a través de un sistema de nebulización automatizada, con un intervalo fijo de 25 segundos cada 30 minutos, siguiendo las instrucciones brindadas por Yanes *et al.* (2000). Se mantuvo el control fitosanitario visual durante todo el tiempo que duró la experimentación. El resto de las atenciones culturales se realizaron según la metodología de Yanes *et al.* (2000).

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron bajo un diseño completamente aleatorizado. Los análisis estadísticos se realizaron con el uso del utilitario SPSS versión 12 (Pérez, 2005). Después de chequear el ajuste de los datos a la distribución normal (Kolmogorov-Smirnov, $p \leq 0,05$) y la homogeneidad de varianzas (Levene, $p \leq 0,05$), se utilizaron pruebas paramétricas (ANOVA de un factor, Tukey y t-Student, $p \leq 0,05$). Las variables porcentuales se analizaron según la ecuación $y' = 2 \arccos((y/100)^{0.5})$. El diseño experimental que se utilizó se describe en cada experimento. Las tablas y figuras en el acápite de Resultados y Discusión incluyen la información de las pruebas estadísticas que se realizaron en cada caso. Para definir en cuales indicadores ocurrió un mayor efecto de la inoculación con *Azotobacter chroococcum*, se realizó

el cálculo del coeficiente de variación general mediante la fórmula $y = (\text{desviación estándar}/\text{media}) \times 100$. En esta fórmula se tuvieron en cuenta los valores promedios de cada tratamiento (inoculado y testigo). Los coeficientes de variación general se clasificaron en tres categorías: de 0 a 45% el efecto de la inoculación con *Azotobacter chroococcum* se consideró como "bajo", de 46 a 95% se consideró como "medio" y de 96 a 145% como "alto".

3.1 Efecto de diferentes cepas de *Azotobacter chroococcum* sobre el crecimiento de plantas de piña cv. Cayena lisa en fase de aclimatización

➤ *Material microbiano empleado como base para la obtención del biofertilizante*

Se utilizaron seis cepas de la especie *Azotobacter chroococcum*: INIFAT 4 (I-4), INIFAT 5 (I-5), INIFAT 9 (I-9), INIFAT 12 (I-12), INIFAT 15 (I-15), e INIFAT 17 (I-17) provenientes de la Colección Nacional de *A. chroococcum* ubicada en la División de Microbiología-Bioquímica del Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT), Ministerio de la Agricultura. Todas se aislaron originalmente de suelo Ferralítico Rojo (Instituto de Suelos, 2000) en diferentes localidades del país.

➤ *Medio de cultivo y obtención del biofertilizante*

La multiplicación de las cepas se realizó en medio de cultivo Dimargon (Patente 22178) según Dibut (2000). A partir de un preinóculo obtenido en el mismo medio y a razón del 8% (v:v) se inocularon 150 mL de medio de cultivo en erlenmeyers de 500 mL. Los frascos se colocaron en un agitador orbital (RETOMED) durante un período de tiempo de 72 horas, a una temperatura de incubación de 32°C y 180 r.p.m. de agitación hasta lograr una concentración final de 10^{10} - 10^{11} UFC.mL⁻¹.

➤ *Condiciones de aplicación de los cultivos microbianos*

Para su aplicación los cultivos obtenidos con cada cepa fueron diluidos 1/10 con agua común, según la Norma Cubana NC 7201:92 establecida para la producción de *Azotobacter* (Dibut et al., 1992). Se emplearon 40 plantas por cada cepa (seis) evaluada y el testigo (sin inocular) para un total de 280. Las plantas fueron inoculadas por aspersión de forma homogénea al sistema foliar y al sustrato y con ayuda de un asperjador manual en el momento de la siembra, durante las primeras horas de la mañana. El inoculante de cada cepa se aplicó a razón de 2

mL.m⁻² según la dosis recomendada (Dibut *et al.* 1992). Posteriormente se realizaron aplicaciones periódicas de cada producto (seis cepas) cada dos meses (8 semanas) según el procedimiento descrito anteriormente y tomando como base la Norma Cubana antes mencionada. El experimento se repitió tres veces.

Al cabo de seis meses se realizaron evaluaciones de diferentes indicadores del crecimiento de las plantas tales como: número de hojas, masa fresca y masa seca de las plantas (g), longitud máxima de la raíz (cm) y altura medida desde la base del tallo hasta el extremo de la hoja más larga (cm). Además, se cuantificó el número de plantas vivas que se expresó como porcentaje de supervivencia. A partir de los resultados de las variables evaluadas se seleccionó la cepa de mejores resultados, la cual se utilizó para el siguiente experimento. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de un factor y Tukey para la comparación de medias. La variable supervivencia fue previamente transformada según la fórmula $y' = 2\arccos((y/100)^{0.5})$.

3.2 Efecto de la frecuencia de aplicación de la cepa seleccionada de *Azotobacter chroococcum* sobre el crecimiento de plantas de piña cv. *Cayena lisa* en fase de aclimatización

Con el objetivo de determinar cual es la frecuencia más efectiva de aplicación de la cepa de *A. chroococcum* seleccionada en el acápite anterior para el cultivo de plantas de piña en fase de aclimatización, se realizó el siguiente experimento. Se evaluaron cinco frecuencias de aplicación del biofertilizante: cada 2, 4, 6, 8 y 10 semanas después de la plantación contra un testigo sin inocular (frecuencia 0). El inoculante se preparó como se indica en el acápite 3.1. Se emplearon como réplica 40 plantas por tratamiento. Se realizaron las determinaciones de las variables de crecimiento, tales como: número de hojas, masa fresca y masa seca de la plantas (g), longitud máxima de la raíz (cm) y altura medida desde la base del tallo hasta el extremo de la hoja más larga (cm). Además, se cuantificó el número de plantas vivas que se expresó como porcentaje de supervivencia.

A partir de los resultados de las variables de crecimiento evaluadas se seleccionó la mejor frecuencia de aplicación entre los tratamientos analizados. Teniendo en consideración los

resultados observados en el crecimiento de las plantas en el experimento, las evaluaciones se realizaron a los 4 meses de iniciado el período de aclimatización.

Se realizó un análisis de varianza ANOVA de un factor y Tukey para la comparación de medias. La variable supervivencia fue previamente transformada según la fórmula $y' = 2 \arccos \left(\sqrt{\frac{y}{100}} \right)$.

3.3 Comportamiento de las poblaciones de *Azotobacter chroococcum* en el sustrato en el período de crecimiento de las plantas de piña en fase de aclimatización

El comportamiento de la cepa seleccionada de *A. chroococcum* en el sustrato y la zona rizosférica de plantas de piña en fase de aclimatización se evaluó durante el primer mes de sembradas. Se evaluaron además las poblaciones autóctonas de la bacteria en el sustrato sin inocular. Se emplearon 20 plantas de piña procedentes del cultivo *in vitro* por cada tratamiento, las cuales fueron sembradas en el sustrato Cachaza:SFR (1:1, v/v). El cultivo de la bacteria se preparó y se aplicó como se indica en el acápite 3.1.

Para cuantificar las poblaciones de la cepa en el sustrato en cada tratamiento, se empleó la metodología descrita por Bashan *et al.* (1996). En este caso, se tomó 1 g de sustrato cada 7 días durante 1 mes (0, 7, 14, 21, 28 días), después de sembradas las plantas. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-4}) en agua destilada estéril y se inoculó por diseminación con espátula de Drigalski 0,01 mL en placas de Petri con medio de cultivo Ashby (Subba-Rao, 1992), selectivo para el aislamiento de *Azotobacter*, con tres réplicas para cada tratamiento. Las placas se incubaron a 32°C durante 72 h. Para la identificación de las colonias de *Azotobacter* se tuvieron en cuenta las características culturales, morfológicas, fisiológica-bioquímicas y de respuesta a la tinción de Gram, según la clasificación del Manual de Determinaciones Bacteriológicas, Bergey's (Becking, 1974). Para cuantificar las poblaciones de *A. chroococcum*, se determinaron la Unidades Formadoras de Colonias por gramo de sustrato ($\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$). Se realizó un análisis de varianza ANOVA de un factor y Tukey para la comparación de medias. Los datos de la variable conteo de poblaciones fueron previamente transformados teniendo en cuenta la fórmula $y = \log(x)$.

3.4 Determinación de los cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que se producen en las plantas de piña con la inoculación de *Azotobacter chroococcum*

Para determinar los cambios morfológicos, bioquímicos, y fisiológicos, que la inoculación de esta bacteria pudiera originar en las plantas de piña, se realizó el siguiente experimento. Se emplearon 60 plantas provenientes de la micropropagación *in vitro* y se plantaron en un sustrato Cachaza:SFR (1:1) en fase de aclimatización. Un total de 30 plantas fueron inoculadas con la mejor cepa de *A. chroococcum* seleccionada en el acápite 3.1, la cual se aplicó según los resultados de la mejor frecuencia determinada para esta cepa (acápite 3.2). La obtención del inóculo y las condiciones de aplicación fueron las mismas descritas en el acápite 3.1. El resto de las plantas (30) fueron consideradas como tratamiento testigo. Al cabo de 4 meses se evaluaron los siguientes indicadores en cada uno de los tratamientos: morfológicos: análisis histológico; bioquímicos: contenido de minerales, concentración de aminoácidos y de proteínas totales, concentración de carbohidratos solubles; y fisiológicos: concentración de clorofila a, b y totales, máxima eficiencia cuántica del fotosistema II, actividad fotosintética y transpiración.

3.4.1. Análisis histológico.

Se seleccionaron hojas D (Figura 3) y raíces (raíz máxima) de 10 plantas de cada tratamiento y se realizó el procesamiento histológico según Johansen (1940). Se realizaron cortes transversales al tercio medio de la hoja D y de la raíz, y se seleccionaron al azar 50 cortes de cada órgano para realizar el procesamiento histológico. Los segmentos de las hojas y las raíces se fijaron en FAA (formaldehído-ácido acético glacial) y etanol 70% por 48 horas, luego fueron transferidos a etanol 70% y deshidratados en una serie etílica (Johansen, 1940). Seguidamente fueron incluidos en parafina y confeccionados bloques a los que se les realizaron cortes transversales de 12 μ de espesor con un micrótomo. Luego se colocaron en agua con gelatina y se adhirieron cada uno a un portaobjeto, el cual se colocó en incubadora a 45°C para secar; posteriormente se eliminó la parafina en una serie de xylol. Finalmente las muestras se sometieron a una doble tinción con Safranina-Fast Green. Las observaciones se realizaron con un microscopio OPTON equipado con cámara digital Canon Power Shot A-630 y las mediciones

se realizaron con un programa morfométrico. Se evaluaron los siguientes indicadores anatómicos:

En hojas: espesor (μm) de la cutícula, epidermis, hipodermis, parénquima acuífero y clorofílico, y de la hoja.

En raíces: espesor (μm) de la exodermis, mesodermis externa e interna, y diámetro de la médula (μm).

Se utilizó la prueba t-Student para la comparación de las medias de cada indicador evaluado.



Figura 3. *Hoja D seleccionada para realizar las evaluaciones. La barra representa 4,5 cm.

3.4.2 Determinación del contenido de minerales.

Con el objetivo de continuar identificando los cambios que puede inducir el biofertilizante en las plantas inoculadas comparadas con el testigo sin inocular, se analizó la concentración de minerales en las hojas D. Se determinaron los minerales nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na), hierro (Fe), cobre (Cu), manganeso (Mn), y zinc (Zn). Para ello se emplearon los procedimientos del Laboratorio de Fertilidad de suelo del Colegio de Postgraduados, México (Reuter *et al.* 1986; Benton *et al.* 1991).

Para estos análisis se tomaron cinco hojas de cada tratamiento (plantas inoculadas y testigo), las cuales se secaron a 70°C en estufa (Riossa). Posteriormente, para el N se realizó una digestión húmeda con ácido sulfúrico (Método Kjeldahl) y posteriormente una destilación por arrastre de vapor y titulación con ácido sulfúrico 0,005N. Para los otros minerales se realizó una solubilización mediante digestión húmeda con una mezcla de ácido nítrico y ácido perclórico 1:2 v/v a 210°C . El P se determinó por colorimetría con el complejo amarillo de vanadato y se leyó

la absorbancia a una densidad óptica de 430 nm. En el caso de K y Na, se empleó espectrofotometría de emisión atómica y para Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, espectrofotometría de absorción atómica. Se utilizó la prueba t-Student para la comparación de las medias de cada indicador evaluado.

3.4.3 Determinación de la concentración de aminoácidos y de proteínas totales.

Para la determinación de los aminoácidos en hojas D, se realizó el protocolo propuesto por Koehler (1952) con el cual se obtuvo un extracto alcohólico al que se le añadió, como estándar interno 50 μL de metil éster del ácido heptadecanoico a una concentración de 30 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se utilizaron cinco réplicas por tratamiento (plantas inoculadas y testigo). Se tomaron 100 μL del extracto de cada muestra y se llevaron a sequedad con nitrógeno gaseoso, posteriormente se realizó una derivatización de cada muestra con 100 μL de N,O-Bis trimetilsilil trifluoroacetamida con 1% de trimetilclorosilano y 20 μL de piridina; y se colocaron a 80°C durante 30 minutos para favorecer la silanización. Una vez concluida esta fase, las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890A GC system) con una columna capilar acoplada a un detector cuadrupolo de espectrometría de masas con ionización por impacto electrónico (Agilent Technologies 5975C Inert XLMSD with Triple-Axis Detector). Para la cuantificación de los aminoácidos se utilizó una curva patrón de Prolina (SIGMA, 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de 0,005-0,025 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Todos los aminoácidos analizados pertenecen al grupo de los levógiros.

Para la determinación de las proteínas totales la extracción se realizó a partir de 100 mg de masa fresca de la muestra por cada tratamiento, macerada en nitrógeno líquido con 1 mL de solución tampón Tris-HCl (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) pH 8, urea (6,0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), EDTA (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), dihidrógeno fosfato de sodio (0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), β -mercapto-etanol (140 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) y Tween-20 (0,05%). La mezcla se centrifugó al vacío durante 20 minutos a 11 000 g a 4°C en centrífuga HERAUS. Para la cuantificación de proteínas totales se tomó el sobrenadante y se utilizó el método de Bradford (1976). El contenido de proteínas se expresó en $\text{mg}\cdot\text{gMF}^{-1}$ referidos a una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA), SIGMA 2-20 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Se analizaron cinco réplicas por tratamiento con tres repeticiones.

Se utilizó la prueba t-Student para la comparación de las medias de cada tratamiento para la determinación de aminoácidos y proteínas totales.

3.4.4 Determinación de la concentración de carbohidratos totales

La extracción de carbohidratos totales se realizó según el método descrito por Koehler (1952). Se tomaron cinco hojas por tratamiento (plantas inoculadas y testigo), se secaron en horno a 70°C, se molieron con el empleo de un molino artesanal y se seleccionaron 0,5 g de cada tratamiento. A las muestras se le añadió 0,5 mL de etanol al 80% y se colocaron en baño de María, durante 5 minutos a 80°C. Posteriormente, se centrifugaron a 11 770 g durante 5 minutos, a 25°C en una centrífuga HERAUS. Luego se colectó el sobrenadante, el procedimiento anterior se repitió dos veces, y se mezclaron cada uno de los sobrenadantes resultantes de la centrifugación. La mezcla resultante se centrifugó a 14 410 g durante 25 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se colectó y se diluyó hasta 25 mL con etanol al 80%, el cual constituyó el extracto final. La determinación de los carbohidratos se realizó por Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC, Agilent technologies 7804A), con un detector de índice de refracción RID1 A (35°C) HPX-87H (BIORAD, Hercules, CA 300 x 7,8 mm (60°C). Se inyectaron 10 µL del extracto final en una columna Sorbax de 4,6x150 mm y se utilizó como fase móvil ácido sulfúrico (25 mM) a un flujo de 0,6 mL.min⁻¹. Se utilizaron para determinar la concentración del extracto, los siguientes patrones (SIGMA): glucosa (2 µg.mL⁻¹), sacarosa (20 µg.mL⁻¹) y fructosa (2 µg.mL⁻¹). Los picos cromatográficos de las muestras se identificaron por comparación con los tiempos de retención de los patrones. Se utilizó la prueba t-Student para la comparación de las medias de cada indicador evaluado. La concentración de carbohidratos se expresó en mg.gMS⁻¹.

3.4.5 Determinación del contenido de clorofilas a, b y totales

La extracción de clorofilas se realizó a partir de 0,01 g de masa fresca de las muestras de hojas (cinco plantas por tratamiento como réplica) y se procedió según la técnica de Arnon (1949) con pequeñas modificaciones. A las muestras contenidas en tubos de ensayo se les añadió 10 mL de etanol 96%, y se colocaron en baño de María durante 5 minutos hasta evaporar el

etanol. Posteriormente, se leyó la absorbancia de las muestras en espectrofotómetro UV visible (CARY50) a una longitud de onda de 645 nm (clorofila *a*), y 663 nm (clorofila *b*). El cálculo de la concentración se realizó con el empleo de las fórmulas:

$$[\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = (12,7 \cdot A_{663\text{nm}}) - (2,69 \cdot A_{645\text{nm}})]$$

$$[\text{Clorofila } b \text{ } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = (22,9 \cdot A_{645\text{nm}}) - (4,7 \cdot A_{663\text{nm}})]$$

$$[\text{Clorofila total } (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}) = (20,2 \cdot A_{645\text{nm}}) + (8,05 \cdot A_{663\text{nm}})]$$

Los resultados se expresaron en $\text{mg}\cdot\text{gMF}^{-1}$.

Se utilizó la prueba t-Student para la comparación de las medias de cada indicador evaluado.

3.4.6. Determinación de la máxima eficiencia cuántica del fotosistema II (F_m/F_v), fotosíntesis neta y transpiración

Para la determinación de la máxima eficiencia cuántica del fotosistema II (F_m/F_v) se realizaron mediciones a la hoja D de cinco plantas por cada tratamiento. Las mediciones se realizaron al mediodía entre 10:00 y 11:00 am, con una frecuencia de 15 minutos entre cada una, con un Equipo Pocket PEA, Handsatech. Para la medición de la capacidad fotosintética se utilizaron hojas totalmente extendidas de las plantas de piña en fase de aclimatización, de los dos tratamientos analizados colectadas entre las 10:00 y 11:00 am. La capacidad fotosintética y la transpiración se midieron con un equipo CIRAS-2 (Sistema Portátil de Fotosíntesis, Europa, PP Systems, UK) acoplado a una cubeta universal (PLC6). El área de la cubeta se cubrió completamente con la hoja D completamente expandida ($1,7 \text{ cm}^2$). La concentración de CO_2 y la humedad relativa fueron valores ambientales, correspondiendo a $375 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ y 65-75% respectivamente, bajo luz controlada de $600 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las mediciones se hicieron a cinco plantas con diez repeticiones para un total de 50 valores. Las variables fisiológicas determinadas fueron la fotosíntesis neta ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y la transpiración total ($\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

En cada caso se utilizó la prueba t-Student para la comparación de las medias de cada indicador evaluado.

3.5 Análisis de factibilidad económica de la aplicación de *Azotobacter chroococcum* en la fase de aclimatización de plantas de piña

Para determinar la factibilidad económica que representa el empleo o introducción en la fase de aclimatización de *A. chroococcum*, se tuvieron en cuenta los resultados descritos en el acápite 3.2. Para ello se consideraron las fichas de costo para plantas de piña adaptadas en vasos, confeccionada en el Centro de Bioplantás, Universidad de Ciego de Avila y la ficha de costo para la producción de biofertilizantes y bioestimulantes del Instituto de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical, (INIFAT). En el mismo se analizaron los gastos y todos los materiales que son necesarios para la producción de las plantas, así como los insumos, aplicación de biofertilizantes, uso de la energía entre otros elementos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto de diferentes cepas de *Azotobacter chroococcum* sobre el crecimiento de plantas de piña cv. *Cayena lisa* en fase de aclimatización

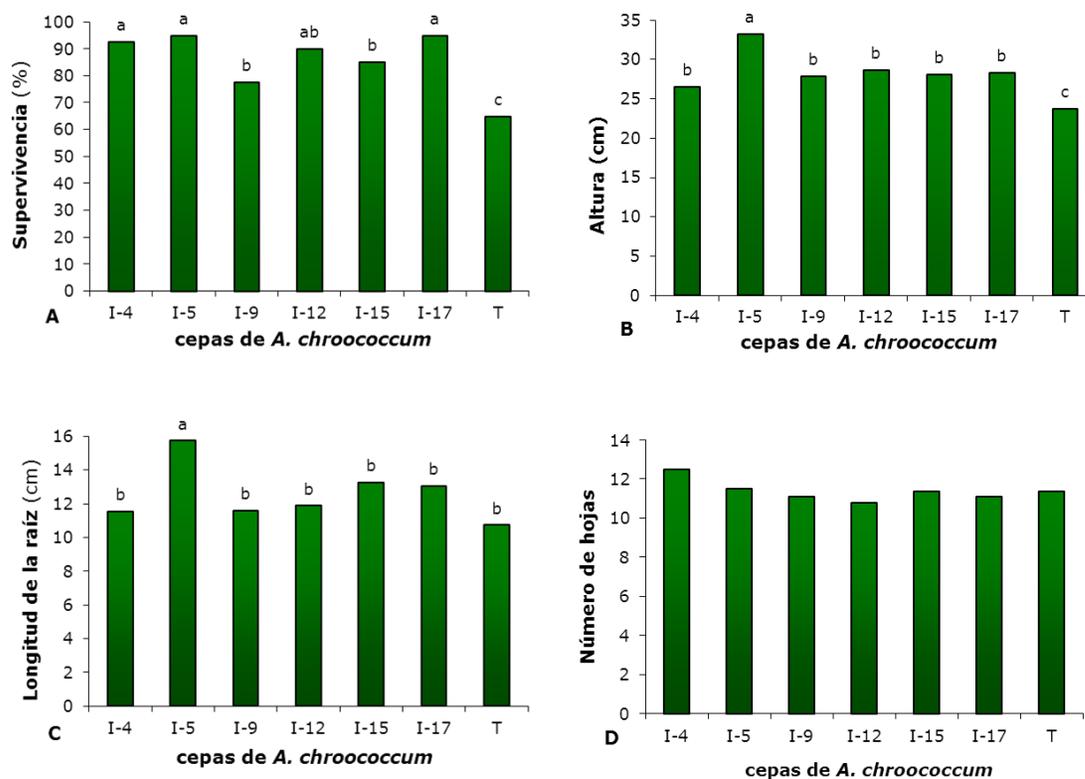
La correcta selección de cepas de microorganismos promotores del crecimiento en estudios agrobiológicos para mejorar la productividad de los cultivos, resulta indispensable en los esquemas de investigación fundamental y aplicada que se diseñan con estos fines (Dibut, 2000; Pérez y Casas, 2005). Muchos errores se han cometido en el diseño de inoculantes comerciales al emplear cepas de microorganismos procedentes de colecciones referenciadas o aisladas de agroecosistemas de forma arbitraria sin realizar ensayos de selección que permitan definir cuál es la más efectiva en su actividad del total de microorganismos estudiados (Dibut, 2005).

En el cultivo de la piña existe poca información sobre esquemas de selección de cepas de rizobacterias en función de la estimulación del crecimiento de esta especie vegetal (González et al., 1997)

Con las seis cepas de *A. chroococcum* analizadas en este trabajo se logró más de 70% de supervivencia de las plantas de piña, con diferencias significativas con respecto al testigo e incrementos entre 12,5 y 30% (Figura 4A). Los mayores valores se obtuvieron en los tratamientos donde se inocularon las cepas INIFAT 4, 5 y 17.

De igual forma, las plantas que fueron inoculadas con las cepas de *A. chroococcum* alcanzaron una altura significativamente superior a las plantas sin inocular (Figura 4B); con la cepa INIFAT 5 (I-5) se obtuvieron los mayores valores con diferencias significativas con el resto de las cepas y el testigo. En este estudio se comprobó además, que sólo con la cepa INIFAT 5 aumentó la longitud máxima de la raíz de las plantas, con diferencias significativas con el resto de las cepas (Figura 4C) y el tratamiento testigo. La cepa INIFAT 5 incrementó en 36% la longitud del sistema radicular con respecto al tratamiento testigo.

En el número de hojas no se observaron diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos que recibieron el efecto de las diferentes cepas de *A. chroococcum* evaluadas (Figura 4D)



	Supervivencia (%)	Altura (cm)	Longitud raíz (cm)	Nº de hojas
Media general	85,7	28,02	12,55	11,4
Error típico de la media	2,6	1,33	0,88	0,80

Figura 4. Efecto de las diferentes cepas de *Azotobacter chroococcum* sobre la supervivencia (A), altura (B), longitud máxima de la raíz (C), y número de hojas (D) de plantas de piña cv. Cayena lisa en fase de aclimatización. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tuckey, $p \leq 0.05$, $n=40$).

Leyenda: I-4 (INIFAT 4), I-5 (INIFAT 5), I-9 (INIFAT 9), I-12 (INIFAT 12), I-15 (INIFAT 15), I-17 (INIFAT 17)

La supervivencia de las plantas es un indicador que constituye un pilar fundamental en la eficiencia del sistema de producción de plantas por métodos biotecnológicos en cultivos de interés económico (Barriuso *et al.*, 2008; Bartholomew, 2009).

Otros autores han referido la efectividad de cepas de *Azotobacter* sobre el crecimiento de diferentes especies vegetales. Por ejemplo, Puertas y González (1999), al estudiar la efectividad de cepas de *A. chroococcum* aisladas de la rizosfera de plantas de tomate en suelos Pardos y Vertisoles, refirieron que todas estimularon el crecimiento de este cultivo. De igual forma, al aplicar la cepa INIFAT 17 de *A. chroococcum* a semilleros de cebolla (*Allium cepa*, L.) se logró

un incremento en la altura de las posturas, lo que permitió obtener plantas aptas para el trasplante en un período de 7 días antes, en comparación con los semilleros que no recibieron el efecto del biofertilizante (Dibut, 2000). El incremento de la altura de las plantas de piña resulta de gran interés ya que este indicador es uno de los que define la calidad para su plantación en campo, según la metodología propuesta por Yanes *et al.* (2000) para la aclimatización de plantas de piña cultivadas *in vitro*.

Con el empleo de otras bacterias estimuladoras del crecimiento también se han logrado resultados satisfactorios para este indicador, como por ejemplo, en papaya (*Carica papaya* L.) se obtuvieron plantas con mayor altura al aplicar *Gluconacetobacter diazotrophicus*, lo que definió la calidad de las posturas para su adaptación a la fase de campo (Ríos y Dibut, 2007). Canbolat *et al.* (2006), al estudiar la efectividad de cepas de *Bacillus* sp. aplicadas en semilleros de plantas de cebada (*Hordeum sativum* L.), apreciaron que todas las cepas estimularon el crecimiento del cultivo.

El incremento de la longitud de la raíz en las plantas inoculadas con la cepa INIFAT 5 pudiera deberse a la excreción de sustancias estimuladoras del crecimiento, como las auxinas, que juegan un papel decisivo en la rizogénesis (Spaepen *et al.*, 2007). Algunas fitohormonas, producidas por los microorganismos rizosféricos, pueden provocar un aumento de la superficie de la raíz, lo que permite a la planta una mayor absorción de nutrientes y agua (De Salmone *et al.*, 2001; Artursson *et al.*, 2006; Narula *et al.*, 2006). En este caso, las rizobacterias *A. chroococcum*, *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas* sp. constituyen los microorganismos más empleados en estas investigaciones (Kamilova *et al.*, 2006; Jha *et al.*, 2009; Rives *et al.*, 2009). En un estudio realizado de la actividad estimuladora de la cepa INIFAT 12 (I-12) de *A. chroococcum*, se determinó su capacidad de sintetizar $14,47 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de ácido indolacético (AIA) (Dibut, 2000). Otros autores tales como Rekha *et al.* (2007) refirieron la producción por *Pseudomonas putida* de $42,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA y Shahab *et al.* (2009) de $57\text{--}288 \mu\text{g mL}^{-1}$ por varias cepas solubilizadoras de fosfatos de *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas aeruginosa*. *A. chroococcum* es una especie bacteriana cuyo hábitat fundamental es la rizosfera, a través de la cual se establece una relación con la planta producto de los metabolitos y sustancias fisiológicamente activas que excreta al medio (Aquilanti *et al.*, 2004). En investigaciones

realizadas por Behl *et al.* (2003) y Singh *et al.* (2004), se demostró que la colonización de las raíces de plantas inoculadas con estas bacterias promotoras del crecimiento vegetal logra mejorar la productividad de las cosechas.

Al ser la adaptación y supervivencia de las plantas obtenidas *in vitro* una de las problemáticas de esta investigación, este resultado cobra gran interés ya que el indicador fundamental en el anclaje (establecimiento) de una planta al suelo o sustrato lo constituye el sistema radicular (Benizri y Amiaud, 2005). Por ello al lograr un mejor enraizamiento se obtienen plantas de piña más vigorosas en la fase de aclimatización. Esto tiene gran importancia si se tiene en cuenta que las plantas de piña una vez que son trasplantadas de la fase *in vitro* emiten un nuevo sistema radical que le permita tener una conexión vascular con la planta para la asimilación de nutrientes y agua. Por lo que la estimulación del sistema radical por parte de la bacteria contribuye a una mejor adaptación de las plantas en esta fase.

En otros cultivos tales como cebolla y pimiento (*Capsicum frutescens* L.), ambos caracterizados por un pobre sistema radical, se obtuvieron beneficios en la estimulación de este indicador al aplicar cepas seleccionadas de *A. chroococcum*, lo que finalmente se tradujo en el manejo exitoso de las posturas en semilleros y casas de cultivo (Pulido *et al.*, 2003). También Ribaudó *et al.* (2006) evaluaron el crecimiento en semilleros de arroz (*Oryza sativa* L. var. Yeruá) con la inoculación de *Azospirillum brasilense*, donde obtuvieron incrementos en la longitud y el número de los pelos radicales.

En el resultado obtenido con respecto al número de hojas varios autores han referido la no estimulación de este indicador producto de la inoculación. Por ejemplo al evaluar el efecto de rizobacterias y productos estimuladores del crecimiento vegetal de origen químico en diferentes especies vegetales, también se ha observado que no se estimula la formación de nuevas hojas. En ocasiones se forman una o dos hojas más en las plantas testigo pero con mucha menor área foliar que en las plantas inoculadas, lo que a efecto de los procesos fotosintéticos y metabólicos en general, no representa ventajas cuantificables para el crecimiento de la planta (Maynard y Hochmuth, 2007).

En trabajos realizados en la rizosfera de varios cultivos, se encontraron resultados similares, sin incrementos significativos del número de hojas al aplicar un microorganismo rizosférico, pero

las hojas que se forman tienen un mayor tamaño (área foliar) con el consecuente beneficio en el metabolismo vegetal, en comparación con las provenientes de plantas no inoculadas o cultivadas en sustratos estériles (Maynard y Hochmuth, 2007).

Tanto la masa fresca como la masa seca de las plantas se incrementaron significativamente en los tratamientos inoculados con las cepas bacterianas (Figura 5A, B). La inoculación de la cepa INIFAT 9 mostró los mejores resultados con diferencias significativas con el resto de las cepas y el tratamiento que no recibió efecto de la inoculación (testigo). Las cepas (I-4, I-5, I-12, I-15) no mostraron diferencias significativas entre ellas. La cepa INIFAT 17 difirió significativamente del resto de las cepas y el testigo, el cual mostró diferencias significativas con todas las cepas evaluadas.

Todas las cepas estudiadas superaron entre el 12 y 29% los valores de masa fresca y entre 11% y 28% la masa seca, en comparación con las plantas que no recibieron el efecto de ninguna de las cepas estudiadas. Estos resultados muestran el comportamiento diferenciado que pueden ejercer cada una de las cepas, provocado por las condiciones en que actúan y su relación con la especie vegetal donde se evalúen.

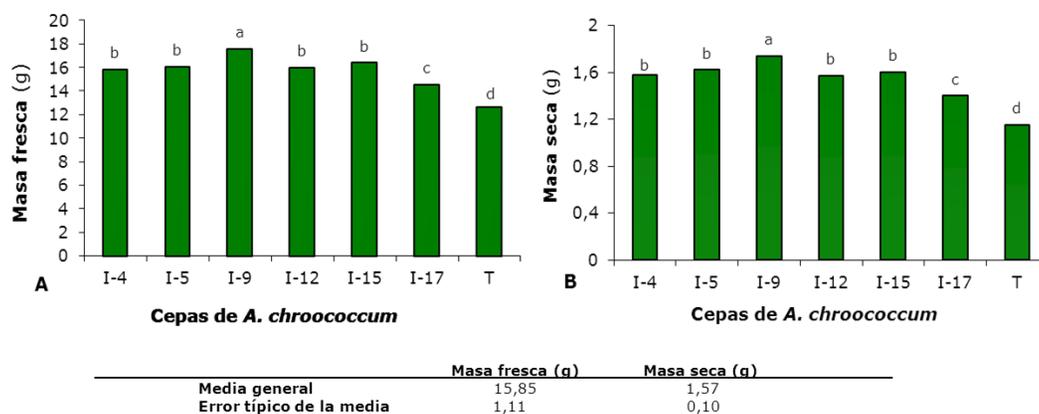


Figura 5. Efecto de diferentes cepas de *A. chroococcum* en el crecimiento de plantas de piña comparadas con el testigo (T) sin inocular. A) masa fresca, B) masa seca. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tuckey, $p \leq 0,05$, $n=40$).

Leyenda: I-4 (INIFAT 4), I-5 (INIFAT 5), I-9 (INIFAT 9), I-12 (INIFAT 12), I-15 (INIFAT 15), I-17 (INIFAT 17)

Govedarica *et al.* (1993) evaluaron nueve cepas de *A. chroococcum* aisladas de un suelo chernozem en plantas de tomate, las cuales incrementaron la altura, la masa y el contenido de nitrógeno en las plantas inoculadas. Cupull *et al.* (2006) informaron resultados similares en viveros de posturas de café (*Coffea arabica* L.) donde utilizaron siete cepas de *Azotobacter* sp. y obtuvieron incrementos significativos en los indicadores morfológicos evaluados, entre ellos la masa seca. Aseri *et al.* (2008) informaron resultados positivos en la producción de biomasa al realizar estudios de selección de cepas de esta especie bacteriana en el cultivo de granada (*Prunica granatum* L.), donde se destacó la importancia de estimular este indicador (masa) por la influencia que tiene el microorganismo sobre el crecimiento de la planta en general. De igual forma, Egamberdiyeva, (2008) refirió resultados similares al evaluar el indicador biomasa en experimentos agrobiológicos donde empleó ésta y otras rizobacterias como *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia* sp. y *Herbaspirillum* sp.

En México, Colombia, Venezuela y España se han empleado también bacterias promotoras del crecimiento vegetal en función de mejorar la producción de plantas en diferentes cultivos hortícolas y frutales (semilleros sobre suelo y cepellones), donde se alcanzaron altos valores de masa fresca en las posturas obtenidas (Dibut, 2005). Otros autores refieren en cultivos de alfalfa (*Medicago sativa* L. var. valenciana) incrementos en la masa seca con respecto al testigo en plantas inoculadas con rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares (Chamizo *et al.*, 2009).

En un análisis integrado de todos los indicadores evaluados en este acápite, se seleccionó la cepa INIFAT 5 (I-5) como la más efectiva para ser aplicada en la aclimatización de plantas de piña obtenidas por métodos biotecnológicos. Con el empleo de esta cepa se logró el 97% de supervivencia de las plantas, incrementó la altura y longitud de la raíz por encima del resto de las cepas y el testigo, indicadores estos que constituyen requisitos de calidad para el sistema. Por otra parte, aunque no fue la de mayores valores en los indicadores de masa, logró incrementos del 18 y 20% de la masa fresca y seca de las plantas, respectivamente, con solo diferencias de 1,5 g de masa fresca y 0,12 g de masa seca con respecto al mejor tratamiento para este indicador (cepa I9) lo que se pueden considerar como buenos resultados. Además, es importante destacar que esta cepa fue aislada de suelos de la provincia de Ciego de Ávila, por

lo que su comportamiento en cuanto a la efectividad que muestra en comparación con el resto de las cepas podría estar relacionado con su adaptabilidad a las condiciones edafoclimáticas de la zona que le permiten un comportamiento más armónico en todos los indicadores analizados. Sarić *et al.* (1990) refieren que los resultados obtenidos sobre un determinado genotipo vegetal y una cepa microbiana en específico puede estar condicionada por diversos factores como: la composición cuantitativa y cualitativa de los exudados radicales del genotipo, la especificidad del metabolismo de la cepa microbiana, la capacidad de la cepa microbiana de sintetizar inhibidores, la influencia del sistema genotipo planta-cepa microbiana, condición de la cepa de colonizar la superficie de la raíz y penetrar dentro de los tejidos de la planta, la influencia del sistema genotipo-cepa en los cambios de los factores ambientales de la rizosfera y la especificidad del genotipo respecto a la asimilación y transporte de nitrógeno.

Otros autores recomiendan que resulta más conveniente el empleo de medios biológicos (biofertilizantes y bioestimuladores) que interactúan en equilibrio con la planta y estimulan de forma armónica los diferentes tejidos y órganos del vegetal (Ahmad *et al.*, 2008; Barriuso *et al.*, 2008). Estos bioproductos a su vez garantizan una asociación altamente efectiva y persistente en el tiempo con la planta (Hynes *et al.*, 2008; Berg y Smalla, 2009).

La cepa INIFAT 5 se ha incluido en otros ensayos de selección, en este caso en el cultivo del tomate, donde mostró un buen comportamiento en relación con el efecto estimulador integrado sobre las plantas, con valores promedio entre 15-35% de aumento en la biomasa, área foliar, volumen radical y diámetro del tallo, entre otros indicadores de crecimiento (Dibut, 2005).

4.2 Efecto de la frecuencia de aplicación de la cepa seleccionada de *Azotobacter chroococcum* sobre el crecimiento de plantas de piña cv. Cayena lisa en fase de aclimatización

En el presente trabajo la supervivencia de las plantas inoculadas con las diferentes frecuencias de aplicación analizadas, mostraron diferencias significativas con respecto al testigo. Todas las frecuencias empleadas mostraron valores por encima del 95% (Figura 6A) con respecto al testigo sin inocular (frecuencia 0). El mayor valor de plantas vivas con la calidad requerida para

el trasplante se obtuvo al aplicar la bacteria cada 4 semanas, equivalente a más del 97% de plantas aptas para ser comercializadas, aunque no mostró diferencias estadísticas con respecto a las frecuencias cada 2, 6 y 8 semanas .

En cuanto a la altura y longitud radical de las plantas, la frecuencia cada cuatro semanas mostró diferencias significativas con respecto al testigo y al resto de las frecuencias evaluadas (Figura 6B, C). En todos los tratamientos se observaron incrementos absolutos entre 15-46% en la altura de las plantas de piña bacterizadas comparadas con el testigo sin inocular. La frecuencia cada cuatro semanas mostró valores superiores a 2 cm promedio de longitud de las raíces en relación a la frecuencia de aplicación cada dos semanas.

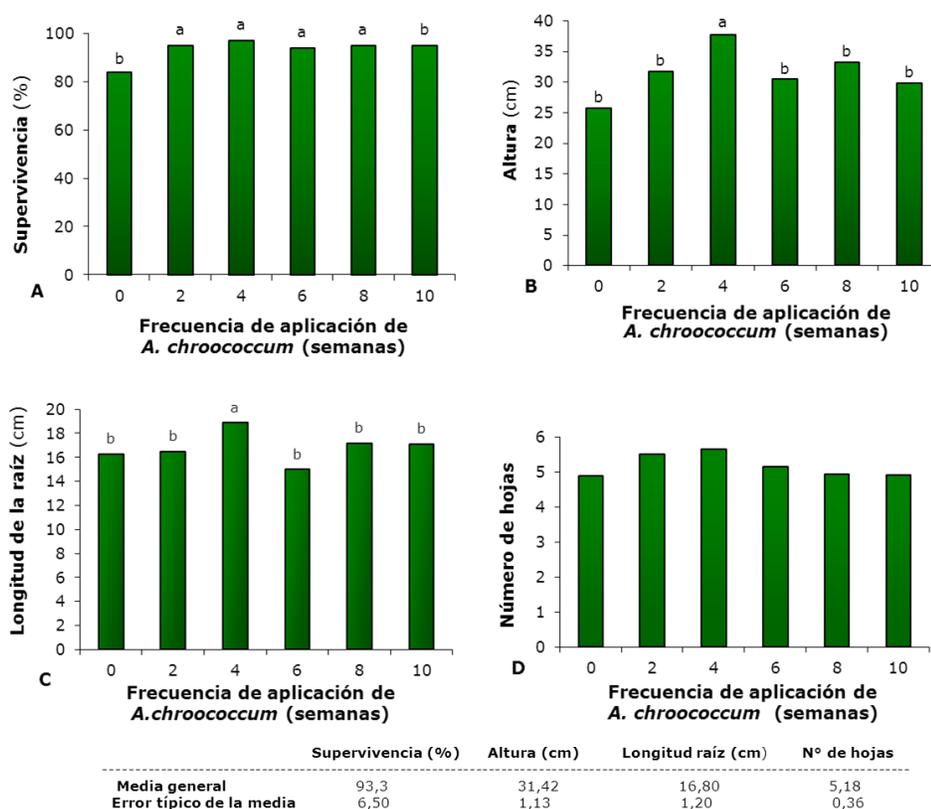


Figura 6. Efecto de la frecuencia de aplicación de *Azotobacter chroococcum* (cepa INIFAT 5) sobre la supervivencia (A), altura (B), longitud máxima de la raíz (C), número de hojas (D) de plantas de piña cv. Cayena lisa en fase de aclimatización. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tuckey, $p \leq 0.05$, $n=40$).

Estas bacterias diazotróficas además de su efecto estimulador sobre el crecimiento de las plantas, son capaces de sintetizar sustancias fungistáticas como antibióticos y sideróforos, que

inhiben el crecimiento de los hongos fitopatógenos del suelo, por lo que promueven indirectamente el crecimiento y supervivencia de las plantas, especialmente en las etapas tempranas del cultivo.

Estos compuestos han mostrado su efecto sobre hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* y *Rhizoctonia*, entre otros, variando su acción antagónica con la cepa bacteriana utilizada (Rodelas, 2001; Ahmad *et al.*, 2008).

Otros autores refieren que las bacterias promotoras del crecimiento pueden inducir resistencia sistémica (ISR) al ataque de patógenos ya que desencadenan reacciones e incrementan la actividad de algunos genes, como por ejemplo, el que regula la síntesis de ácido jasmónico (AJ) en las plantas, lo que contribuye a proteger o "inmunizar" a las plantas ante la presencia de fitopatógenos y puede influir en la supervivencia de las plantas (Glick *et al.*, 2007; Walters, 2010). En otros estudios, al aplicar biofertilizantes a base de bacterias rizosféricas como *Azotobacter* y hongos micorrizógenos arbusculares, se ha logrado incrementar el número de plantas que emergen y/o que sobreviven a las condiciones adversas que generalmente imperan en las áreas agrícolas (Rodríguez *et al.*, 2006). Como se puede apreciar en la Figura 6A, solo al aplicar el biofertilizante se lograron valores superiores al doble de lo descrito para este indicador (supervivencia); o sea, es posible obtener un notable aumento productivo en el sistema con la aplicación o introducción de un solo elemento en la tecnología.

Al analizar los resultados obtenidos en la altura de las plantas, se comprueba que la producción de sustancias activas por parte de estos microorganismos estimulan entre 10 y 28% la altura de las plantas, lo que a su vez representa un indicador de calidad de las posturas obtenidas, y que se traduce en la reducción del tiempo de permanencia de las plantas obtenidas en la fase de aclimatización o vivero.

En estudios dosis-efecto realizados al aplicar esta bacteria sobre plantaciones de cebolla, se observó que más de una aplicación no produjo el efecto deseado sobre el desarrollo de los bulbos, y tampoco dosis excesivas del biopreparado (Dibut, 2000). Esto indica que para cada cultivo existe una especificidad para la inoculación de un microorganismo donde se relacionan varios factores para que esta asociación sea efectiva donde influyen tanto el genotipo de la planta como de la bacteria, los exudados y sustancias que producen, así como las

interrelaciones que establecen con el ambiente (Sarić *et al.*, 1990). En relación con este aspecto, se ha definido que dentro del potencial de sustancias fisiológicamente activas que la bacteria logra sintetizar, las citoquininas son las fitohormonas que más influyen en el alargamiento celular y de hecho en la longitud que logran alcanzar las plantas (Spaepen *et al.*, 2009). Otras rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal como *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Pseudomonas sp.* y *Bacillus polymixa* entre otras, igualmente producen efectos similares a los aquí encontrados, incluyendo la estimulación de la altura de plantas y posturas de diferentes especies económicas (Novo y Fernández, 1988; Hernández *et al.*, 1994). La estimulación del volumen radical y de la longitud de las raíces al aplicar bacterias rizosféricas y hongos micorrizógenos arbusculares ha sido comprobada por numerosos investigadores en diferentes cultivos y latitudes (Layne, 2008; Adesemoye y Kloepper, 2009; Zayed, 2012). Se ha demostrado que la colonización es uno de los primeros pasos involucrados en el establecimiento de los microorganismos beneficiosos y/o perjudiciales en la rizosfera (Singh *et al.*, 2004; Choure y Dubey, 2012). Al respecto Zuberer (1990) y Bais *et al.* (2006), plantearon que la capacidad de los microorganismos para suministrar nutrientes y estimular el crecimiento de las plantas dependen de su exitoso establecimiento sobre las raíces. Esto podría ser una de las posibles causas que justifiquen los resultados obtenidos con la frecuencia de aplicación cada cuatro semanas; es decir, en este periodo las plantas mantienen una velocidad de crecimiento del sistema radicular que permite que las bacterias colonicen la superficie de las raíces en relación proporcional al incremento de su población en la zona que rodea al sistema de raíces (rizosfera). Todo este comportamiento está regido por el equilibrio interactivo entre el metabolismo bacteriano de *A.chroococcum* y la fisiología de las raíces de las plantas de piña. Por otra parte, el sustrato se mantiene colonizado con suficiente población bacteriana que garantiza la migración de las bacterias hacia el sistema de raíces en todo momento; aspecto este, muy importante en el cultivo de la piña donde las plantas en determinada etapa de su crecimiento llegan a perder un gran volumen de su sistema radical, que después regeneran (Gangopadhyay *et al.*, 2009). Es de interés señalar que los microorganismos no están distribuidos de manera uniforme sobre la superficie de la raíz, sino que se localizan en determinados puntos (microambiente) de la misma que poseen una mayor actividad segregante

de materia orgánica (exudados radicales), resultando que solo entre el 4 y 10% de la superficie de la raíz está colonizada por microorganismos (Mettingm, 1993). En plantas jóvenes éstos aparecen colonizando la parte superior del sistema radical, mientras que en plantas maduras la colonización se establece fundamentalmente en la parte terminal del mismo (Chiarini *et al.*, 2000; Brimecombe *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta esta aseveración se debe velar en todo momento por disponer de una mezcla eficiente de sustratos, junto a condiciones óptimas de pH, temperatura y otras condiciones de manejo, para ser capaz de garantizar en esta área limitada de superficie de raíces una adecuada colonización del sistema radical con este u otros microorganismos benéficos a partir de su deposición en puntos radicales con activa producción de exudados.

Varios autores, entre los que se encuentran Azcón y Barea (1975), Kvet *et al.* (1991) y Chen (1997), al trabajar con las más variadas especies de plantas han logrado aumentar las poblaciones de microorganismos rizosféricos y la actividad de producción de exudados al tratar, vía aspersión foliar, plantas con diferentes reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas; entre ellos ácido giberélico (AG_3) y citoquininas (kinetina), con la obtención de buenos resultados sobre el efecto agrobiológico de las aplicaciones combinadas.

Estos mismos resultados científicos han sido utilizados en los últimos 15 años por extensionistas vinculados a la producción agrícola y a la actividad empresarial dirigida a la producción de plantas (posturas) y flores (Dibut, 2005), obteniendo resultados beneficiosos al lograr mejor enraizamiento de las posturas lo que garantiza un mayor porcentaje de plantas adaptadas a condiciones ambientales desfavorables, o un mejor comportamiento en campo cuando imperan las condiciones óptimas del cultivo a tratar con estos procedimientos.

Resultados similares han sido obtenidos con otras bacterias estimuladoras del crecimiento como *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus pumillus*, con las cuales se logró incrementos en el crecimiento de la raíz y de las plantas (Kloepper *et al.*, 2007; Ryu *et al.*, 2007).

En el número de hojas no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 6D). En el caso de la piña hay que tener en cuenta que la emisión de hojas es lenta durante todo el ciclo del cultivo con una filotaxia variable (Coppens d'Eeckenbrugge y Leal, 2003). Este indicador incide marcadamente sobre el crecimiento y la calidad de las plantas, y aunque no

existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos, se obtuvieron con la frecuencia cada 4 semanas 0,76 hojas más por planta, lo que representa una mayor superficie fotosintéticamente activa a favor de las plantas que recibieron el beneficio de la bacteria.

En la Figura 7, se observa el efecto de las diferentes frecuencias de aplicación sobre la longitud de las hojas. El mayor valor de este indicador se obtuvo con la frecuencia de aplicación del biofertilizante cada 4 semanas, la que difirió significativamente del resto de las frecuencias y el testigo, similar a los resultados previamente descritos en la altura y longitud de las raíces de las plantas.

En relación a la influencia sobre el crecimiento de este órgano, son varios los resultados que exponen la acción beneficiosa de diferentes rizobacterias, entre ellas *A. chroococcum*, al ser aplicadas en especies hortícolas, cítricos, frutales entre otros cultivos (Hernández *et al.*, 1994; Cupull *et al.*, 2006).

La longitud de las hojas está estrechamente relacionada con la altura o longitud de las plantas de piña, por lo que también constituye, un índice de calidad que regula esta producción biotecnológica.

Al aplicar el biofertilizante cada cuatro semanas se lograron valores superiores de longitud de las hojas de hasta 2 cm de diferencia en relación al resto de las variantes de frecuencia de aplicación con relación al testigo. Esta respuesta está relacionada con los atributos que se le conceden a *A. chroococcum*, pues al igual que otras bacterias beneficiosas del suelo, se establece tanto en la filosfera o tejido aéreo de las plantas, como en la zona de la rizosfera. Además, son capaces de multiplicarse a expensas de exudados foliares como ácidos orgánicos, sustancias volátiles del tipo de aceites esenciales y otras fuentes de carbono y energía que constituyen nutrientes para el crecimiento y reproducción de estos microorganismos (Bauer, 2001; Bauer y Mathesius, 2004).

Los resultados sobre el crecimiento y estimulación de indicadores morfológicos están en correspondencia también con una mayor asimilación de minerales del suelo por parte de las plantas.

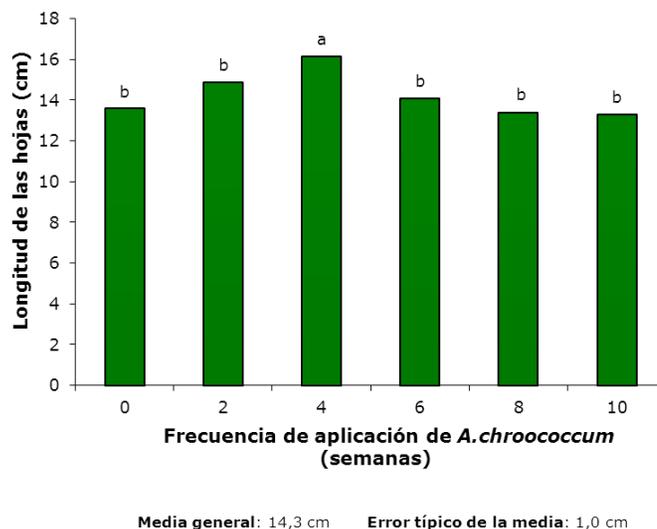


Figura 7. Efecto de la frecuencia de aplicación de *Azotobacter chroococcum* cepa INIFAT 5 sobre la longitud de las hojas de plantas de piña. Medias con letras desiguales tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tuckey, $p \leq 0,05$, $n=40$).

De acuerdo con estudios realizados por Debinstein (1970), las numerosas poblaciones microbianas que se encuentran en las hojas es una evidencia del ambiente favorable y el alto contenido de nutrientes y humedad que existe en ellas, lo que estimula la proliferación de estas bacterias y ofrece un espacio para el intercambio de productos metabólicos entre las plantas y estas bacterias. Bhat *et al.* (1971) refieren la habilidad que tienen las plantas para concentrar muy rápido material resuspendido o disuelto en la atmósfera lo que le confiere una gran importancia para el agroecosistema.

El conocimiento de este efecto resulta de interés en el establecimiento y crecimiento de plantas de piña, ya que al lograrse una mayor superficie fotosintéticamente activa en las hojas, se logra incrementar la asimilación de fotosintatos y de hecho, el balance de energía favorece el desarrollo de la planta de forma general.

El efecto de las diferentes frecuencias de aplicación sobre los indicadores de crecimiento masa fresca y seca de las plantas de piña se muestra en la Figura 8. En el caso de la masa fresca, las frecuencias cada 2, 4 y 6 semanas no difirieron estadísticamente pero sí del tratamiento testigo. La frecuencias 2, 6, 8 y 10 no difirieron entre ellas. Las frecuencias cada 6, 8 y 10 semanas no

difirieron del tratamiento testigo. Con frecuencias cada 4 semanas se logran niveles óptimos en los parámetros evaluados, en el caso de la masa fresca se obtiene un 64% de incremento con respecto al testigo. El resto de las frecuencias de aplicación los valores varían entre 11 y 33%, correspondiente a diferencias entre 1 y 5 g de masa vegetal por plántula.

En el indicador masa seca las frecuencias cada 2 y 4 semanas no mostraron diferencias significativas, mientras que las frecuencias cada 6, 8 y 10 semanas no mostraron diferencias significativas con la frecuencia cada 2 semanas. Todas las frecuencias difirieron significativamente del testigo sin inocular. La frecuencia cada 4 semanas incrementó la masa seca un 64% y el resto de las frecuencias manifestó un incremento entre 9 y 53% de aumento con relación al tratamiento testigo.

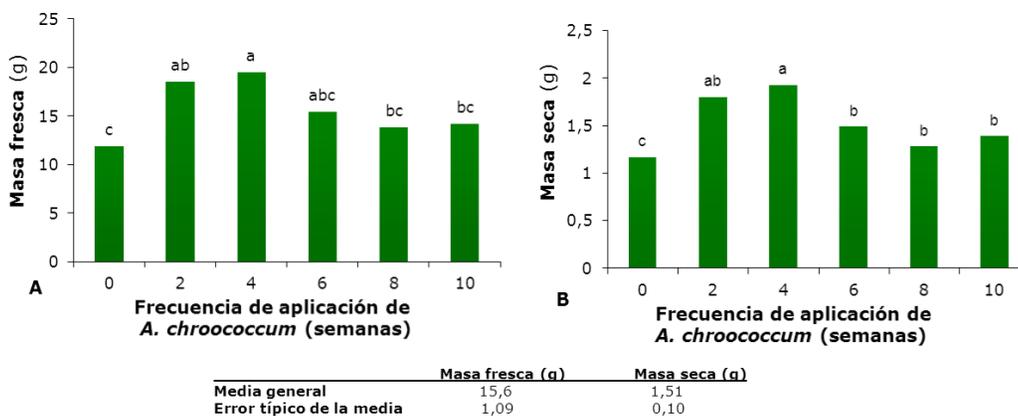


Figura 8. Efecto de la frecuencia de aplicación de *Azotobacter chroococcum* cepa INIFAT 5 en plantas de piña en fase de aclimatización comparadas con el testigo (T) sin inocular. Indicadores masa fresca (A) y seca (B). Medias con letras desiguales, tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tuckey, $p \leq 0,05$, $n=40$).

Estos resultados se asemejan con los obtenidos en otras investigaciones a nivel internacional al aplicar bacterias rizosféricas como *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas fluorescens* y *Azospirillum lipoferum*, entre otros microorganismos, sobre especies hortícolas como tomate (*Solanum lycopersicum* L.), cebolla (*Allium cepa*) y cereales (Ahmad *et al.*, 2008; Zayed, 2012). En Cuba el papel estimulador de *A. chroococcum* en el incremento de las raíces, del área foliar, la altura y crecimiento de las plantas en general, en cultivos como el café, tomate, frutales y cebolla han sido evaluados por

varios autores (Corrales *et al.*, 1994; Martínez *et al.*, 1997; Cupull *et al.*, 2006). Sin embargo, el número de referencias científicas sobre las peculiaridades de la frecuencia de aplicación de este biofertilizante sobre el crecimiento vegetal es limitado, lo que conlleva a la necesidad de realizar estudios que delimiten las mismas, no constituyendo una excepción las plantas de piña, la que estaría supeditada a las condiciones de cultivo, sus requerimientos, así como otros factores bióticos y abióticos.

Al hacer un análisis general del proceso para cada frecuencia de aplicación evaluada, se debe tener en cuenta las características y condiciones de cultivo que influyen directamente en el establecimiento de las poblaciones en el sustrato. En la interfase *in vitro-ex vitro* las plantas de piña deben ser capaces de adaptar su metabolismo heterotrófico a autotrófico, lo que genera un estrés inicial durante la aclimatización producto de estos cambios. Esto provoca la acumulación de una serie de compuestos como ABA, prolina y especies reactivas del O₂ (Carvalho *et al.*, 2006; Batrova *et al.*, 2008) que podrían afectar la población microbiana de la bacteria en estas primeros etapas.

Por otra parte, las raíces de las plantas provenientes de la fase *in vitro* presentan un patrón de enraizamiento indirecto, sin conexión vascular con las raíces, que posteriormente son sustituidas por raíces funcionales con una conexión vascular directa con la planta (patrón de enraizamiento directo). Este proceso dura aproximadamente de 15 a 20 días.

Estos procesos pudieran influir en la colonización de las bacterias en las primeras etapas de la inoculación dada la pérdida de las raíces provenientes de la fase *in vitro* (Gangopadhyay *et al.*, 2009), lo cual sería más acentuado con la frecuencia de aplicación cada dos semanas al afectar el establecimiento eficiente y a largo plazo en las raíces de las plantas. Con una frecuencia cada cuatro semanas se establece un margen de tiempo donde la planta logra adaptarse a las condiciones *ex vitro* se establecen conexiones entre la bacteria y las raíces más efectivas y persistentes en el tiempo. Las frecuencias muy espaciadas en el tiempo podrían no ser suficiente el número de poblaciones que deben establecerse en la rizosfera para que su efectividad sea mayor. Por el contrario, frecuencias muy cercanas producen una superpoblación microbiana que podría influir en un desequilibrio en la rizosfera no favorable para la colonización y efectividad de esta rizobacteria. Castro-Sowinski *et al.* (2007) plantearon que la introducción

en un sustrato de gran cantidad de bacterias exógenas como inoculantes, tiene un efecto potencial sobre la flora residente y a su vez puede ser afectada por estos. Tales interferencias pueden resultar en un incremento, decremento o ningún efecto de la efectividad de las PGPR. Por otro lado Mawdsley y Burns (1994) y Johansen y Binnerup (2002) refirieron que el ambiente en la rizosfera podría verse afectado por las altas densidades de bacterias inoculadas como PGPR y por los incrementos en las actividades enzimáticas que se generan en la rizosfera.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este experimento en cada uno de los indicadores mostrados, seleccionamos la frecuencia cada cuatro semanas como la más efectiva para lograr una adecuada estimulación del crecimiento de las plantas. Con la frecuencia de aplicación cada cuatro semanas, aunque no difirió estadísticamente del resto de los tratamientos, se lograron los más altos valores de supervivencia (97%), la estimulación de la altura, la longitud de la raíz y longitud de las hojas, mostraron los mejores resultados entre los tratamientos analizados. El indicador biomasa incrementó un 64% los valores con respecto al testigo, por encima de los incrementos obtenidos con el resto de las frecuencias analizadas.

Teniendo en cuenta los resultados analizados en este acápite se seleccionó la frecuencia de aplicación de la cepa INIFAT 5 cada cuatro semanas como la más efectiva para el cultivo de plantas de piña en fase de aclimatización (Figura 9).

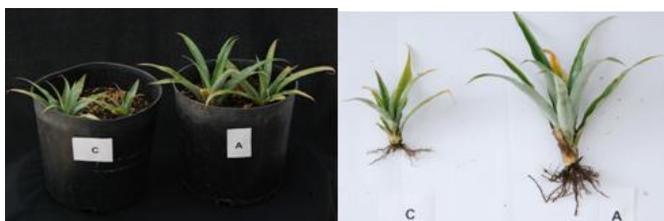


Figura 9. Efecto de la inoculación cada cuatro semanas con la cepa INIFAT 5 de *A. chroococcum* (A) y el testigo (C).

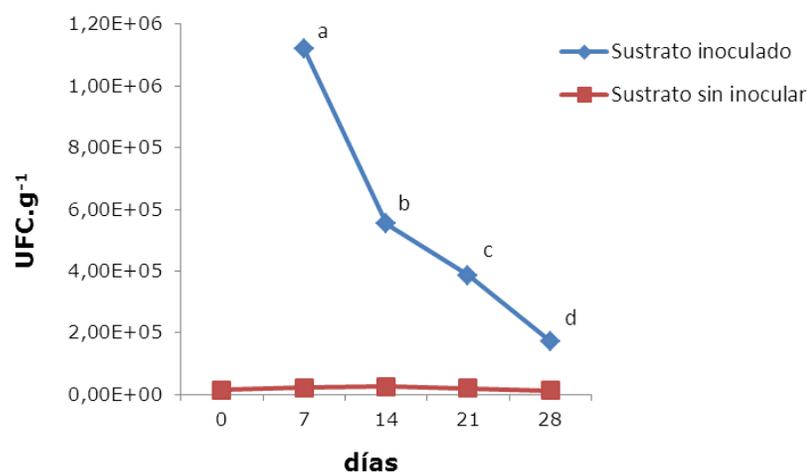
4.3 Comportamiento de las poblaciones de *Azotobacter chroococcum* en el sustrato en el período de crecimiento de las plantas de piña en fase de aclimatización

Uno de los principales aspectos que ha sido referido en acápites anteriores, lo constituye la composición del sustrato y el comportamiento de las poblaciones de *A. chroococcum* en los mismos para lograr los efectos deseados. Las colonias de *A. chroococcum* obtenidas en placas

mostraron un aspecto viscoso, de color transparente y forma convexa. Son bacterias Gram negativas, según la respuesta a la tinción de Gram.

En la Figura 10 se muestran las poblaciones de *A. chroococcum*, con la cepa INIFAT 5 en el sustrato inoculado y sin inocular. La información mostrada en el sustrato inoculado confirma que en los primeros 7 días ocurrió un incremento de las poblaciones de *A. chroococcum*, y que a medida que transcurrió el período de crecimiento de las plantas en el sustrato, estas poblaciones fueron decreciendo significativamente hasta los 28 días.

Entre los factores que pueden haber influido en este comportamiento está que la fracción orgánica del sustrato podría ser insuficiente para satisfacer todos los requerimientos del microorganismo durante tiempos prolongados. Además la competencia que se establece entre la microflora propia del sustrato y la bacteria es otra de las causas de la obtención de estos resultados, ya que una vez inoculadas éstas deben establecerse en el sustrato y competir por los nutrientes y el espacio con relación al resto de las poblaciones que cohabitan en éste (Kuzyakov, 2002).



	sustrato inoculado	sustrato sin inocular
Media general	2,23E+06	8,20E+04
Error típico de la media	1,56E+05	5,74E+03

Figura 10. Poblaciones de *A. chroococcum* en el sustrato inoculado y el testigo sin inoculación. Medias con letras desiguales en una misma línea tienen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de un factor, Tuckey, $p \leq 0,05$, $n=20$).

Martínez-Viera *et al.* (2010) refieren que para lograr efectividad en la inoculación de cepas PGPR éstas deben mantener una alta densidad de población de células activas las cuales temporalmente logran alcanzar estos valores; sin embargo, su supervivencia es baja y compiten con la flora microbiana del suelo por la disponibilidad de nutrientes y agua.

De forma similar, Margallo *et al.* (2001) y Ahmad *et al.* (2008) plantearon que la mayor o menor eficiencia en la asociación entre una bacteria y una planta determinada depende de varios factores, entre los que se destacan la propia especie vegetal, sus condiciones de crecimiento o estado fisiológico y las condiciones ambientales como temperatura, radiación solar, contenido de nutrientes en el suelo o sustrato. Berg (2009), refiere que el predominio de una especie bacteriana sobre otra depende de varios factores entre los que incide la composición nutrimental del sustrato utilizado.

En el caso del sustrato sin inocular, no se observaron diferencias significativas en las poblaciones de la bacteria entre los días evaluados. Esta respuesta indica que las poblaciones autóctonas de la bacteria en el sustrato utilizado son bajas y tienen como característica que son de procedencia no controlada y por tanto no responden a un esquema de selección de cepas comerciales y/o de colecciones que forman parte de bioestimuladores de alta efectividad, a diferencia del tratamiento inoculado aquí propuesto que involucra una cepa de referencia, adaptada y evaluada sobre el sustrato empleado.

Esta bacteria se encuentra en gran parte de los suelos de Cuba, en poblaciones entre 10^3 y 10^4 UFC.g⁻¹ de suelo, valores similares a los obtenidos en las poblaciones nativas de *A. chroococcum* en el sustrato estudiado. Con estas poblaciones, la acción beneficiosa de las bacterias se manifiesta en un nivel muy bajo, por lo que se hace necesario incrementarlas mediante la aplicación de biopreparados obtenidos por métodos biotecnológicos (Dibut, 2005).

En mezclas de suelo con estiércol de varias procedencias, que constituyen sustratos mucho más ricos en nutrientes que el aquí analizado, generalmente se aplica una o más de una vez estos microorganismos en el ciclo de un cultivo de 4 o 5 meses para lograr obtener el efecto estimulador que se persigue (Rodríguez *et al.*, 2001).

Estos resultados indican que cada 28 días de inoculado el cultivo, se debe proceder a una segunda inoculación del sustrato, pues los niveles poblacionales decrecen y no propician una respuesta persistente en el tiempo que permita un comportamiento favorable a las plantas de piña. Por ello, es necesario, cada vez que se inicie el estudio de la aplicación de un microorganismo en un cultivo determinado, evaluar varios factores para establecer las condiciones óptimas, ya que cada sistema planta-bacteria tiene un comportamiento diferente donde inciden varios factores.

4.4 Determinación de los cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que se producen en las plantas de piña con la inoculación de *Azotobacter chroococcum*

Se han estudiado algunos indicadores fisiológico-bioquímicos que se presentan en plantas que reciben el efecto de este tipo de microorganismo. Las investigaciones sobre el comportamiento en plantas de piña de estos indicadores constituyen una herramienta para explicar con mayor certeza el efecto de las inoculaciones sobre el crecimiento y supervivencia de las plantas en esta especie vegetal. Se dispone, además, de resultados desde el punto de vista fisiológico-bioquímico lo que contribuiría a relacionar estos aspectos con determinados índices de crecimiento en las diferentes fases del ciclo de crecimiento de las plantas y conocer a profundidad cuales son los cambios que estos microorganismos originan en las plantas, aspectos poco abordados hasta donde se tiene conocimiento.

4.4.1 Análisis histológico

En la Figura 11 se aprecian los valores (μm) determinados en los indicadores espesor de la hoja (A), grosor de la cutícula superior (B) e inferior (C) en hojas de plantas de piña inoculadas con *A. chroococcum* y el testigo. Existió un incremento con diferencias significativas en los tres indicadores evaluados en las plantas que fueron inoculadas con el biofertilizante con respecto al testigo.

El incremento del grosor de la cutícula en las plantas inoculadas pudiera estar relacionado con un aumento en la formación de cutina, principal componente de la cutícula y otros componentes

como ceras. Otras de las posibles causas podría ser por una respuesta defensiva de la planta ante la presencia de un microorganismo, sea éste patógeno o no (Zarra y Revilla, 2000).

El grosor de la cutícula tiene gran importancia biológica y práctica, pues las plantas con cutícula bien desarrollada están mejor adaptadas a condiciones de estrés hídrico ya que se reduce la transpiración cuticular, lo que implica una mayor retención de agua y una mejor adaptación de las plantas (Barceló *et al.*, 1992).

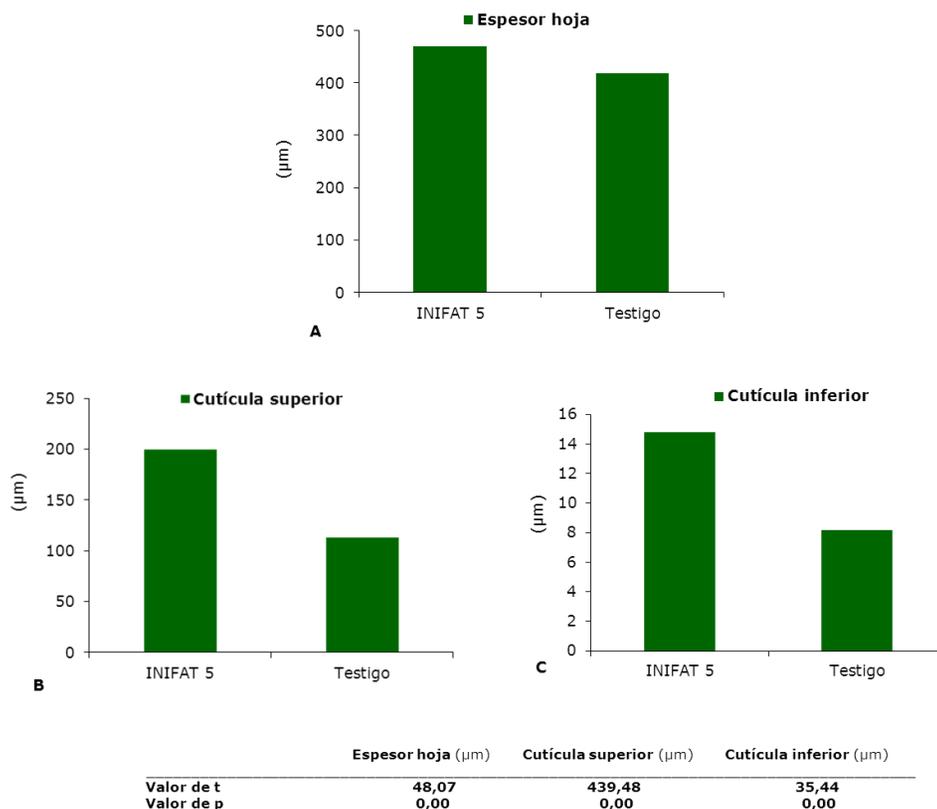


Figura 11. Efectos morfológicos en el grosor de la hoja, cutícula superior e inferior en hojas de plantas de piña inoculadas con *A. chroococcum* (cepa INIFAT 5) y el testigo. Comparación de medias para cada indicador (t-Student, $p \leq 0,05$, $n=50$).

La cutícula constituye una barrera mecánica contra la penetración de agentes patógenos como bacterias y hongos (Larcher, 2000). Por lo que este resultado es de gran utilidad para las plantas de piña y para su posterior traslado al campo donde pueden estar expuestas a condiciones de estrés hídrico, altas temperaturas, ataque de patógenos entre otros lo que podría ayudar a estas plantas a tener una mayor protección ante estos cambios.

En la Figura 12 (A, B) se aprecia una vista transversal de la cutícula y células epidérmicas en las hojas de piña testigo e inoculadas donde se muestra el incremento en el grosor de la cutícula de las plantas inoculadas (Figura 12B). En la Figura 12 C se observa la cutícula superior e inferior en las plantas inoculadas. Esta última es mucho mas fina que la cutícula superior.

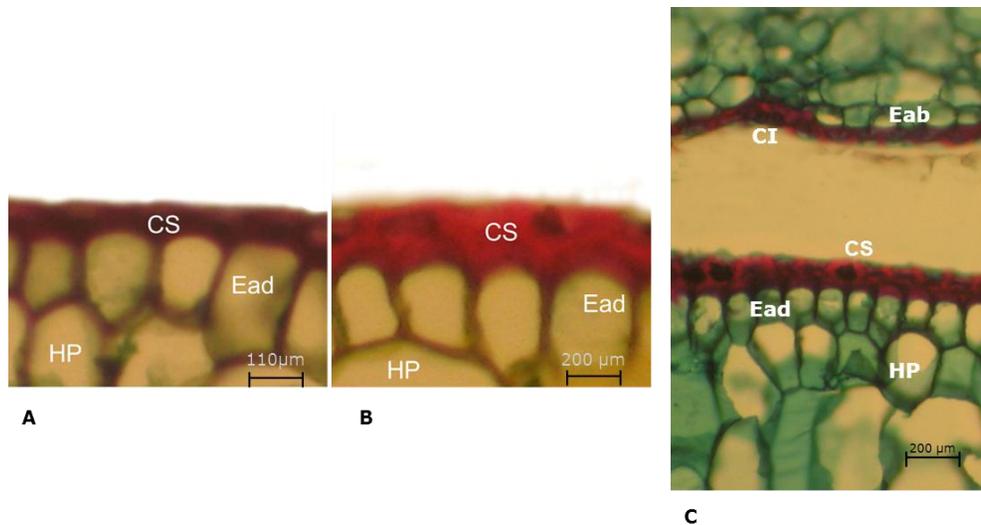


Figura 12. Vista transversal de la cutícula y células epidérmicas en hojas de piña en fase de aclimatización (100x), A) testigo, B) plantas inoculadas. C) Cutícula superior e inferior en plantas inoculadas (40x). CS: cutícula superior, CI: cutícula inferior, Ead: epidermis adaxial, Eab: Epidermis abaxial, HP: hipodermis. Nótese incremento del grosor de la cutícula superior en las plantas inoculadas (B).

El empleo del *Azotobacter chroococcum* sobre las plantas de piña mostró diferencias significativas en el desarrollo de la epidermis comparado con el testigo (Figura 13A). Al analizar los valores en el espesor de la hipodermis de la hoja de las plantas de piña en fase de aclimatización inoculadas con *A. chroococcum*, se encontraron igualmente diferencias significativas entre las variantes estudiadas (Figura 13B). La hipodermis es considerada una estructura más común para el almacenamiento de agua la cual está presente en especies epífitas de familias como Gesneriaceae, Eriaceae, Clusiaceae, Arabiaceae y Bromeliaceae como es el caso de la piña (Madison, 1977). Esta estructura ejerce un importante papel en la economía del calor, específicamente en las plantas con metabolismo ácido de las crasuláceas (Espírito do Santo y Pugialli, 1998). Estos resultados están estrechamente relacionados con el

incremento de la masa fresca de las plantas inoculadas con la bacteria al incrementarse las estructuras de almacenamiento de agua en los tejidos de las plantas.

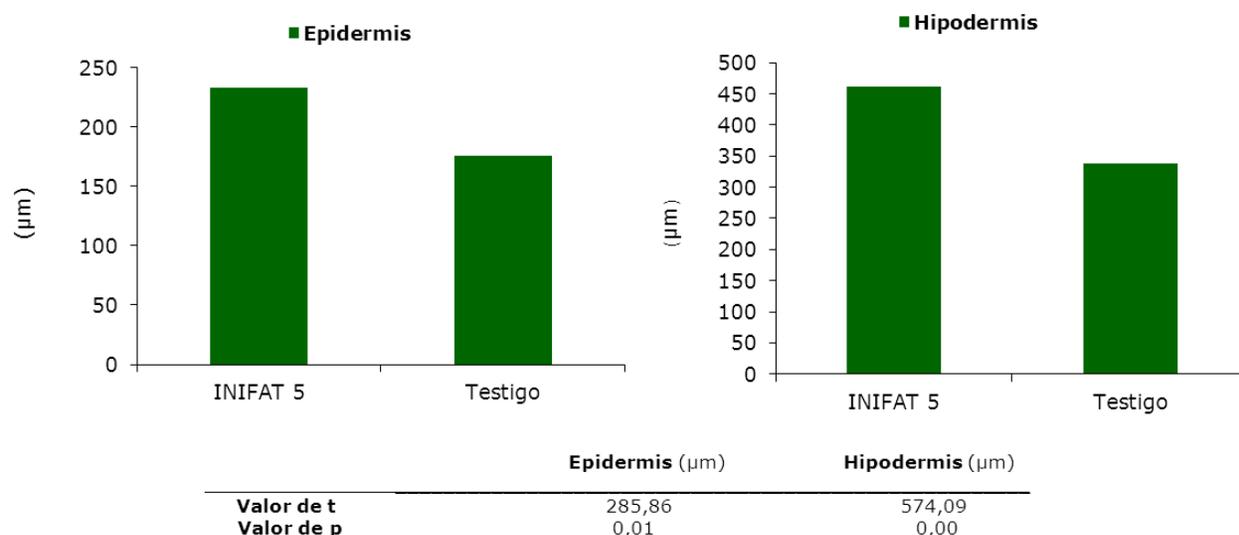


Figura 13. Efectos morfológicos en el grosor de la epidermis e hipodermis en hojas de plantas de piña en fase de aclimatización inoculadas con *A. chroococcum* (cepa INIFAT 5) y el testigo. Comparación de medias para cada indicador (t- Student, $p \leq 0,05$, $n=50$).

En el tratamiento inoculado con *A. chroococcum* se obtuvieron incrementos con respecto al testigo del 20% en el espesor del parénquima acuífero (Figura 14A) en las hojas de las plantas de piña con diferencias significativas entre los dos tratamientos. Los efectos sobre el espesor del parénquima clorofílico de la hoja de plantas de piña inoculadas con *A. chroococcum* no mostraron diferencias significativas con el testigo (Figura 14B).

El parénquima acuífero juega un papel esencial en el almacenamiento de agua y en la adaptación a condiciones de estrés hídrico. Estos resultados coinciden con los analizados en acápite anteriores (acápites 4.2) donde se lograron incrementos en la masa fresca de las plantas inoculadas, lo que está estrechamente relacionado con el incremento del contenido hídrico en este parénquima que proporciona un mayor reservorio de agua (Rebolledo-Martínez *et al.*, 2002). Este resultado es de vital importancia para el cultivo de la piña, ya que uno de los factores que puede influir en una disminución del crecimiento es el contenido hídrico de la planta (Py *et al.*, 1987).

En el caso específico de la piña, esta estructura cumple más bien funciones mecánicas lo que se evidencia en el grosor de las paredes celulares que están fuertemente cutinizadas.

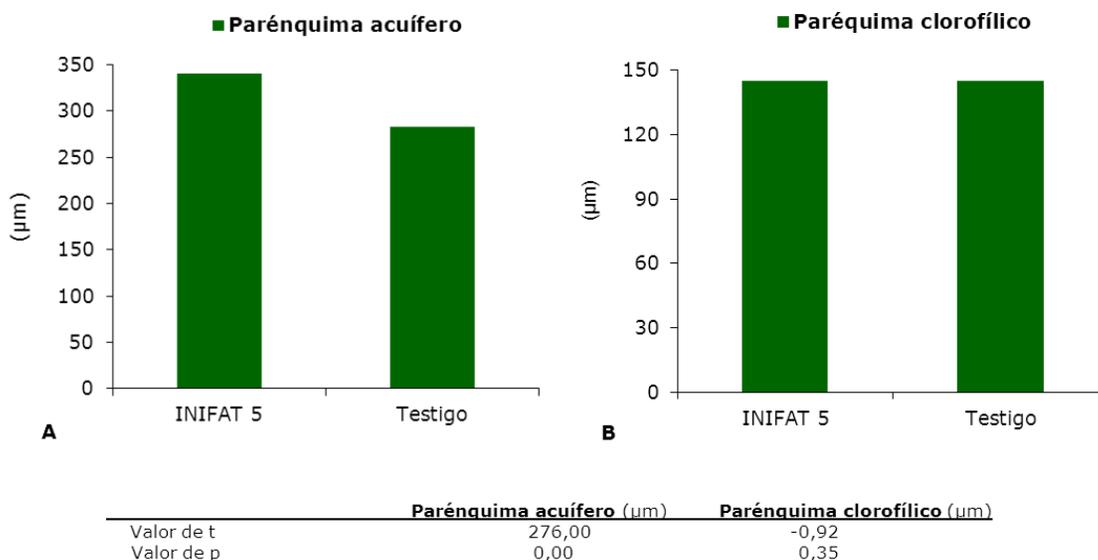


Figura 14. Efectos morfológicos en el grosor del parénquima acuífero y clorofílico en hojas de plantas de piña en fase de aclimatización inoculadas con *A. chroococcum* (cepa INIFAT 5) y el testigo. Comparación de medias para cada indicador (t-Student, $p \leq 0,05$, $n=50$).

En el caso del parénquima clorofílico, no existieron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Este resultado pudo estar relacionado con el aumento del contenido de clorofila y no con el incremento del crecimiento de este tejido. Sin embargo, existió una estimulación en el crecimiento en las plantas inoculadas lo que conlleva a suponer que aunque no hubo un aumento significativo en el parénquima clorofílico sí podría haber un incremento en la eficiencia de los procesos fotosintéticos relacionados con el crecimiento de las plantas.

En la Figura 15 se aprecia un corte transversal de las hojas de piña en la fase de aclimatización en plantas inoculadas con el biofertilizante (A) y el testigo (B).

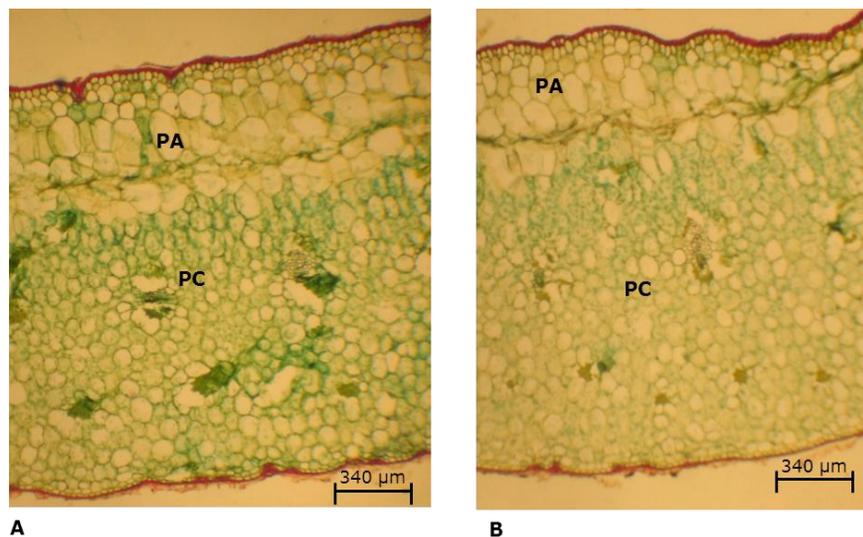


Figura 15. Sección transversal de la hoja de piña en ambos tratamientos, A) plantas inoculadas, (B) plantas testigo. (PA) parénquima acuífero, (PC) parénquima clorofílico, (16x).

Al analizar los resultados obtenidos en los indicadores exodermis, mesodermis externa e interna y la médula, evaluados en raíces de plantas de piña inoculadas, se obtuvieron diferencias significativas en todos los indicadores comparados con el testigo sin inocular (Figura 16). Todos los indicadores mostraron un incremento por encima del 30% en las plantas inoculadas con respecto al testigo. En la exodermis (Figura 16A), se incrementaron los valores en un 77% con respecto al testigo. El resto de los indicadores mostraron incrementos de 39, 38 y 61% respectivamente, con respecto al testigo (Figura 16 B, C, D).

Estos resultados presuponen que estas bacterias rizosféricas ejercen una acción estimuladora en el desarrollo de las raíces y en su funcionabilidad, teniendo en cuenta que las mismas producen hormonas del crecimiento vegetal, como auxinas que juegan un papel esencial en el desarrollo de las raíces (Teale *et al.*, 2006).

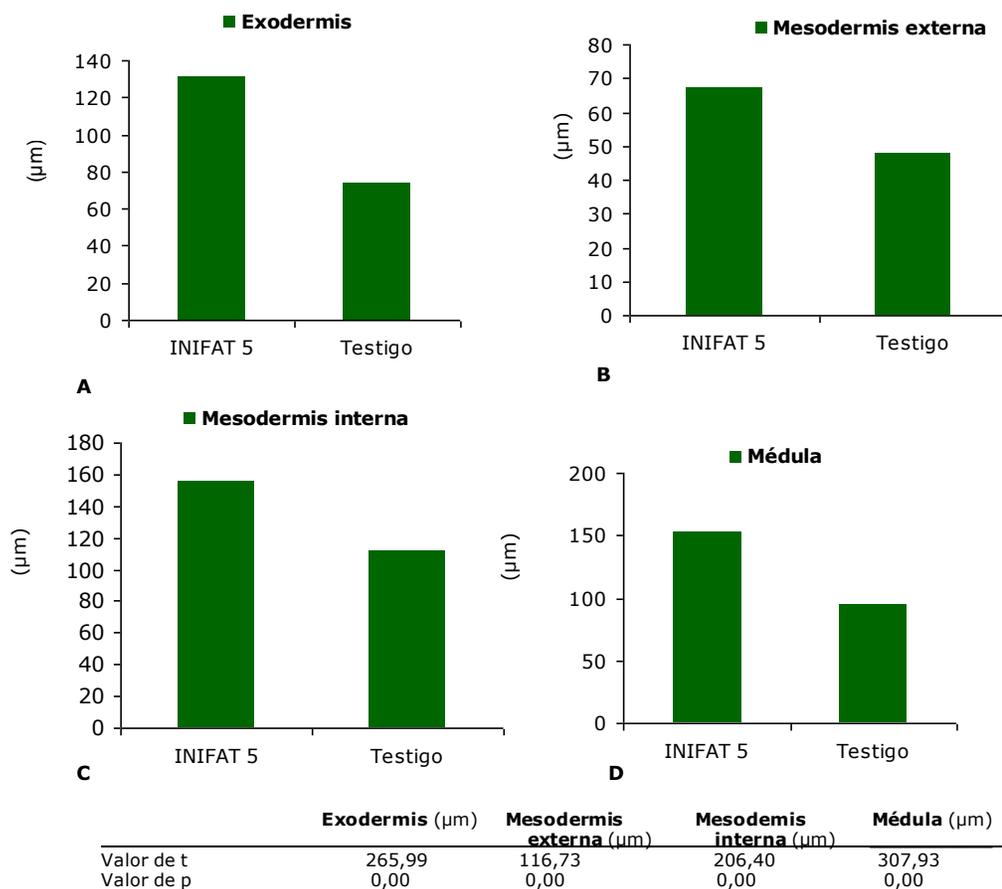


Figura 16. Efectos morfológicos sobre el grosor de raíces de plantas de piña en fase de aclimatización inoculadas con *A. chroococcum* (cepa INIFAT 5) y el testigo. Comparación de medias para cada indicador (t- Student, $p \leq 0,05$, $n=50$).

En la Figura 17 se muestra un corte transversal de raíz en ambas variantes estudiadas. Las plantas biofertilizadas con *A. chroococcum* presentan una mesodermis (Me) menos esclerotizada que en las plantas testigo, con mayor cantidad de brechas que facilitan una mejor absorción del agua y las sustancias nutritivas desde la epidermis hasta los elementos traqueales en las plantas inoculadas.

La exodermis de la raíz presenta células poligonales con paredes aparentemente esclerotizadas, presenta esclereidas (macroesclereidas) constituida por células muertas. La endodermis constituye la capa más interna de la corteza formada por células rectangulares con las bandas de Caspary muy desarrolladas. El cilindro central lo constituye el periciclo o capa más externa y en su interior se ubican el xilema y el floema en forma de haz radial como es típico en

monocotiledóneas. En el centro del cilindro central se localiza la médula, constituida por un esclerénquima con células muertas la cual cumple funciones mecánicas.

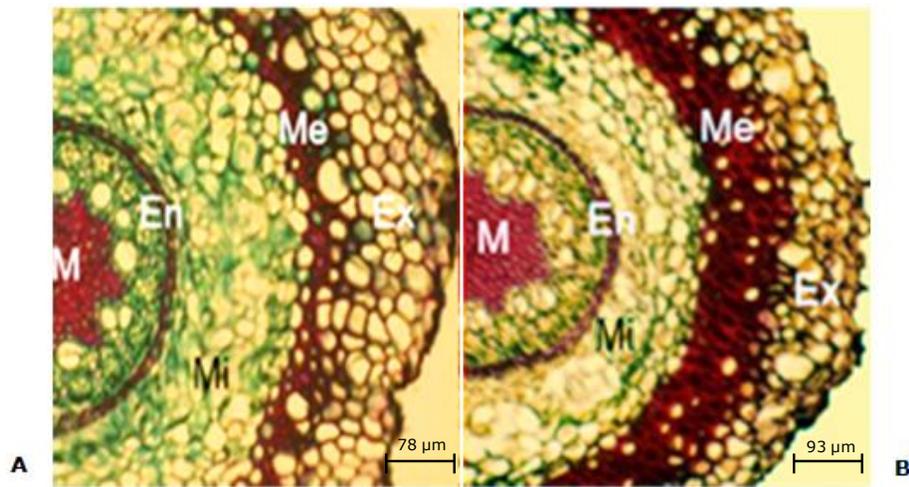


Figura 17. Sección transversal de raíz en plantas de piña en fase de aclimatización (40x) A: inoculadas con *A. chroococcum* B: testigo. Ex: Exodermis, Me: mesodermis externa, Mi: mesodermis interna, En: endodermis, M: médula.

Estos resultados son de gran importancia si se tiene en cuenta que la raíz es la parte subterránea de la planta, especializada como órgano de sostén y de absorción de agua y sales minerales, así como del soporte necesario para facilitar la apertura de las primeras hojas para que se inicie el proceso fotosintético (Zonta *et al.*, 2006). Estos resultados están relacionados con la longitud de las raíces encontradas en los experimentos anteriores (acápite 4.2), donde se pudo demostrar que el efecto de la bacteria ejerce una estimulación en el crecimiento de este órgano que se evidencia a nivel celular por el aumento del grosor de sus estructuras fundamentales, lo cual se revierte en un mayor crecimiento de estas plantas. Bahat-Samet *et al.* (2004) refieren que los reguladores del crecimiento producidos por bacterias causan cambios detectados en la morfología de las raíces y generan un aumento en la absorción de nutrientes. No existen estudios precedentes de caracterización de raíces en plantas de piña, por lo que estos resultados son una premisa para continuar profundizando en el efecto de estos biofertilizantes a nivel celular.

Varios autores refieren la importancia de la asociación en la raíces de las plantas de una amplia gama de microorganismos los cuales pueden influir en la absorción de nutrientes, ya sea por efecto directo sobre las raíces, por efecto sobre el medio o por competir directamente por los nutrientes del suelo (Miller *et al.*, 2009). Se considera a la rizosfera como una zona de intensa actividad microbiana alrededor de las raíces, cuya influencia estimula el crecimiento y aumenta la densidad de microorganismos. Entre estos se encuentra *A. chroococcum* (Dobbelaere y Okon 2007; Hartmann *et al.*, 2008).

Una amplia revisión de la literatura especializada permite afirmar que los resultados aquí mostrados constituyen las primeras descripciones de los cambios morfológicos que induce la aplicación de *A. chroococcum* (cepa INIFAT 5) en plantas de piña en fase de aclimatización.

4.4.2 Determinación del contenido de minerales

Las plantas inoculadas incrementaron el contenido de los minerales N, P, K; Mg, Cu y Zn con diferencias significativas con el testigo (Tabla 4). Los minerales Ca, Fe y Mn no mostraron diferencias significativas entre ambos tratamientos. El contenido de Zn mostró un incremento significativo por encima del tratamiento sin inocular donde solo fueron detectadas trazas del mineral.

El incremento mostrado en el contenido de N en el tratamiento inoculado podría estar relacionado con la fijación biológica del N, ya que este microorganismo es considerado fijador de N de forma asimbiótica. Autores como García *et al.* (2005) han referido resultados satisfactorios con la inoculación de *Azotobacter beijerinckii* y *Azospirillum* spp. que aumentaron la absorción de urea y la transformación de los exudados radicales en sustancias promotoras del crecimiento vegetal, así como incrementaron la masa fresca y seca de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.).

Bacterias del género *Azotobacter* se han utilizado en sistemas de acuicultura y en producción de vermicompost para incrementar el contenido de nitrógeno y fósforo del producto (Garg *et al.*, 2001; Kumar y Singh, 2001).

Tabla 4. Contenido de minerales en hojas de plantas de piña inoculadas con *A. chroococcum* (cepa INIFAT 5) y comparadas con el testigo sin inocular. Comparación de medias (t-Student, $p \leq 0,05$, $n=5$).

Minerales (mg.gMS ⁻¹)	INIFAT 5	Testigo	Valor de t	Valor de p
N	0,070	0,040	5,21	0,03
P	0,010	0,002	10,28	0,00
K	0,370	0,007	10,56	0,00
Ca	0,007	0,006	0,67	0,57
Mg	0,005	0,002	5,87	0,02
Fe *	1,650	1,710	-0,99	0,42
Cu*	0,060	0,010	7,14	0,01
Zn*	0,130	t		
Mn*	0,187	0,190	-1,40	0,29

(t: trazas). *Valores expresados en mg.L⁻¹.

En el cultivo de la piña cv. Victoria en fase de aclimatización, con el empleo de *Burkholderia* sp. combinada con ácidos húmicos, se ha logrado incrementar el crecimiento de las plantas así como el contenido de N, P y K (Baldotto *et al.*, 2010a). Se ha informado que las cepas cubanas de *A. chroococcum* son capaces de suministrar hasta el 50% de los requerimientos de nitrógeno de las plantas mediante la fijación biológica (Dibut, 2000). La actividad nitrofixadora de la cepa INIFAT 5 ha sido estudiada por Dibut (2000) y Martínez *et al.* (2011), donde se comprobó su capacidad diazotrófica de producir entre 15-25 kg de N.ha⁻¹ cuando se expresa su capacidad nitrofixadora, determinada por ¹⁵N.

En el caso del P, se obtuvieron incrementos significativos en la absorción por parte de las plantas que recibieron el efecto de la inoculación. Adesemoye y Kloepper (2009) informaron que con el empleo de *A. chroococcum* y hongos micorrícicos arbusculares se obtuvo un incremento en la asimilación de fósforo en granos de maíz (*Zea Mays* L.). Se conoce que hasta un 40% de las bacterias rizosféricas, entre ellas *A. chroococcum*, son capaces de solubilizar fosfatos cuando son cultivadas en laboratorios (Adesemoye y Kloepper, 2009). Después del nitrógeno, el fósforo es el mineral más importante para el crecimiento y desarrollo de las plantas, por lo que

usualmente se emplean fertilizantes para suministrar las cantidades necesarias de este mineral (Hameedaa *et al.*, 2008). Goldstein (1995) y Kim *et al.* (1997) refieren que la solubilización de P por los microorganismos está asociada con la excreción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, los cuales a través de los grupos hidroxilos y carboxilos quelan los cationes ligados al P y los convierten en formas asimilables.

La asimilación de K se incrementó en el tratamiento inoculado comparado con el testigo sin inocular. Sheng y He (2006) con el empleo de cepas y mutantes de *Bacillus edaphicus* obtuvieron incrementos en la asimilación de K en plantas de trigo. Estos autores refieren que los ácidos orgánicos como por ejemplo ácido cítrico, oxálico, tartárico, succínico y α -cetoglucónico, que producen estas bacterias, son capaces de quelar metales y movilizar K. Además el potasio participa como activador de la síntesis proteica y de varias enzimas que intervienen en el metabolismo glucídico (Devlin, 1982).

En estudios colaterales a esta investigación, se realizó una caracterización de la producción de ácidos orgánicos por la cepa INIFAT 5 en el medio de cultivo Dimargon. Se pudo detectar la presencia de 0,78 mg.mL⁻¹ de ácido acético y 2,31 mg.mL⁻¹ de ácido oxálico, lo que podría ser una de las razones que ayuden a explicar el incremento de P y K en las plantas inoculadas.

En la aclimatización de plantas de piña habitualmente se emplean fertilizantes como Multicombi (1 g.L⁻¹), multi NPK cristalino (15 g.L⁻¹) para garantizar la disponibilidad de nutrientes e incrementar el crecimiento de las plantas. Por lo que estos resultados podrían ser una alternativa para la sustitución parcial del empleo de fertilizantes en esta fase del cultivo.

En el caso del Mg, el incremento significativo de este mineral en las plantas inoculadas pudo estar relacionado con la disponibilidad del mismo en la mezcla de sustrato utilizada para las plantas en aclimatización (Tabla 3), lo cual pudo haber favorecido la asimilación del mismo por la acción de la bacteria. Loredó-Osti *et al.* (2004) refieren que *A. chroococcum*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Bacillus* son capaces de solubilizar nutrientes, entre otras funciones que contribuyen a una mejor nutrición de las plantas inoculadas con estos microorganismos. La aplicación combinada y por separado de ácidos húmicos y *Burkholderia* sp., estimuló el crecimiento foliar y radical de plantas de piña cv Victoria en fase de aclimatización y aumentó el contenido de N, P, K, Ca y Mg (Baldotto *et al.*, 2010a). La

evaluación de cuatro cepas de *A. chroococcum* en raíces de Manzana 'Golden Delicious' sobre el patron M9 mostró que la cepa más efectiva incrementó el área foliar de las plantas así como el contenido foliar de K, Mg, Fe, Mn, Zn y B y en raíces de P, K, Mn y Zn. Además la combinación de la cepa con fertilizante nitrogenado y compost también estimuló la asimilación de estos minerales y la masa seca de las raíces (Khosravi *et al.*, 2009).

Incrementos en el contenido de Cu y Zn en las plantas inoculadas con *A. chroococcum* también han sido informados por Zayed (2012) en plantas de *Moringa oleifera* donde las plantas inoculadas con la bacteria de forma independiente o combinada con otros biofertilizantes incrementaron el contenido de estos minerales con diferencias con el testigo. Canbolat *et al.* (2006) en plantas de cebada (*Hordeum sativum* L.), con el empleo de diferentes cepas de *Bacillus* sp. obtuvieron incrementos significativos en el contenido de Zn y Cu.

Zayed (2012) refirió que de manera general *A. chroococcum* estimula el crecimiento de las plantas a través de la solubilización de fosfatos, movilización de potasio y producción de sustancias estimuladores del crecimiento vegetal.

Estos resultados unidos a los obtenidos en el incremento en la longitud de las raíces y el grosor de sus estructuras radiculares, contribuyen a pensar en una mayor asimilación de nutrientes en las plantas inoculadas, que influyen en el aumento del crecimiento que las mismas presentaron.

4.4.3 Determinación de la concentración de aminoácidos y de proteínas totales

La determinación de aminoácidos en los tratamientos evaluados se muestra en la Tabla 5. En las plantas inoculadas se identificaron ocho aminoácidos Valina (V), Isoleucina (I), Prolina (P), Serina (S), Acido aspártico (D), Glicina (G), Treonina (T) y Fenilalanina (F), mientras que en el tratamiento testigo solo se detectaron dos (Valina y Serina).

Los aminoácidos Valina y Serina fueron detectados en ambos tratamientos, pero la concentración fue cuatro veces superior en el tratamiento inoculado con diferencias significativas con el tratamiento testigo. El resto de los aminoácidos detectados en el tratamiento inoculado mostraron valores entre 0,08 y 0,35 mg por g de masa seca.

Tabla 5. Concentración de aminoácidos en hojas de plantas inoculadas con *A. chroococcum* (cepa INIFAT 5) y el testigo sin inocular. Comparación de medias (t-Student, $p \leq 0,05$, $n=5$).

Aminoácidos	Concentración de Aminoácidos [mg.g MS ⁻¹]		Valor de t	Valor de p
	INIFAT 5	Testigo		
V	0,22	0,05	4,70	0,04
I	0,33	ND		
P	0,35	ND		
S	0,28	0,07	4,60	0,04
D	0,12	ND		
G	0,07	ND		
T	0,11	ND		
F	0,08	ND		

(ND) equivale a no detectados

Se ha demostrado por otros autores (Dibut *et al.*, 1995) una elevada capacidad de biosíntesis de aminoácidos por la cepa INIFAT 12 de *A. chroococcum*, base del producto Biostin para su aplicación en hortalizas, donde fueron identificados todos los aminoácidos detectados en esta investigación.

Esta bacteria produjo en condiciones de laboratorio 1,06 nmol.mL⁻¹ de Serina y 1,60 nmol.mL⁻¹ de Valina, y del resto de los aminoácidos aquí detectados valores entre 0,27 y 2,25 nmol.mL⁻¹. Estos resultados inducen a pensar que la excreción de estos aminoácidos durante el metabolismo microbiano podría ser una fuente adicional de nutrientes para las plantas, mediante la relación que se establece entre ellas y el microorganismo. En resultados anteriores se pudo corroborar el incremento del grosor de la raíz en las plantas inoculadas, lo que favorece una mayor absorción de nutrientes hacia los sitios de mayor demanda, fundamentalmente las hojas, donde se realiza la mayoría de los procesos anabólicos y catabólicos en las plantas de piña (Coppens d'Eeckenbrugge y Leal, 2003; Malézieux y Bartholomew, 2003). Los aminoácidos son elementos esenciales para la síntesis de proteínas y enzimas, además, son precursores de la clorofila y de hormonas vegetales. También pueden quelar microelementos para que sean mejor absorbidos por la planta (Coruzzi y Last, 2000).

Entre los aminoácidos detectados en las plantas inoculadas se encuentran Serina y Glicina, que juegan un papel importante en el ciclo fotorespiratorio del carbono (Medrano y Flexas, 2000). Este ciclo permite recuperar alrededor del 75% del carbono que originalmente se escapa del ciclo C₃ en forma de glicolato. El 25% restante se desprende a la atmósfera como CO₂, donde forma parte del ciclo C₂ (ciclo fotosintético de oxidación del carbono). Otros autores (Barceló *et al.*, 1992) refieren que el proceso fotorespiratorio vía Glicina y Serina puede ser una vía de formación fotosintética de aminoácidos. Estas valoraciones pudieran estar indicando que en estas condiciones las plantas de piña podrían estar desarrollando un metabolismo C₃ y no CAM. Aragón *et al.* (2012) refieren que las plantas de piña en condiciones *ex vitro* presentan una plasticidad fisiológica y morfológica que puede cambiar de acuerdo a las condiciones ambientales en que son cultivadas. Por esta plasticidad del cultivo, éste se describe que presenta un posible metabolismo facultativo C₃-CAM.

Estos dos aminoácidos (Serina y Glicina) también participan en el ciclo fotorespiratorio del nitrógeno, donde las reacciones de aminación por glutamato y Serina conducen a la formación de Glicina, la cual por descarboxilación desprende CO₂ y NH₄. Estas cantidades de amonio son diez veces superiores a la que se produce por la reducción del nitrato (Keys *et al.*, 1978). El amonio es reasimilado en el cloroplasto y nuevamente pasa a formar parte del ciclo fotorespiratorio, lo que resulta esencial para evitar la acumulación excesiva del mismo en los tejidos de las plantas y una pérdida del nitrógeno orgánico. Por lo que el incremento de estos aminoácidos en las plantas inoculadas podría favorecer este proceso y permitir una mejor funcionabilidad de las células vegetales.

Otro de los aminoácidos que fue identificado en las plantas inoculadas fue la Prolina. Se plantea que una acumulación de este aminoácido puede ser parte de señales de estrés relacionados con respuestas adaptativas (Maggio *et al.*, 2003). La Prolina se acumula en distintos organismos como plantas, eubacterias, invertebrados marinos, protozoos y algas, cuando están expuestos a condiciones de estrés como sequía, salinidad, altas temperaturas, congelación, radiación ultravioleta y metales pesados (Demir y Ozturk, 2003). Sin embargo, otros autores plantean que en algunos casos la concentración de Prolina no es lo suficientemente alta como para ser un indicador de estrés en las plantas y podría estar relacionada con otras funciones como

estabilizar estructuras celulares (Holmstrom *et al.*, 2000), eliminar radicales libres (Hoque *et al.*, 2007), detoxificar metales pesados (Rai, 2002) o activar respuestas específicas del estrés actuando como molécula señal (Maggio *et al.*, 2003). Estas valoraciones podrían tener relación con los resultados obtenidos en las plantas inoculadas donde el incremento de Prolina no fue muy elevado, lo que presupone que podría estar relacionado con la activación de algunos de estos mecanismos referidos anteriormente e inducidos por la bacteria.

La acumulación de Prolina en los tejidos aéreos de las plantas inoculadas juega un papel importante si se tiene en cuenta sus propiedades osmoreguladoras, además constituye una fuente de carbono y nitrógeno y participa como "chaperona" para estabilizar proteínas de la membrana celular (Verbruggen y Herman, 2008). Szabados y Savoure (2010) refieren que la Prolina además de modular la respuesta ante estrés bióticos y abióticos, funciona como señal metabólica que regula grupos de metabolitos y el balance redox, controla la expresión de numerosos genes e influye en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por lo que el incremento de este aminoácido en las plantas inoculadas podría contribuir a una mejor funcionabilidad de estas plantas y una mayor protección para eventos posteriores de estrés.

La concentración de proteínas totales mostró los mejores resultados en las plantas inoculadas, siendo seis veces mayor los valores obtenidos con diferencias significativas con respecto al testigo (Figura 18).

Esto puede estar relacionado con la disponibilidad de aminoácidos en las plantas inoculadas, que favorecen el incremento de la formación de diversas proteínas relacionadas con procesos de crecimiento, cuestiones que se demuestran con el incremento en masa seca de las plantas inoculadas cada cuatro semanas.

Las bacterias del grupo PGPR entre ellas *Azotobacter*, metabolizan exudados radicales (carbohidratos) y proporcionan nitrógeno para la síntesis de aminoácidos (Dobbelaere *et al.*, 2003; Berg, 2009). Resultados similares refiere Zayed (2012) en hojas de *Moringa oleifera* inoculadas con diferentes biofertilizantes, incluido *A. chroococcum*, donde obtuvo incrementos significativos entre 0,2 y 0,3 g de proteínas totales, en la mayoría de las combinaciones de biofertilizantes empleados con respecto al testigo.

Owen y Jones (2001) plantean que los microorganismos productores de fitohormonas son capaces de alterar la síntesis de ARN y proteínas en plantas, como respuesta a la acción microbiológica, provocando alteraciones enzimáticas, directamente relacionados con el crecimiento y desarrollo de los cultivos.

Terry y Leyva (2006) al evaluar el efecto de la coinoculación de *Azospirillum brasilense* y HMA en plantas de tomate, obtuvieron incrementos en el contenido de proteínas en las plantas inoculadas.

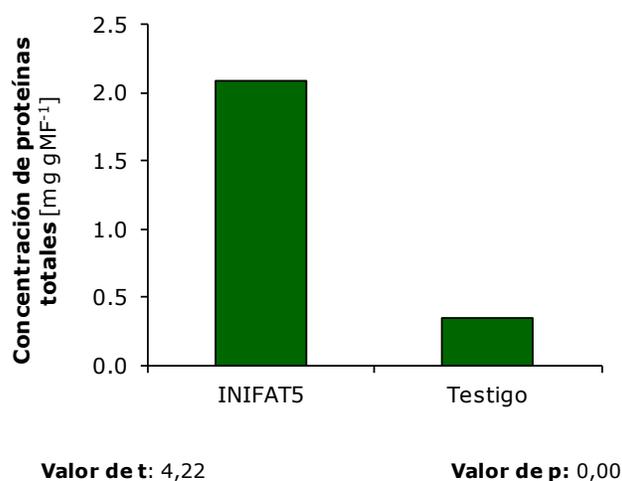


Figura 18. Concentración de proteínas totales en hojas de plantas de piña inoculadas con *A. chroococcum*(INIFAT 5) y no inoculadas (Testigo). Comparación de medias (t-Student, $p \leq 0,05$, $n=5$).

Estos autores además refieren que el contenido de proteínas foliares presentes en las plantas, es debido a que una de las funciones fundamentales de los microorganismos inoculados, es estimular el desarrollo radical de las plantas, lo que posibilita una mayor exploración del sistema radical para una mejor absorción de nutrientes. Estas afirmaciones podrían ser la causa de que las plantas inoculadas con la cepa INIFAT 5 que mostraron una mayor longitud radical presentan una mayor concentración de proteínas ya que el incremento de este órgano facilita la asimilación de nutrientes en las plantas.

La disponibilidad de aminoácidos mostrada en las plantas inoculadas pudo favorecer la formación de determinados grupos de proteínas como las glicoproteínas presentes en la pared

celular de la mayoría de las plantas incluida la piña. Estas glicoproteínas ricas en hidroxiprolina contienen además, Thr, Ser y Val (José *et al.*, 1993) que también fueron identificadas en las plantas inoculadas. También existen en la pared celular de algunos tejidos proteínas ricas en Gly con funciones estructurales y de inducción de respuesta a distintos procesos defensivos (José *et al.*, 1993).

Autores como Lugtenberg *et al.* (2002), Moirrissey *et al.* (2004) y Berg (2009) refieren los beneficios que estas bacterias proporcionan a las plantas desde el punto de vista de la sanidad y el crecimiento así como del incremento a la tolerancia de diferentes estreses, disponibilidad de nutrientes e inducción de resistencia a enfermedades. Estas bacterias al asociarse a la planta desencadenan una serie de reacciones y procesos que contribuyen a la protección y estimulación del crecimiento de la misma (Berg *et al.*, 2002; Haas y Defago, 2005; Müller *et al.*, 2009). Otros resultados muestran que las bacterias promotoras del crecimiento vegetal pueden ser utilizadas como biocontrol, ya que producen enzimas tales como proteasas, quitinasas, lipasas, β -1,3 glucanasas, las cuales promueven la lisis de células de hongos y preparan a la planta para el ataque de patógenos (Glick *et al.*, 2007). Por ello, los resultados mostrados podrían estar relacionados con la formación de algunas de estas proteínas, las mismas que se encuentran presentes en las plantas y que guardan estrecha relación con condiciones de estrés ante el ataque de patógenos (Van Loon *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos en la asimilación de Mg, K y Zn en las plantas inoculadas mostrados en el acápite 4.4.2 (Tabla 4) también podrían influir en el incremento de las proteínas. El Mg participa directamente en la síntesis de proteínas como activador de algunos de los sistemas enzimáticos que intervienen en la síntesis de ácidos nucleicos, y sirve como agente de unión entre los microsomas donde se realiza la síntesis de proteínas, y el K favorece la síntesis de proteínas por su papel como catalizador (Devlin, 1982). El Zn participa como activador de varias enzimas, entre ellas las transportadoras de fosfato, y se considera que desempeña un importante papel en la síntesis de proteínas (Devlin, 1982).

Resultaría interesante en estudios futuros determinar el perfil proteómico en plantas de piña inoculadas con *A. chroococcum*, para dilucidar mejor los resultados encontrados.

No existen referencias hasta donde se tiene conocimiento, que expliquen los efectos a nivel de síntesis de aminoácidos y proteínas de la inoculación con rizobacterias estimuladoras del crecimiento en plantas de piña en fase de aclimatización; por lo que estos resultados pueden constituir las primeras valoraciones sobre el efecto de *A. chroococcum* en este sentido.

4.4.4 Determinación de la concentración de carbohidratos totales

En la Figura 19 se muestran los resultados del efecto de la bacteria sobre la concentración de carbohidratos en las hojas de plantas de piña. Se obtuvieron incrementos significativos en el contenido de los azúcares estudiados en las plantas inoculadas con *A. chroococcum*, con respecto al tratamiento testigo, los contenidos de glucosa y fructosa se incrementaron 2,23 y 4,65 veces mientras que en el caso de la sacarosa el incremento fue altamente significativo, con incrementos 6,7 veces mayor.

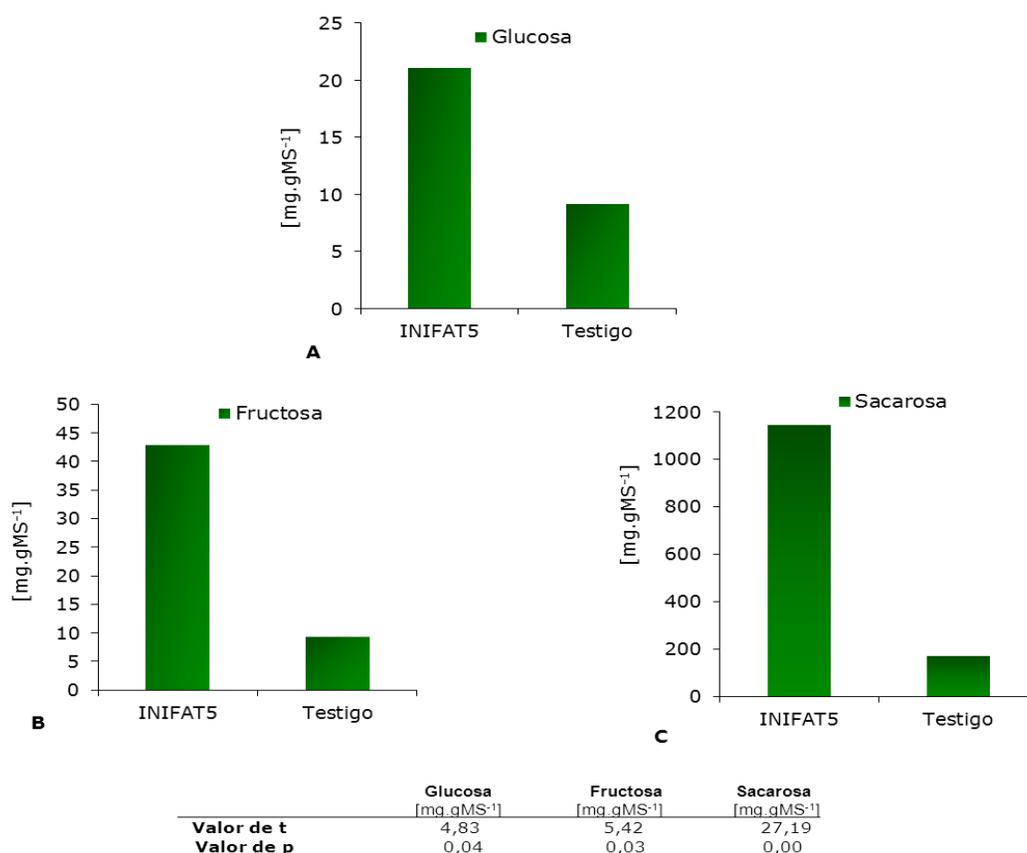


Figura 19. Concentración de carbohidratos totales en hojas de plantas de piña inoculadas con *A. chroococcum* (INIFAT 5) y el testigo sin inoculación Comparación de medias para cada indicador (t-Student, $p \leq 0,05$, $n=5$).

Esto indica que existió una estimulación en los mecanismos de síntesis de carbohidratos en las hojas con la inoculación de la bacteria. Estos resultados podrían estar relacionado con el contenido de masa seca de las plantas inoculadas con una frecuencia cada cuatro semanas (acápite 4.2) y con el incremento de la fotosíntesis.

Holtum *et al.* (2005) plantearon que la mayoría de las plantas CAM, donde se incluyen especies cultivables como *Ananas comosus*, almacenan durante el día cantidades considerables de carbohidratos que representan hasta un 20% de la biomasa foliar. Otros autores refieren que vacuolas aisladas de plantas de piña contienen fundamentalmente glucosa y fructosa (Kenyon *et al.*, 1985; Christopher y Holtum, 1998).

Los extractos de hojas contienen mayormente sacarosa (Kenyon *et al.*, 1985), la cual es uno de los principales azúcares que se forman producto de la fotosíntesis y el principal carbohidrato translocado desde las hojas hasta los tejidos no fotosintéticos (Day y Copeland, 1993).

Por lo que el incremento en la concentración de sacarosa y el resto de los azúcares en las plantas inoculadas podría estar relacionado con una mayor fijación de CO₂, el cual favorece el incremento de los procesos fotosintéticos por la acción de la bacteria, lo que se demuestra en resultados posteriores (acápite 4.4.6).

Los carbohidratos además proporcionan esqueletos carbonados a otras rutas metabólicas de síntesis de aminoácidos y proteínas (Dary y Desjardins, 2001), lo que podría estar relacionado con el incremento del contenido de aminoácidos y proteínas en las plantas inoculadas con la bacteria (acápite 4.4.3). En estudios sobre el efecto de la coinoculación HMA-*Azospirillum* sp., la colonización de las raíces por los hongos estimula el flujo de carbohidratos desde el follaje hasta la raíz, estos carbohidratos pueden constituir fuentes de carbono para el crecimiento de la bacteria (Costacurta, 1995).

Hasta donde se conoce no existen referencias anteriores que refieran el contenido de azúcares en plantas inoculadas con PGPR.

4.4.5 Determinación del contenido de clorofilas *a*, *b* y totales

El contenido de clorofilas *a*, *b* y totales fue significativamente superior en las plantas inoculadas con *A. chroococcum* con respecto al testigo (Figura 20).

El contenido de clorofilas *b* fue superior al contenido de clorofilas *a* en las plantas inoculadas, mientras que en el testigo esta relación fue inversa, o sea, el contenido de clorofilas *a* fue mayor que el de clorofila *b*. Esto podría suponer que la aplicación de *Azotobacter* implica la inducción génica a través del fitocromo para la activación de enzimas que participan en la síntesis de clorofilas (Malkin y Niyogi, 2000).

El incremento del contenido de clorofila *b* en las plantas inoculadas puede estar relacionado con un mejor funcionamiento del fotosistema II. Barceló *et al.* (1992) refiere que el fotosistema II contiene la mayor parte de las clorofilas *b* de los cloroplastos. Esto pudiera estar relacionado con los resultados obtenidos en la determinación de la fluorescencia del fotosistema II que se muestra en resultados posteriores (acápite 4.4.6), pues a la eficiencia fotosintética contribuye tanto la clorofila *a* como la *b*.

El aumento de los pigmentos clorofílicos en las plantas inoculadas pudiera estar relacionado con una mejor nutrición de estas plantas, donde el crecimiento y desarrollo de las estructuras fotosintéticas de las hojas se ven incrementadas y con ello la síntesis de los pigmentos clorofílicos *a*, *b* y totales.

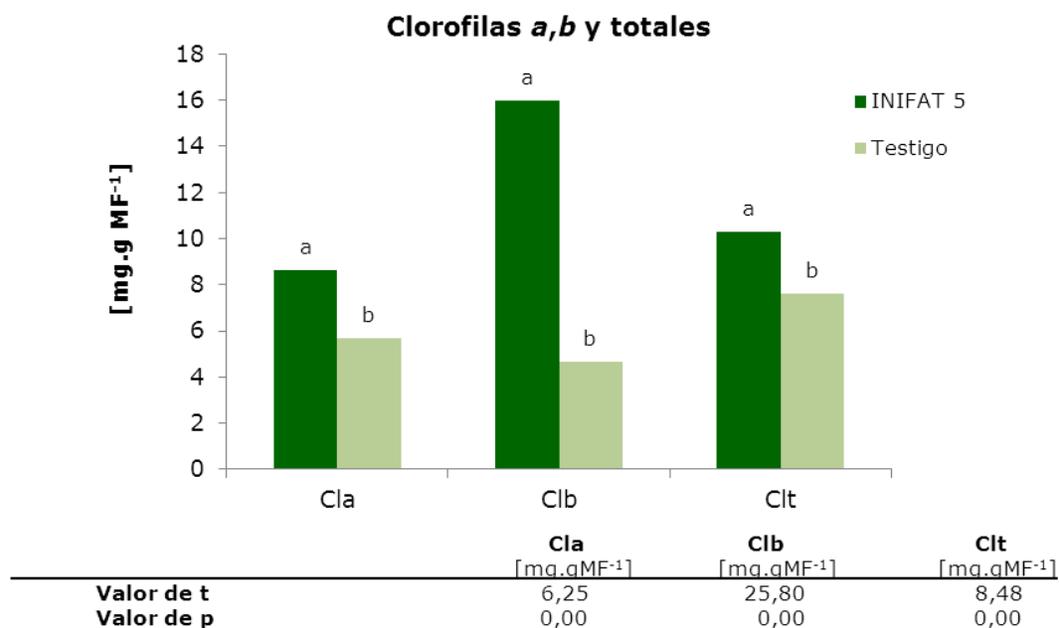


Figura 20. Concentración de clorofilas *a* (Cla), *b* (Clb) y totales (Clt) en hojas de plantas de piña inoculadas con *A. chroococcum* (INIFAT 5) y en el testigo sin inoculación. Comparación de medias para cada indicador (t-Student, $p \leq 0.05$, $n=5$).

Estos resultados se corresponden con los encontrados en el contenido de Mg en las plantas inoculadas como se mostró en el acápite 4.4.2 (Tabla 4), si se tiene en cuenta que este elemento juega un papel importante en los procesos de fotosíntesis y en el metabolismo glucídico (Devlin, 1982). El Mg forma parte de la molécula de clorofila y participa como activador metálico de la mayoría de las enzimas que utilizan ATP u otro di o trifosfato de nucleósidos como sustrato (Salisbury y Ross, 1994). Por lo que la asimilación de Mg en las plantas inoculadas pudo haber influido indirectamente en el aumento del contenido de las clorofilas. Dobbelaere *et al.* (2003) refirieron incrementos en el contenido de clorofilas y carotenos en plantas de remolacha (*Beta vulgaris* L.) inoculadas con *A. chroococcum*.

4.4.6 Determinación de la máxima eficiencia cuántica del fotosistema II (F_m/F_v), fotosíntesis neta y transpiración

Los resultados sobre la eficiencia fotosintética del fotosistema II se muestran en la Figura 21A. Las plantas inoculadas mostraron un mejor funcionamiento del fotosistema II, 1,2 veces superior al tratamiento no inoculado con *A. chroococcum*.

La eficiencia del fotosistema II (F_v/F_m) está directamente relacionada con el aprovechamiento de la luz solar por las clorofilas del fotosistema II (PSII) y por ello influye indirectamente en la captación de CO₂ reflejada en la fotosíntesis. Lichtenthaler y Riderle (1988) refirieron en un estudio en hojas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) que el aumento de la fluorescencia del fotosistema II está relacionado con el incremento en el contenido de clorofilas.

Los incrementos en los valores de fotosíntesis en el tratamiento inoculado (Figura 21B), reflejan una relación de la apertura de los estomas y la capacidad de fijar CO₂ bajo las condiciones evaluadas.

Para plantas de piña en condiciones de estrés abiótico estos dos parámetros se relacionaron de forma que aún cuando hubo poca variación entre la eficiencia del PSII entre las plantas en condiciones C3 y CAM sí se observaron diferencias en cuanto a la actividad fotosintética (Aragón *et al.*, 2012).

Las plantas inoculadas superaron dos veces la actividad fotosintética y 5,3 veces los niveles de transpiración que las plantas testigo (Figura 21B y 21C). Estos resultados permiten valorar la

posibilidad de que estas plantas podrían estar mostrando un metabolismo C3 y no CAM teniendo en cuenta el incremento de estos procesos y las condiciones óptimas en que son cultivadas en casas de cultivo. Aragón *et al.* (2012) refieren que las plantas de piña en fase de aclimatización desarrollan un metabolismo facultativo en dependencia de las condiciones ambientales.

Las plantas de piña que desarrollan un metabolismo C3 muestran un mejor enraizamiento y mayor producción de ABA (ácido absísico) que puede estar asociado con un fenotipo similar al de plantas adultas (Aragón *et al.*, 2012).

Existen otras referencias, como plantas de *Mesembryanthemum crystallinum*, que en respuesta a la presencia o ausencia de estrés salino o por sequía son clasificadas como plantas con metabolismo facultativo C3-CAM (Cushman *et al.*, 2008).

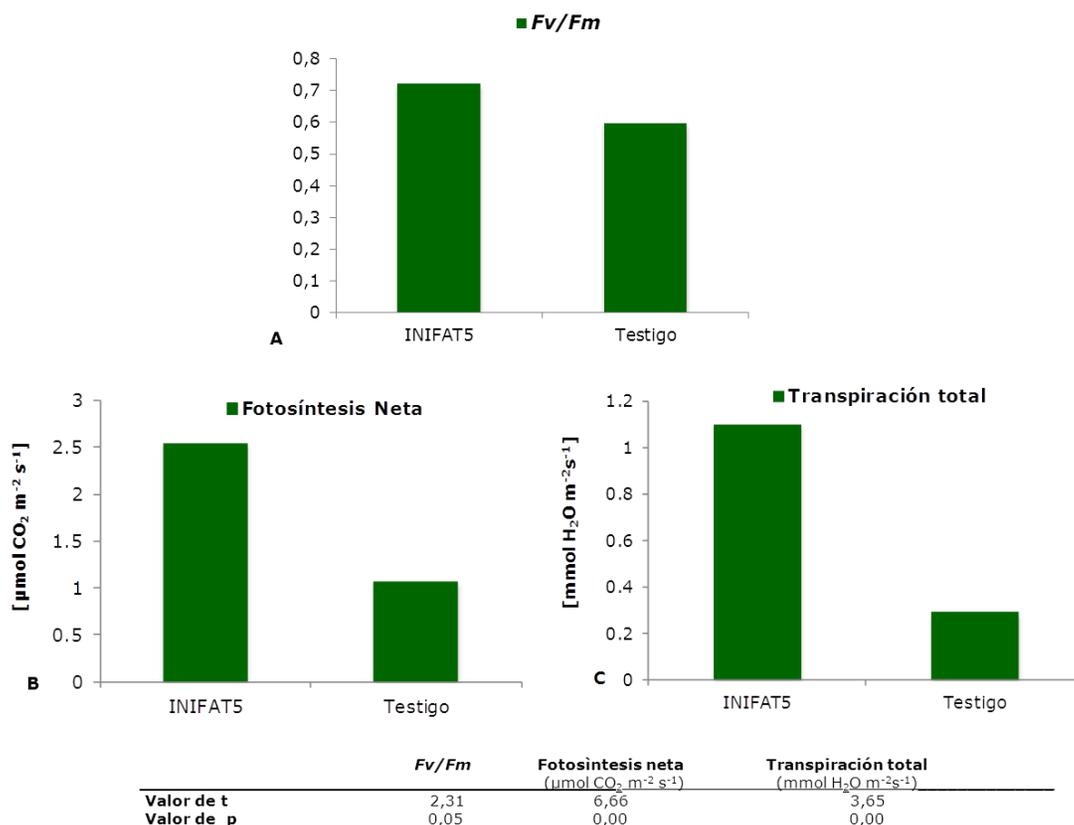


Figura 21. Cambios fisiológicos en las plantas de piña inoculadas con *A. chroococcum* y el testigo sin inocular. Comparación de medias para cada indicador (t-Student, $p \leq 0,05$, $n=15$ (A) y $n=50$ (B y C)).

Los resultados encontrados en la actividad fotosintética de las plantas de piña inoculadas con *A. chroococcum*, están en correspondencia con los incrementos significativos de las variables de crecimiento evaluadas y discutidas en el acápite 4.2. Además están relacionados con los incrementos en el contenido de sacarosa obtenidos en estas plantas, teniendo en cuenta que este carbohidrato es uno de los principales productos de la fotosíntesis.

Estos resultados indicaron que existió una mayor transpiración en las plantas inoculadas con el biofertilizante (Figura 21C). Se reconoce una gran transpiración cuticular de las plantas en la fase de aclimatización (Preece y Sutter, 1991). Sin embargo, en los resultados obtenidos en el grosor de la cutícula en las plantas inoculadas hubo un incremento en el grosor de esta estructura, lo que evita un exceso de transpiración cuticular en estas plantas. Por lo que en este caso el aumento de la transpiración podría estar relacionada con un incremento en la transpiración estomática la cual también pudo estar presente en esta especie vegetal. Si estas plantas desarrollan un metabolismo C₃, mantienen los estomas abiertos durante el día lo que favorece el proceso de transpiración. El incremento en el proceso de transpiración juega un papel importante en la asimilación de nutrientes, ya que origina una corriente transpiratoria que transporta los minerales y el agua desde las raíces hasta las partes aéreas en crecimiento. Por otra parte, constituye una vía de regulación térmica en las hojas ante la presencia de elevadas temperaturas y alta intensidad de luz (Sánchez-Díaz y Aguirreolea, 2000). En presencia de altas temperaturas los estomas pierden sensibilidad al CO₂ y se abren, lo que favorece la transpiración por su efecto refrigerante que evita efectos perjudiciales a las hojas por altas temperaturas (Barceló *et al.*, 1992).

En plantas, al obtener hojas con propiedades fotosintéticas más relevantes, este fenómeno influye en el crecimiento de las mismas, es decir, en el vigor que éstas son capaces de desarrollar y por consiguiente, en la adaptación a cualquier sustrato o tipo de suelo (Kishore *et al.*, 2005; Babalola, 2010).

Resultados en dos cultivares de tomate, dos de pimiento y dos de pepino (*Cucumis sativus*), en fase de semillero con el empleo del biofertilizante denominado Biostin, a base de la cepa INIFAT 12, se determinaron algunos mecanismos fisiológicos como fotosíntesis y respiración. De forma general, los resultados reflejaron que, independientemente de que las intensidades de estos

procesos fueron diferentes en cada uno de los cultivos, las sustancias asimiladas fueron utilizadas más eficientemente por las plantas inoculadas (Acosta *et al.*, 1994).

Un análisis general del efecto de *Azotobacter chroococcum* (cepa INIFAT 5) sobre el total de indicadores morfológicos, bioquímicos y fisiológicos estudiados, para conocer cuales ejercieron más influencia en el crecimiento de las plantas, se muestra en la Tabla 6 según el coeficiente de variación general. Los indicadores que mostraron la mayor influencia del efecto de la bacteria fueron la concentración de los aminoácidos Acido aspártico, Treonina, Glicina, Isoleucina, Fenilalanina y Prolina, los contenidos de Zn, K y Cu, así como la concentración de sacarosa y concentración de proteínas totales.

Los indicadores concentración de fructosa y glucosa, los aminoácidos Valina y Serina, los contenidos de P y Mg, clorofila b, fotosíntesis neta y transpiración total, mostraron efectos medios por parte de la bacteria. Los indicadores que menor influencia tuvieron fueron el grosor de la cutícula superior e inferior, grosor de la exodermis y epidermis, el grosor de la médula, el grosor de la mesodermis externa e interna, la hipodermis, el grosor del parénquima acuífero y el espesor de la hoja, el contenido de N, Ca, Fe y Mn el contenido de clorofila a y clorofilas totales, la fluorescencia del fotosistema II y el parénquima clorofílico.

Tabla 6. Análisis general de los cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos inducidos por *A. chroococum* (cepa INIFAT 5) teniendo en cuenta el coeficiente de variación general de cada indicador.

Indicador evaluado	Coef. Var. gral. (%)
D (mg.g MS ⁻¹)	141,42
T (mg.g MS ⁻¹)	141,42
Zinc (ppm)	141,42
I (mg.g MS ⁻¹)	141,42
G (mg.g MS ⁻¹)	141,42
F (mg.g MS ⁻¹)	141,42
P (mg.g MS ⁻¹)	141,42
Potasio (mg.gMS ⁻¹)	136,17
Sacarosa (mg.gMS ⁻¹)	104,58
Proteínas totales (mg.gMF ⁻¹)	101,85
Cobre (ppm)	101,02
Fósforo (mg.gMS ⁻¹)	94,28
Fructosa (mg.gMS ⁻¹)	91,39
V (mg.g MS ⁻¹)	89,04
S (mg.g MS ⁻¹)	84,85
Transpiración total (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	83,61
Clorofila <i>b</i> (mg.gMF ⁻¹)	81,00
Magnesio (mg.gMS ⁻¹)	60,61
Glucosa (mg.gMS ⁻¹)	53,93
Fotosíntesis neta (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	53,59
Cutícula inferior (μm)	42,31
Exodermis (μm)	39,37
Cutícula superior (μm)	39,15
Nitrógeno (mg.gMS ⁻¹)	38,57
Médula (μm)	33,17
Clorofilas totales (mg.gMF ⁻¹)	23,98
Mesodermis externa (μm)	23,44
Clorofila <i>a</i> (mg.gMF ⁻¹)	23,25
Mesodermis interna (μm)	22,99
Hipodermis (μm)	21,78
Epidermis (μm)	20,18
Fluorescencia (<i>Fm/Fv</i>)	14,03
Parénquima acuífero (μm)	12,85
Espesor hoja (μm)	6,45
Calcio (mg.gMS ⁻¹)	4,22
Manganeso (ppm)	3,68
Hierro (ppm)	2,52
Parénquima clorofílico (μm)	0,09

Un resumen de los cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos inducidos por *Azotobacter chroococcum* sobre el crecimiento de las plantas de piña en fase de aclimatización se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Resumen de los cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos inducidos con la inoculación de *Azotobacter chroococcum* (cepa INIFAT 5) sobre el crecimiento de plantas de piña en fase de aclimatización.

Indicadores incrementados por <i>A. chroococcum</i>	Indicadores no modificados por <i>A. chroococcum</i>
(34) -Grosor de estructuras anatómicas de la hoja (espesor de la hoja, cutículas superior e inferior, epidermis, hipodermis, parénquima acuífero) -Grosor de estructuras anatómicas de la raíz (exodermis, mesodermis externa e interna, endodermis, médula) -Contenido de minerales (N, P, K, Mg, Cu, Zn) -Concentración de Aminoácidos (D, T, I, G, F, P, V, S) -Proteínas totales -Azúcares totales (fructosa, glucosa, sacarosa) -Contenido de clorofilas (<i>a</i> , <i>b</i> y totales) -Fluorescencia máxima (<i>Fv/Fm</i>), Fotosíntesis neta, y transpiración total	(4) -Parénquima clorofílico -Contenido de minerales (Ca, Fe, Mn)

Fueron evaluados un total de 38 indicadores morfológicos, bioquímicos y fisiológicos, de los cuales la cepa INIFAT 5 indujo cambios significativos en 34 indicadores (89,47%) con respecto al testigo sin inocular. Los indicadores grosor del parénquima clorofílico, el contenido de Ca, Fe y Mn no fueron modificados por la acción de la bacteria. Estos análisis nos permiten mostrar el efecto que de forma global induce la cepa INIFAT 5 sobre el crecimiento de las plantas de piña. En la literatura se informa muy poco sobre el efecto de la aplicación de bacterias estimuladoras del crecimiento en la fase de aclimatización. Específicamente en el caso de las plantas de piña inoculadas con bacterias promotoras del crecimiento vegetal, no se conocen estudios que caractericen estos procesos descritos anteriormente, por ello estos resultados constituyen aspectos novedosos para este cultivo.

4.5 Análisis de factibilidad económica de la aplicación de *Azotobacter chroococcum* en la fase de aclimatización de plantas de piña

Como resultado de la aplicación de la cepa INIFAT 5 cada cuatro semanas y su estimulación en el incremento de la biomasa vegetal, se logró acortar el período de aclimatización de las plantas de seis a cuatro meses. Esto permitió el adelanto de la salida productiva de lotes de plantas, con el consiguiente efecto económico sobre los diferentes indicadores de costo que conforman la tecnología vigente para la obtención de plantas de piña (Yanes *et al.*, 2000). Según la Ficha de Costo para plantas de piña adaptadas en vasos plásticos y teniendo en cuenta la capacidad instalada capaz de producir 50 000 plantas en seis meses, esto conlleva a un costo total de \$73.348,15. El costo de producción de una planta de piña durante la fase de aclimatización (fase cuatro), representa un gasto de \$1,47 /unidad (Anexo 1).

Con el empleo de *A. chroococcum* (cepa INIFAT 5) y tomando en consideración solamente el acortamiento en dos meses de esta fase de aclimatización, los costos de producción se redujeron a un total de \$67.339,07 y \$1,35/unidad (Anexo 2). Como consecuencia de esta reducción se logra un ahorro de \$0,12 CUP por unidad y de \$6009,07 CUP en cada lote de plantas que se produce. Esto representa un ahorro de mano de obra, de importación y compra de fertilizantes, los cuales deben adquirirse en CUC, mientras que *A. chroococcum* se puede obtener en el laboratorio o comprar a nivel nacional a partir de la Red de Biofertilizantes del Ministerio de la Agricultura. Además se disminuyen los riegos programados, así como los gastos energéticos que el proceso requiere. Por otro lado, la reducción del tiempo de aclimatización de las plantas representa un ahorro no solo por concepto de tiempo e insumos, sino porque contribuye a la duplicación de la producción de plantas de piña/unidad de superficie/tiempo de explotación del sistema, lo que influye directamente en el aumento de la capacidad instalada del área de aclimatización y de la capacidad productiva. Esto repercute en mayores ganancias y un mayor volumen de plantas que son trasplantadas a la fase de campo, lo que contribuiría al incremento de las producciones del cultivo.

En adición a este efecto económico se encuentra el impacto ambiental que representa la aplicación de un producto biológico que no implica daños al ecosistema y que está en

correspondencia con el desarrollo de una agricultura sustentable con fuertes bases ecológicas (Dibut, 2005; Barua *et al.*, 2012).

La inoculación de *A. chroococcum* no solo disminuyó el tiempo de aclimatización de las plantas sino que influyó en su calidad como requisito para el posterior traslado al campo. En la Tabla 8 se muestra una comparación de los parámetros de calidad necesarios para el trasplante a campo de las plantas con la tecnología vigente de aclimatización y con la inoculación de la cepa INIFAT 5.

Existen varios reportes donde se manifiesta la importancia de reducir el tiempo de cosecha de los cultivos teniendo en cuenta el efecto económico que esto representa (Mehrvarz *et al.*, 2008; Zorita y Canigia, 2009; Dibut *et al.*, 2009.) Las plantas inoculadas lograron en menor tiempo superar los índices de calidad, lo que representa la ventaja (acortamiento del ciclo) lograda sobre el desarrollo normal del sistema existente de producción de plántulas.

En viandas tropicales, al bacterizar con el producto Dimargon[®], se logra un acortamiento en los cultivos al menos de siete días con igual período en cuanto al cierre de las plantaciones, lo que conlleva a un incremento del rendimiento entre 25-40% en yuca (*Manihot esculenta* Crantz.) y boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) (Dibut *et al.*, 2011).

Tabla 8. Comparación de los parámetros de calidad para el trasplante a campo de las plantas de piña con la tecnología de aclimatización vigente (Yanes *et al.*, 2000) y con la inoculación de *A. chroococcum* (cepa INIFAT 5).

Indicadores de calidad	TAV	TAA
Masa fresca (g)	13,00	19,52
Altura (cm)	23,91	37,70
Color verde	x	x
Listas para comercializar	6 meses	4 meses

TAV: Tecnología de aclimatización vigente (Yanes *et al.*, 2000)

TAA: Tecnología de aclimatización con la aplicación de *Azotobacter chroococcum* (este trabajo)

Bennett y Whipps (2008) mencionan que el establecimiento y aclimatización de plántulas provenientes de cultivo *in vitro* es una técnica que requiere diversos cuidados para disminuir los altos índices de mortalidad en la fase inicial de este proceso. Para mejorar el establecimiento y reducir la mortalidad de plántulas, realizaron una aplicación de cuatro microorganismos benéficos seleccionados (*Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Clonostachys pitiriasis* y *Trichoderma harzianum*) a las semillas de cebolla y zanahoria. Estos autores comprobaron que todos los microorganismos aplicados disminuyeron la mortalidad de las plántulas y estimularon el establecimiento en la fase de aclimatización.

En cualquier producción biotecnológica, aumentos superiores al 3 y 5% de unidades de venta representa un indicador altamente atractivo al evaluar el procedimiento productivo y la estrategia comercial de la tecnología que se transfiere (Sasson, 2000). Este objetivo generalmente se obtiene al introducir en el procedimiento tecnológico varios factores o insumos en función de aumentar la productividad.

La bacterización con Oniobiostin, producto a base de *A. chroococcum*, en posturas de cebolla permitió acortar la fase de semillero al obtener posturas aptas para el trasplante entre 7 y 10 días antes en comparación con las no inoculadas, con el consiguiente beneficio por concepto de ahorro de mano de obra, aplicación de pesticidas y riegos programados (Dibut, 2005). En la actualidad las empresas productoras demandan resultados de este tipo ya que pueden satisfacer a sus clientes con menos costos, en menor tiempo y manteniendo la calidad del material.

Según Velazco y Castro (2001), la tendencia mundial más que incrementar rendimiento agrícola en los cultivos es acortar el ciclo productivo, ya que representa mayores ganancias que obtener mayor cantidad de frutos cosechados. Por ejemplo, en Europa, Estados Unidos y Latinoamérica, llegar una o dos semanas antes de lo planificado al mercado, con volúmenes de productos agrícolas de alta calidad, se traduce en un cambio radical del precio de venta de estos productos y por tanto mayor recaudación de moneda.

El empleo de microorganismos biofertilizadores constituye una alternativa ecológica y eficiente para aumentar el material de plantación de piña. Con la reducción del tiempo de aclimatización disminuyen los costos y se incrementa el efecto económico teniendo en cuenta el acortamiento

del ciclo productivo, ahorro de mano de obra, de aplicación de insumos, disminución de riegos programados, entre otros.

En la Figura 22 se muestra un resumen de la metodología de micropropagación de la piña descrita por Daquinta y Benega (1997) y el trasplante a la fase de aclimatización según la tecnología de Yanes *et al.* (2000) y la inoculación de *A. chroococcum* cepa INIFAT 5 (I-5) aplicada en esta investigación. El material inicial para la obtención de explantes lo constituye la corona de las plantas adultas de piña a partir de la cual se extraen las yemas y transitan por diferentes fases para lograr la multiplicación de las plantas *in vitro*. Posteriormente, una vez alcanzado los requerimientos necesarios para su traslado a la fase de aclimatización, son transplantadas en vasos plásticos con sustrato Cachaza:SFR (1:1, v;v). En el momento de la siembra las plantas y el sustrato se inoculan por aspersión con la cepa INIFAT 5 de *A. chroococcum* con una frecuencia de aplicación cada cuatro semanas, durante 4 meses.

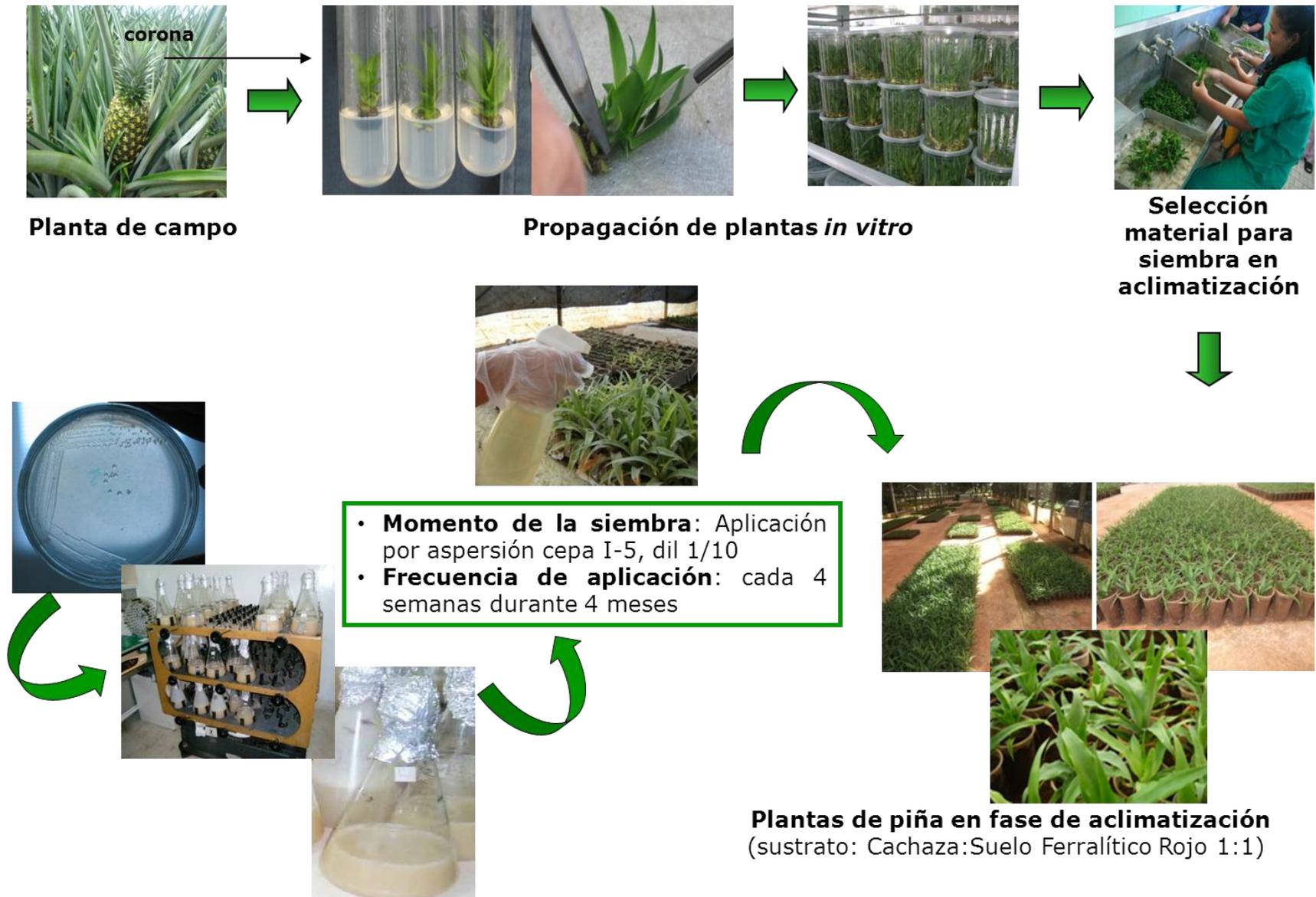


Figura 22. Resumen de la tecnología de micropropagación de plantas de piña *in vitro* y su posterior traslado a la fase de aclimatización con la inclusión de la aplicación de *A. chroococcum* (cepa INIFAT 5).

5. CONCLUSIONES

- 1) La cepa INIFAT 5 de *A. chroococcum*, con una frecuencia de aplicación cada cuatro semanas, resultó ser la más efectiva para la estimulación del crecimiento y calidad de las plantas de piña en fase de aclimatización.
- 2) La inoculación de *A. chroococcum* (cepa INIFAT 5) provocó cambios morfológicos favorables en las hojas y raíces de las plantas de piña, con un papel importante en el almacenamiento de agua y la absorción de nutrientes.
- 3) La cepa INIFAT 5 estimuló los niveles de diferentes indicadores bioquímicos y fisiológicos analizados, los cuales juegan un papel esencial en los procesos de asimilación de nutrientes, formación de fotosintatos y proteínas en las plantas.
- 4) El empleo de *A. chroococcum* (cepa INIFAT 5) en la tecnología de aclimatización de plantas de piña, permitió acortar a cuatro meses el período de aclimatización, redujo el costo de producción e incrementó la calidad de las plantas en esta fase.

6. RECOMENDACIONES

- 1) Determinar el perfil proteómico de las plantas inoculadas con *A. chroococcum* para caracterizar las proteínas inducidas y su papel en el metabolismo de las plantas.
- 2) Extender la aplicación del biofertilizante a partir de la cepa INIFAT 5 de *A. chroococcum* en la fase de aclimatización de la piña var. MD2.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acosta, M.C.; Martínez, R.; Dibut, B.; Pérez, D.; Antúnez, N.; Rodríguez, Y.; Pérez, M.; Rodríguez, Y. Modificación fisiológica en cultivos de interés económico inducidos por biofertilizantes a base de *Azotobacter chroococcum*. En Resúmenes VII Jornada Científica del INIFAT, MINAG: 106. 1994.
2. Adesemoye, A.; Kloepper, J. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology Biotechnology* 85: 1-12. 2009.
3. Ahmad, F.; Ahmad, I.; Khan, M.S. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and *fluorescent Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turkey Journal of Biology* 29: 29-34. 2005.
4. Ahmad, F.; Ahmad, I.; Khan, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163(2): 173-181. 2008.
5. Akin-Idowu, P.E.; Ibitoye, D.O.; Ademoyegun, O.T. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *African Journal of Biotechnology* 8(16): 3782-3788. 2009.
6. Altieri, M.A. Agroecología. Bases científicas para la Agricultura sustentable. CLADES, ACAO, La Habana. pp. 240. 1997.
7. Aquilanti, L.; Favilli, F.; Clementi, F. Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1475-1483. 2004.
8. Aragón, C.; Carvalho, L.; González, J.; Escalona, M.; Amancio, S. The physiology of *ex vitro* pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. *Plant Cell Report* 31: 757-769. 2012.
9. Aragón, C.E.; Escalona, M.; Capote, I.; Pina, D.; Cejas, I.; Rodríguez, R.; Cañal, M.J.; Sandoval, J.; Roels, S.; Debergh, P.; González-Olmedo, J.L. Photosynthesis and carbon metabolism in plantain (*Musa AAB*) growing in temporary immersion bioreactor (TIB) and *ex vitro* acclimatization. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 41(4): 550-554. 2005.
10. Arnon, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15. 1949.

11. Artursson, V.; Finlay, R.; Jansson, J. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8: 1-10. 2006.
12. Aseri, G.K.; Jain, N.; Panwar, J.; Rao, A.V.; Meghwal, P.R. Biofertilizers improve plant growth, fruit yield, nutrition, metabolism and rhizosphere enzyme activities of pomegranate (*Punica granatum* L.) in Indian Thar Desert. *Scientia Horticulturae* 117: 130-135. 2008.
13. Azcón, R.; Barea, J.M. Síntesis of auxins, gibberelins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* and *Azotobacter beijerinckii* related to effects produced on tomato plants. *Plant Soil* 43: 609-619. 1975.
14. Babalola, O.O. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letter* 32: 1559-1570. 2010.
15. Bahat-Samet, E.; Castro-Sowinski, S.; Okon, Y. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* 237: 195-198. 2004.
16. Bais, H.P.; Weir, T.L.; Perry, L.G.; Gilroy, S.; Vivanco, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 234-266. 2006.
17. Baldotto, L.E.B.; Baldotto, M.A.; Canellas, L.P.; Bressan-Smith, R.; Olivares, F.L. Growth promotion of pineapple 'vitória' by humic acids and *Burkholderia* spp. during acclimatization. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 34: 1593-1600. 2010a.
18. Baldotto, L. E. B.; Baldotto, M.A.; Olivares, F.L.; Viana, A.P.; Bressan-Smith, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira Ciência do Solo, Viçosa, MG* 34 (2): 349-360. 2010b.
19. Barboza, S.B.S.C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41: 185-194. 2006.
20. Barceló, J.C.; Rodrigo, G.N.; Sabater, B.G.; Sánchez, R.T. Fisiología vegetal. Editorial Pirámides, S.A.; Madrid. pp. 84-222. 1992.
21. Barea, J. M.; Ocampo, J. A.; Montoya, E. Estudio crítico sobre la utilización de *Azotobacter* y fosfobacterias como fertilizantes microbianos. *Anales de Edafología y Agrobiología*. XXXVI (11-12): 1197-1208. 1977.

22. Barriuso, J.; Solano, B.R.; Fray, R.G.; Camara, M.; Hartmann, A.; Manero, F.J.G. Transgenic tomato plants alter quórum sensing in plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Biotechnology Journal* 6(5): 442-452. 2008.
23. Bartholomew, D. MD2 pineapple transforms the world's pineapple fresh fruit export industry. *Pineappel News*: 2-5. 2009.
24. Bartholomew, D.; Paul, R.; Rohrbach, K. Crop environment, plant growth and physiology. En: Bartholomew D, Paul R, Rohrbach K (eds.) *The pineapple: botany, production and uses*. CABI Publishing, Wallingford, UK. pp. 69-108. 2003.
25. Barua, Sh.; Tripathi, S.; Chakraborty, A.; Ghosh, S.; Chakrabarti, K. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic bacterial isolates from coastal saline soils. *Microbiological Research* 167: 95-102. 2012.
26. Bashan, Y.; Holguín, G; Ferrera-Cerrato, R. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra* 14(2): 159-192. 1996.
27. Bauer, T. Microorganismos Fijadores de Nitrógeno: familia *Rhizobiaceae*. En: (<http://www.microbiologia.com.ar/suelo/rhizobium.html>). 2001. (Consultado 10 de enero 2005).
28. Bauer, W.D.; Mathesius, U. Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 429-433. 2004.
29. Becking, J. M. *Azotobacteriaceae*. En: R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (eds.) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th edition. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 253-261. 1974.
30. Benizri, E.; Amiaud, B. Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 2055-2064. 2005.
31. Bennett, A.J.; Whipps, J.M. Beneficial microorganism survival on seed, roots and in rhizosphere soil following application to seed during drum priming. *Biological Control* 44: 349-361. 2008.
32. Benton, J.J.; Wolf, B.; Mills, H.A. *Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide*. Micro-Macro Publishing, Athens, Georgia. pp. 864. 1991.
33. Berg, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology Biotechnology* 84: 11-18. 2009.

34. Berg, G.; Roskot, N.; Steidle, A.; Eberl, L.; Zock, A.; Smalla, K. Plant dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic Rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Applied Environmental Microbiology* 68: 3328-3338. 2002.
35. Berg, G.; Smalla, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 68: 1-13. 2009.
36. Bhat, J.B.; Limayen, E.S.; Vasantharajam, B.L. Ecology of the leaf surface microorganisms. pp. 322. 1971.
37. Bohlool, B.B., Ladha, J.K., Garrity, D.P.; George, T. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. *Plant and Soil* 1: 1-11. 1992.
38. Botella, J.R.; Fairbairn, D.J. Present and future potential of pineapple biotechnology. *Acta Horticulturae* 622: 23-28. 2005.
39. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254. 1976.
40. Brimecombe, J.M.; de Leij, F.A.; Lynch, J. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. En: Pinton, R.; Varanini, Z.; Nannipieri, P. (eds.) *The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker. New York. pp. 95-140. 2001.
41. Canbolat, M.Y.; Bilen, S.; Çakmakçı R.; Şahin F.; Aydın, A. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biol Fertil Soils* 42: 350-357. 2006.
42. Cano, M.A. Interacción de Microorganismos Benéficos en Plantas: Micorrizas, *Trichoderma* Spp. y *Pseudomonas* Spp. Una Revisión. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica* 14(2): 15-31. 2011.
43. Carvalho, L.C.; Osorio, M. L.; Chávez, M. M.; Amancio, S. Chlorophyll fluorescent as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and plantlets under *ex vitro* acclimatization. *Plant Cell and Organ Culture* 67: 271-280. 2001.
44. Cassán, F.; García-Salamone, I. *Azospirillum*: Cell physiology, plant response, agronomic and environmental research in Argentina. *Asociación Argentina de Microbiología*, Argentina. pp. 300. 2008.

45. Castellanos, J.C; Sardiñas, S.L. Estudios pedológicos de suelos ferralíticos rojos de la provincia de Ciego de Avila. Instituto de suelos, Ciego de Avila. 2012.
46. Castro-Sowinski, S.; Herschkovitz, Y.; Okon, Y.; Jurkevitch, E. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. FEMS Microbiology Letters 276: 1-11. 2007.
47. Chamizo, A.; Ferrera-Cerrato, R.; González-Chávez, M.C.; Ortiz-Solorio, C.A.; Santizo-Rincón, J.A.; Varela, I.; Alarcón, A. Inoculación de Alfalfa con hongos micorrízicos arbusculares y rizobacterias en dos tipos de suelo. Terra Latinoamericana 27: 197-205. 2009.
48. Chen, T.W. Development and application of biofertilizers in China. En: Biological Nitrogen Fixation. The Global Challenge and Future Needs. Roma. pp. 24-26. 1997.
49. Chiarini, L.; Giovannelli, V.; Bevivino, A.; Dalmastri, C.; Tabacchioni, S. Different portions of the maize root system host *Burkholderia cepacia* populations with different degrees of genetic polymorphism. Environmental Microbiology 2(1): 111-118. 2000.
50. Choure, K.; Dubey, R.C. Development of plant growth promoting microbial consortium based on interaction studies to reduce wilt incidence in *Cajanus cajan* L. Var. Manak World. Journal of Agricultural Sciences 8(1): 118-128. 2012.
51. Christopher, J.T.; Holtum, J.A.M. Carbohydrate partitioning in the leaves of Bromeliaceae performing C3 photosynthesis or *Crassulacean* acid metabolism. Australian Journal of Plant Physiology 25: 371-376. 1998.
52. Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Leal, F. Morphology, anatomy and taxonomy. En: Bartholomew D, Paul R, Rohrbach K (eds.) The pineapple: Botany, production and uses. CABI Publishing, Wallingford, UK: 13-32. 2003.
53. Córdova-Bautista, Y.; Rivera-Cruz, M.C.; Ferrera-Cerrato, R.; Obrador-Olán, J.J.; Córdova-Ávalos, V. Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Musa AAA Simmonds*) cultivar 'Gran enano' y su potencial para integrar un biofertilizante. 25(3): 253-265. 2009.
54. Corrales, I.; Guerra, A.; González, M.; López, P. Utilización de algunos biofertilizantes como alternativas en la fertilización mineral del guayabo en fase de vivero. Cultivos Tropicales 15(3): 5-10. 1994.
55. Coruzzi, G.; Last, R. Aminoacids. En: Buchanan, B.B; Gruissem, W.; Jones, R.L (eds.), Biochemistry and Molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologist, Rockville, Maryland, EU. pp. 358-410. 2000.

56. Costacurta, A. Genetic studies on the auxin hypothesis in the *Azospirillum*/plant inoculation. *Dissertationes de Agricultura* 275: 34-39. 1995.
57. Crestani, M.; Barbieri, R.L; Hawerth, F.J.; de Carvalho, F.I.F.; de Oliveira, A.C. From the Americas to the World, origin, domestication and dispersion of pineapple. *Ciência Rural*, Santa María 40(6): 1473-1483. 2010.
58. Cupull, R.S.; Cupull, M.C.S.; Sánchez, C.E.; Ortiz, A.A.; González, C.F.; Viva, M.F. Efecto de siete cepas de la familia *Azotobacteriaceae* en la producción de posturas de *Coffea arabica* L. *Centro Agrícola* 33(2): 5-9. 2006.
59. Cushman, J.; Tillet, R.; Wood, J.; Branco, M. Schlauch, K. Large scale mRNA expression profiling in the common ice plant, *Mesembryanthemum crystallinum*, performing C3 photosynthesis and Crassulacean acid metabolism, (CAM). *Journal of Experimental Botany* 59:1875-1894. 2008.
60. Daquinta, M.; Benega, R. Brief review of tissue culture in pineapple. *Pineapple News* 3(1): 7-9. 1997.
61. Dardanelli, M. S.; Fernández de Córdoba, F.J.; Rosario Espuny, M.; Rodríguez Carvajal, M. A.; Soria Díaz, M. E.; Gil Serrano, A. M.; Okon, Y.; Megias, M. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2713-2721. 2008.
62. Dary, B.; Desjardins, Y. Sucrose supply enhances phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro Solanum tuberosum* L. under non-limiting nitrogen conditions. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 37: 480-489. 2001.
63. Davey, M.; Sripaoraya, S.; Anthony, P.; Lowe, K.; Power, J. Biotechnology in agriculture and forestry. En: Pua, E.C., Davey, M.R. (eds.). *Transgenic Crops*. Berlin, Springer Verlag. pp. 97-127. 2007.
64. Day, D.; Copeland, L. Respiración En: Azcon-Bieto, J.; Talón, M. (eds.), *Fisiología y bioquímica vegetal*, McGraw-Hill Interamericana de España. pp. 173-213. 1993.
65. De Salmone, I.E.G.; Hynes, R.K.; Nelson, L.M. Cytoquinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology* 47(5): 404-411. 2001.
66. Debinstein, J.A. Tropical rain forest. John Wiley and sons (eds.), Nueva York. pp. 230. 1970.
67. Demir Y.; Ozturk, L. Influence of ethephon and 2,5 norbornadiene on antioxidative enzymes and proline content in salt stressed spinach leaves. *Biologia Plantarum* 47: 609-612. 2003.

68. Devlin, R.M. Fisiología vegetal. Editorial Pueblo y Educación, C. de la Habana, Cuba. pp. 280-294. 1982.
69. Dibut, B.; Fernández, F.; Martínez, R.; Rivera, R.; Martínez, A.; Medina, N.; Bach, T.; Hernández, G. Establecimiento y desarrollo en Cuba de la Red Nacional de Biofertilizantes. *Revista Agrotecnia de Cuba* 35(2): 7-12. 2011.
70. Dibut, A.B.; Martínez-Viera, R.; Ortega, M.; Ríos, Y.; Tejeda, G.; Planas, L.; Rodríguez, J. Situación actual y perspectiva de las relaciones endófitas planta-bacteria. Estudio de caso *Gluconacetobacter diazotrophicus* en cultivos de importancia económica. *Cultivos Tropicales* 30(4): 16-23. 2009.
71. Dibut, A.B. Biofertilizantes como insumos en Agricultura sostenible: HUMIWORM S.P.R. de R.L., México. pp. 94-98. 2005.
72. Dibut, A.B. Obtención de un bioestimulador del crecimiento y el rendimiento vegetal para el beneficio de la cebolla (*Allium cepa* L.). Tesis de Doctor en Ciencias Agrícolas, Ministerio de la Agricultura, La Habana, Cuba. pp.104. 2000.
73. Dibut, B.; Acosta, M.C.; Martínez, R.; Ljingsgren, H. Producción de aminoácidos y citoquininas por una cepa cubana de *Azotobacter chroococcum*. *Cultivos Tropicales* 16(1): 16-18. 1995.
74. Dibut, A.B.; Crespo, O.; Gárciga, M.J. Norma Cubana de especificaciones de calidad para biopreparados a base de *Azotobacter* spp. Comité Estatal de Normalización. Biotecnología agrícola I, NC 7201. pp. 11. 1992.
75. Dibut, B.A; Martínez, R.V.; González, R.P.; Delgado, E.; Martín, B.R. Evaluación de cepas de *Azotobacter chroococcum* aisladas de distintos suelos de Cuba. *Actividad estimuladora del crecimiento de plántulas de tomate. Ciencias de la Agricultura* (40): 11-16. 1990.
76. Dobbelaere, S.; Okon, Y. The plant growth-promoting effect and plant responses. En Elmerich, C.; Newton, W.E. (eds.) "Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations". Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 145-170. 2007.
77. Dobbelaere, S; Vanderleyden, J.; Okon, Y. Plant growth promoting effects of diazotrophs in rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* 22(2): 107-149. 2003.
78. Echegaray, A. Ciclo del nitrógeno y fases que lo constituyen. *Agromicrobiología*. Montecillo, México. pp. 7-35. 1995.
79. Egamberdiyeva, D. Plant growth promoting properties of rhizobacteria isolated from wheat and pea grown in loamy sand soil. *Turkey Journal of Biology* 32(1): 9-15. 2008.

80. Ehlers, R.U. Einsatz der Biotechnologie im biologischen Pflanzenschutz. Schr.reihe Dtsch Phytomed Ges 8: 17-31. 2006.
81. Elmerich, C. Historical perspective: From bacterization to endophytes. En Elmerich, C.; Newton, W.E. (eds.) "Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations". Springer, Dordrecht, Holanda. pp. 1-20. 2007.
82. Escalona, M.; Lorenzo, J.C.; González, B.; Daquinta, M.; González, J.; Desjardins, Y.; Borroto, C.G. Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) micropropagation in temporary immersion system. Plant Cell Report 18(9): 743-748. 1999.
83. Espírito do Santo, A.; Pugialli, H.R.L. Estudo da plasticidade anatômica foliar de *Stromanthe thalia* (Vell.) J.M.A. Braga (*Marantaceae*) em dois ambientes de Mata Atlântica. Rodriguésia 50: 107-122. 1998.
84. FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations) FAO Statistic División. <http://faostat.fao.org.>: 567. Consultado 4 de Marzo de 2013. 2011.
85. Firoozabady, E.; Heckert, M.; Gutterson, N. Transformation and regeneration of pineapple. Plant Cell Report 84: 1-16. 2006.
86. Frobisher, M. Microbiología. Ciencia y Técnica (ed), La Habana, Cuba. pp. 743-744. 1969.
87. Gangopadhyay, G.; Kanti Roy, S.; Mukherjee, K.K. Plant response to alternative matrices for *in vitro* root induction. African Journal of Biotechnology 8(13): 2923-2928. 2009.
88. García, M.; Farias, R.; Peña, J.; Sánchez, J. Inoculation of Wheat var. Pavon with *Azospirillum* spp. and *Azotobacter beijerinckii*. Terra Latinoamericana 23(1): 65-72. 2005.
89. Garg, S.; Bhatnagar, A.; Kalla, A.; Narula, N. *In vitro* nitrogen fixation, phosphate solubilization, survival and nutrient release by *Azotobacter* strains in an aquatic system. Bioresearch Technology 80: 101-109. 2001.
90. George, M.A. Plant tissue culture procedure. Background. En: Edwin F.; George, M.A.; Hall, de Klerk, G-J. (eds.) Plant propagation by tissue culture. The background, Springer, Dordrecht, Holanda: 1-28. 2008.
91. Glick, B.R.; Todorovic, B.; Czarny, J.; Cheng, Z.; Duan, J.; McConkey, B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. Critical Review Plant Science 26: 227-242. 2007.
92. Goldstein, A.H. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. Biological Agriculture and Horticulture 12: 185-193. 1995.

93. Gómez-Lim, M.A.; Litz, R.E. Genetic transformation of perennial tropical fruits. *In Vitro Cellular Development of Biology-Plant* 40: 442-449. 2004.
94. González, R.; Domínguez, Q.; Expósito, L.A.; González, J.L.; Martínez, T.; Hidalgo, M. Effectiveness of eight strains of *Azotobacter* in the adaptation of pineapple plants cv. Smooth Cayenne. *Acta Horticulturae* 425: 204-207. 1997.
95. González-Olmedo, J.; Fundora, Z.; Molina, L.; Abdulnour, J.; Desjardins, Y.; Escalona, M. New contributions to propagation of pineapple (*Ananas Comosus* L. Merr) in Temporary Immersion Bioreactors. *In Vitro Cellular Development of Biology-Plant* 41: 87-90. 2005.
96. Govedarica, M.; Miliv, V.; Gvozdenovic, Dj. Efficiency of the association between *Azotobacter chroococcum* and some tomato varieties. *Soil plant* 42: 113-120. 1993.
97. Haas, D.; Défago, G. Biological control of soil-borne pathogens by *fluorescent Pseudomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 3: 307-319. 2005.
98. Hameedaa, B.; Harinib, G.; Rupelab, O.P.; Wanib, S.P.; Reddy, G. Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research* 163: 234-242. 2008.
99. Hardy, R.W.F.; Eaglesham, A.R.S. Ecology and agricultural applications of nitrogen-fixing system: overview. En: *Nitrogen fixation: fundamentals and applications*, Kluwer Academic Publishers, Holland. pp. 619-623. 1996.
100. Hartmann, A.; Lemanceau, P.; Prosser, J.I. Multitrophic interactions in the rhizosphere. *Rhizosphere microbiology: at the interface of many disciplines and expertise*. FEMS *Microbiology Ecology* 65: 179-180. 2008.
101. Hazarika, B. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science* 85: 1704-1712. 2003.
102. Hepton, A.; Ingamells, L.; Macion, E.; González, J.; Sampongse, D. Pineapple plant and fruit growth and development in fertilized native soil and artificial root medium. *Acta Horticulturae*: 131-139. 1993.
103. Hernández, A.; Pérez, J.; Bosch, D.; Rivero, L. Nueva Versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. Editorial AGRINFOR. Educación, La Habana. pp. 64-71. 1999.
104. Hernández, A.; Caballero, A.; Hofte, M.; Heydrich, M. Rizobacterias asociadas al maíz y su aplicación en la agricultura. *Contribución a la educación y la protección ambiental* 3. ISBN 959-7136-13-9. 2002.

105. Hernández, A.A.; Muíño, B.L.; Rosón, C.; Casola, C.; Porras, A.; López, A. Control químico de patógenos fúngos en piña de vivero. *Fitosanidad* 14(1): 31-37. 2010.
106. Hernández, A.R.; Heydrich, M.P.; Velásquez, V.M.G.V; Hernández, A.N.L. Perspectivas del empleo de rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(001): 42-29. 2006.
107. Hernández, M.; Pereira, M.; Tang, M. Utilización de microorganismos biofertilizantes en los cultivos tropicales. *Pastos y Forrajes* 17(3): 183-192. 1994.
108. Herrera, R.A. Estrategia de funcionamiento de las micorrizas (VA) en un bosque tropical. *Biodiversidad en Iberoamérica: Ecosistemas, evaluación y proceso social* En: Maximina Monasterio, (ed) Programa iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el desarrollo. Sub programa XII, Diversidad Biológica, Mérida: 201-205. 1998.
109. Hiltner L. Über neuerer erfahrung und problem auf dem gebeit der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksinchtigung der grundungung und brache. *Arbeiten Deutscher Landwirtschafts Gesellschaft*. 98: 59-78. 1904.
110. Holmstrom, K.O.; Somersalo, S.; Mandal, A.; Palva, T.E.; Welin, B. Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of Experimental Botany* 51: 177-185. 2000.
111. Holtum, J.A.M.; Smith, J.A.C.; Neuhaus, H.E. Intracellular transport and pathways of carbon flow in plants with crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology* 32: 429-449. 2005.
112. Hoque, M.A.; Okuma, E.; Banu, M.N.A.; Nakamura, Y.; Shimoishi, Y.; Murata, Y. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *Journal of Plant Physiology* 164: 553-561. 2007.
113. Hussain, A.; Qarshi, I.A.; Nazir, H.; Ullah, I. Plant tissue culture: Current status and opportunities En: Leva, A.; Rinaldi, L.M.R. (eds.) *Recent Advances in plant in vitro culture*. pp. 1-28. 2012.
114. Hynes, R.K.; Leung, G.C.Y.; Hirkala, D.L.M.; Nelson, L.M. Isolation, selection, and characterization of beneficial rhizobacteria from pea, lentil, and chickpea grown in western Canada. *Canadian Journal of Microbiology* 54(4): 248-258. 2008.
115. Instructivo técnico para el cultivo de la piña. Instituto de Investigaciones en Fruticultura tropical (IIFT), 1^{ra} Edición. pp. 2-3. 2011.

116. Izaguirre-Mayoral, M.L.; Labandera, C.; Sanjuan, J. Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial En: Izaguirre- Mayoral, M.L.; Labandera, C.; Sanjuán, J. (eds.). Editorial Universitaria, Ciudad de La Habana. pp. 3. 2008.
117. Izquierdo, J.L.; de García, E. Biotecnología apropiable: Racionalidad de su desarrollo y aplicación en América Latina y el Caribe, FAO, Santiago de Chile: 80. 1995.
118. Jha, B.; Thakur, M.C.; Gontia, I.; Albrecht, V.; Stoffels, M.; Schmid, M.; Hartmann, A. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. *European Journal of Soil Biology* 45(1): 62-72. 2009.
119. Johansen, D.A. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book, New York. pp. 528. 1940.
120. José, M.; Ludevid, M.D.; Puigdomenech, P. Control de la expresion génica. Las proteínas ricas en prolina como ejemplo de regulación y transporte En: Azcon-Bieto, J.; Talón, M. (eds.), *Fisiología y bioquímica vegetal*, McGraw-Hill Interamericana de España.pp. 521-535.1993.
121. Jousset, A.; Lara, E.; Wall, L.G.; Valverde, C. Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Applied Environmental Microbiology* 72: 7083-7090. 2006.
122. Kamilova, F.; Kravchenko, L.V.; Shaposhnikov, A.I.; Azarova, T.; Makarova, N.; Lugtenberg, B. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stone wool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant Microbe Interaction* 19(3): 250-256. 2006.
123. Kenyon, W.H.; Severson, R.F.; Black, C.C. Maintenance carbon cycle in crassulacean acid metabolism leaves. *Plant Physiology* 77: 183-189. 1985.
124. Keys, A.J.; Bird, I.F.; Cornelius, M.J.; Lea, P.J.; Wallsgrave, R.M.; Mifflin, B.J. The photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* 275: 741-743.1978.
125. Khosravi, H.; Samar, S.M.; Fallahi, E.; Davoodi, H.; Shahabian, M. Inoculation of 'Golden Delicious' Apple Trees on M9 Rootstock with *Azotobacter* Improves Nutrient Uptake and Growth Indices. *Journal of Plant Nutrition* 32(6): 946-953. 2009.
126. Kim, K.Y.; Jordan, D.; Krishnan, H.B. *Rahnella aqualitis*, a bacteria isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiology Letters* 153: 273-277. 1997.
127. Kishore, G.K.; Pandezand, S.; Podile, A.R. Phylloplane bacteria increase seedling emergence, growth and yield of field-grown groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Letters in Applied Microbiology* 40: 260-268. 2005.

128. Kloepper, J.W.; Gutierrez-Estrada, A.; McInroy, J.A. Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 159-167. 2007.
129. Koehler, L.H. Differentiation of carbohydrates by anthrone reaction rate and color intensity. *Analytical Chemistry* 24: 1576. 1952.
130. Kumar, V.; Singh, K. Enriching vermicompost by nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Bioresource Technology* 76: 173-175. 2001.
131. Kuzyakov, Y. Review: Factors affecting rhizosphere priming effects. *Plant Nutrition of Soil Science* 165: 382-396. 2002.
132. Kvet, J.; Ondok, P.; Necas, J.; Jarvis, P.G. Plant photosynthetic reproduction. Manual of methods. En: Junk, W. (ed) *Methods of Growth Analysis*. Netherlands. pp. 343-384. 1991.
133. Larcher, W. *Ecofisiología vegetal*. Editorial Rima Artes e Textos, São Carlos, Brasil. pp. 531. 2000.
134. Laynez, J.A.G. Respuesta de *Phaseolus vulgaris* a rizobacterias promotoras del crecimiento y resistencia inducida a *Xanthomonas campestris*. *Saber*, Universidad de Oriente, Venezuela. 20(2): 131-138. 2008.
135. Leal, F.; Coppens d'Eeckenbrugge, G. Pineapple En: Janick, J.; Moore, J.N. (eds.) *Fruit Breeding*. John Wiley and Sons, New York. pp. 565-606. 1996.
136. Leungvutiviroj, C.; Ruangphisarn, P.; Hansanimitkul, P.; Shinkawa, H.; Sasaki, K. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N₂ fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 74: 1098-1101. 2010.
137. Lichtenthaler, K.H.; Riderle, U. The role of the chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 19: S29-S85. 1988.
138. Loper, J.E.; Kobayashi, D.Y.; Paulsen, I.T. The genomic sequence of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: insights into biological control. *Phytopathology* 97: 233-238. 2007.
139. Loredó-Osti, C.; López-Reyes, L.; Espinosa-Victoria, D. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión *Terra Latinoamericana* 22(2): 225-239. 2004.
140. Lucy, M.; Reed, E.; Glick, B.R. Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of General and Molecular Microbiology* 86: 1-25. 2004.

141. Lugtenberg, B.J.J.; Chin-A-Woeng, T.F.C.; Bloemberg, G.V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Journal of General and Molecular Microbiology* 81: 373-383. 2002.
142. Lynch, J. M. Microbial metabolites. The rhizosphere. En: Lynch, J.M., (ed) John Wiley and Sons, New York. pp. 317-358. 1990.
143. Madison, M. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. *Selbyana* 2: 1-13. 1977.
144. Maggio, A.; Miyazaki, S.; Veronese, P.; Fujita, T.; Ibeas, J.I.; Damsz, B.; Narasimhan, M.L.; Hasegawa, P.M.; Joly, R.J.; Bressan, R.A. Does proline accumulation play an active role in stress induced growth reduction?. *Plant Journal* 31: 699-712. 2003.
145. Majada, J.P.; Sierra, M.I.; Sanchez-Tames, R. Air exchange rate affects the *in vitro* developer leaf cuticle of carnation. *Scientia Horticulturae* 87: 121-130. 2001.
146. Malézieux, E.; Bartholomew, D.P. Plant Nutrition, En: Bartholomew, D.P; Paull, R.E.; Rohrbach, K.G. (eds.) *The Pineapple Botany, Production and Uses*; CABI Publishing, Wallingford, UK. pp. 143-165. 2003.
147. Malkin, R.; Niyogi, K. Photosynthesis. En: Buchanan, B.B; Gruissem, W.; Jones, R.L (eds.), *Biochemistry and Molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologist, Rockville, Maryland, EU. pp. 568-629. 2000.
148. Margallo, L.; Martín, A.; Nogueira, C. Biotecnología en la Agricultura. Disponible en: <http://webcd.usal.es/web/transgen00/otrdoc/pgpr/trabajo_pgpr.htm> 2001. Consultado el 12 de diciembre 2001. 2001.
149. Martínez, A.; Chang, I.; Alemán, I. Caracterización biológica de los principales suelos de Cuba. IV. Fijadores asimbióticos de N₂ atmosférico. *Ciencia de la Agricultura* 25: 77-86. 1985.
150. Martínez, V.R.; Dibut, A.B. Estimulación del desarrollo de las plantas. En: *Biofertilizantes bacterianos*. Editorial Científico-Técnica, La Habana. pp.212-229. 2012.
151. Martínez, V.R.; Dibut, A.B.; Ríos, R.Y. Efecto de la integración de aplicaciones agrícolas de biofertilizantes y fertilizantes minerales en la relación suelo-planta. *Cultivos tropicales* 31(1): 27-31. 2011.
152. Martínez, V.R.; Dibut, A.B.; Casanova, I.; Ortega, M. Acción estimuladora de *Azotobacter chroococcum* sobre el cultivo del tomate en suelos Ferralítico Rojo. I. Efecto sobre los semilleros. *Agrotecnia de Cuba* 27(1): 23-26. 1997.

153. Martínez-Viveros, O.; Jorquera, M.A.; Crowley, D.E.; Gajardo, G.; Mora, M.L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 10(3): 293-319. 2010.
154. Maynard, D.N.; Hochmuth, G.J. Knott's handbook for vegetable growers. Wiley, Hoboken, New Jersey. pp. 65-68. 2007.
155. McClelland, M.T.; Smith, M.A.L.; Carothers, Z.B. The effects of *in vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in tree woody plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 23: 115-123. 1990.
156. Medrano, H.; Flexas, J. Fotorrespiración y mecanismos de concentración del CO₂ En: Azcon-Bieto, J.; Talón, M. (eds.), *Fundamentos de Fisiología vegetal*, McGraw-Hill Interamericana de España. pp. 187-201. 2000.
157. Mehrvarz, S.; Chaichi, M.R.; Alikhani, H.A. Effects of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on yield and yield components of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science* 3 (6): 822-828. 2008.
158. Mettingm, F.B. Soil microbial ecology application in agricultural and Environmental Management. Marcel Dekker Ink, Nueva York: 450. 1993.
159. Mhatre, M. Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits Micropropagation of pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr, Part 3. pp. 499-508. 2007.
160. Miller, L.D.; Russell, M.H.; Alexandre, G. Diversity in bacterial chemotactic responses and niche adaptation. *Advances in Applied Microbiology* 66: 53-75. 2009.
161. Mishustin, E.N.; Silnikova, E.K. Biological fixation of atmospheric nitrogen. En: Mc. Millan (ed), Londres. pp. 675-677. 1971.
162. Moirrissey, J.P.; Dow, J.M.; Mark, L.; O'Gara, F. Are microbes at the root of a solution to world food production?. *EMBO Reports* 5: 922-926. 2004.
163. Moreira, M.A. Respostas à adubação NPK de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola em fase de aclimatização. *Plant Cell Culture and Micropropagation* 3(1): 17-22. 2007.
164. Müller, H.; Westendorf, C.; Leitner, E.; Chernin, L.; Riedel, K.; Schmidt, S.; Eberl, L.; Berg, G. Quorum-sensing effects in the antagonistic rhizosphere bacterium *Serratia plymuthica* HRO-C48. *FEMS Microbiology Ecology* 67: 468-467. 2009.
165. Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497. 1962.

166. Narula, N.A.; Deubel, W.; Gans, R.K.; Behl, W. Merbach. Paranodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. *Plant Soil and Environment* 52: 119-129. 2006.
167. Noval, B.M.; Fernández, F.; Herrera, R. Efecto del uso de micorriza arbuscular y combinaciones de sustrato sobre el crecimiento y desarrollo de vitroplantas de piña. *Cultivos Tropicales* 16(1): 19-22. 1995.
168. Novo, S.; Fernández, C. Vida microbiana en el suelo II. Instituto Cubano del libro, Cuba. pp. 74-76. 1988.
169. Owen, A.; Jones, D. Competition for amonio acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amonio acids in plant N acquisition. *Soil Biology and Biochemistry* 33(4-5):651-657. 2001.
170. Pazos, M.; Hernández, A. Evaluación de cepas nativas del género *Azospirillum* y su interacción con el cultivo del arroz. *Cultivos Tropicales* 22(4): 25-28. 2001.
171. Pérez, C. Técnicas estadísticas con SPSS 12. Aplicaciones al análisis de datos. Pearson Educación S. A., España. pp. 10-85. 2005.
172. Pérez, J.; Casas, M. Estudio de la interacción planta-*Azospirillum* en el cultivo de caña de azúcar (*Saccharum spp.*). *Cultivos tropicales* 26(4):13-19. 2005.
173. Piceno, Y.M.; Lowell, C.R. Stability in natural bacterial communities. Nutrients addition effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition. *Microbial Ecology* 39(1):32-40. 2000.
174. Preece, J.E.; Sutter, E.G. Acclimatization in micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Deberg, P.C.; Zimmerman, R.H. (eds.). *Micropropagation. Technology and application*. Kluwer Academic Publishers, Holanda. pp. 71-93. 1991.
175. Puertas, A.; González, L.M. Aislamiento de cepas nativas de *Azotobacter chroococcum* en la provincia de Granma y evaluación de la actividad estimuladora en plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Cultivos Tropicales* 20(2): 5. 1999.
176. Pulido, L.; Medina, N.; Cabrera, A. La biofertilización con rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de posturas de tomate y cebolla.1. Crecimiento vegetativo. *Cultivos Tropicales* 24(1): 45-50. 2003.
177. Py, C.; Lacoeuilhe, J.J.; Teisson, C. The pineapple: cultivation and uses. *Techniques agricoles et productions tropicales*. Maisonneuve & Larose; Paris. pp. 39-67. 1987.

178. Raaijmakers, J.M.; Paulitz, C.T.; Steinberg, C.; Alabouvette, C.; Moenne-Loccoz, Y. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* DOI: 10.1007/s11104-008-9568-6. 2009.
179. Rai, V.K. Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum* 45: 481-487. 2002.
180. Rasche, F.; Velvis, H.; Zachow, C.; Berg, G.; Van Elsas, J.D.; Sessitsch, A. Impact of transgenic potatoes expressing antibacterial agents on bacterial endophytes is comparable to effects of soil, wildtype potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 555-566. 2006.
181. Read, P. Micropropagation: Past, present and future. *Acta Horticulturae* 748: 17-28. 2007.
182. Rebolledo-Martínez, L.; Ruiz-Posadas, M.; Becerril-Román, A.E.; Mosqueda-Vázquez, R.; Castillo-Morales, A.; Rebolledo-Martínez, L.; Uriza-Ávila, D. Algunas características fisiológicas de tres cultivares de piña en dos sistemas de producción. *Revista Chapingo serie horticultura* 8(2): 235-249. 2002.
183. Reis, V.M.; Baldani, J.; Baldani, V.L.; Dobereiner, J. Biological dinitrogen fixation in Gramineae and palm trees. *Critical Review of Plant Science* 19(3): 227-247. 2000.
184. Rekha, P.D.; Lai, W.A.; Arun, A.B.; Young, C.C. Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pgl04 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresources Technology* 98: 447-51. 2007.
185. Remans, R.; Ramaekers, L.; Schelkens, S.; Hernández, G.; García, A.; Reyes, J.L.; Mendez, N.; Toscano, V.; Mulling, M.; Galvez, L.; Vanderleyden, J. Effect of *Rhizobium-Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant and Soil* 312: 25-37. 2008.
186. Reuter, D.J.; Robinson, J.B.; Peverill, K.I.; Price, G.H. Guidelines for collecting, handling and analyzing plant materials. En: Reuter, D.J.; Robinson, J.B. (eds.) *Plant analysis. An interpretation manual*. Inkata Press, Sidney-Melbournes, Australia. pp. 20-33. 1986.
187. Ribaudó, C.; Krumpholz, E.; Cassán, F.; Bottini, R.; Cantore, M.; Curá, A. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *Journal of Plant Growth Regulator* 24: 175-185. 2006.

188. Riggs, P.J.; Chehous, M.K.; Iniguez, A.L.; Kaepffer, S.M.; Triblett, E.W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Australian Journal of Plant Physiology* 28(9): 829-836. 2001.
189. Ríos, Y.; Dibut, B. Revisión bibliográfica: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, un microorganismo promisorio en la elaboración de biopreparados. *Cultivos tropicales* 28(4): 19-24. 2007.
190. Rives, N.; Acebo, Y.; Almaguer, M.; García, J.C.; Hernández, A. Actividad antagónica frente a *Pyricularia grisea* (Sacc.) y fitoestimulación en el cultivo del arroz de cepas autóctonas de *Pseudomonas putida* (Trev.). *Protección vegetal* 24(2): 106-116. 2009.
191. Rodelas, M.B. Interacción *Rhizobium-Azospirillum* y *Rhizobium-Azotobacter*. Efecto sobre la nodulación y fijación simbiótica del dinitrógeno en *Vicia faba*. En: (<http://193.146.205.198/sefin/Ecologia/Rodelas.html>). Consultado el 10 de Marzo 2006. 2001.
192. Rodríguez, A.D.; Farrés, E.A.; Placeres, J.G.; Peña, O.; Fornaris, L.M.; Mullen, L. Manejo del cultivo de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) cv. Española Roja, en Cuba. *Revista CitriFrut* 26(2): 71-75. 2009.
193. Rodríguez, M.I.; Terry E.; Núñez, M.; Pino, M.A.; Medina, N. Efectividad de la combinación biofertilizantes-brasinoestroides en la nutrición del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Cultivos tropicales* 22(2): 59-65. 2001.
194. Rodríguez, R.; Cid, M.; Pina, D.; González-Olmedo, J.L.; Desjardins, Y. Growth and Photosynthetic activity during acclimatization in sugarcane plantlets cultivated in Temporary Immersion Bioreactors. *In Vitro Cellular Development Biology-Plant* 39(6): 657-662. 2003.
195. Rodríguez, Y.; Quiñones, Y.; Hernández, M.M. Efecto de la inoculación con tres cepas de hongos micorrízicos arbusculares sobre la aclimatización de vitroplantas de papa (*Solanum tuberosum*). *Cultivos tropicales* 27(1): 19-24. 2006.
196. Rohrbach, K.; Johnson, M. Pest, diseases and weeds. En: Bartholomew, D.; Paull, R.E.; Rohrbach, K.G. (eds.). En: *The Pineapple Botany, Production and Uses*, CABI Publishing, Wallingford, UK. pp. 503-509. 2003.
197. Rohrbach, K.G.; Leal, F.; Coppens d'Eeckenbrugge, G. History, distribution and world production En: Bartholomew, D.P; Paull, R.E.; Rohrbach, K.G.(eds.) *The Pineapple Botany, Production and Uses*; CABI Publishing, Wallingford, UK. pp. 1-12. 2003.

198. Rubenchick, L.I. *Azotobacter* and its use in agriculture. The National Science Foundation, Washington D.C.US Dept. of commerce, Washington pp. 113-114. 1960.
199. Ryan, R.P.; Monchy, S.; Cardinale, M.; Taghavi, S.; Crossman, L.; Avison, M.B.; Berg, G.; van der Lelie, D.; Dow, J.M. Versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Natural Microbiology Review* 7: 514-525. 2009.
200. Ryu, C.M.; Murphy, J.F.; Reddy, M.S.; Kloepper, J.W. A two-strain mixture of rhizobacteria elicits induction of systemic resistance against *Pseudomonas syringae* and Cucumber mosaic virus coupled to promotion of plant growth on *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Microbiology Biotechnology* 17: 280-286. 2007.
201. Salisbury, F.B.; Ross, C.L. *Fisiología vegetal*. Editorial Iberoamérica SA, España. pp. 216. 1994.
202. Samiran, S.G.; Santi, M.M.; Bikas R.P. Impact of *Azotobacter* exopolysaccharides on sustainable agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95(2): 331-338. 2012.
203. Sánchez-Díaz, M.; Aguirreolea, J. Movimientos estomáticos y transpiración. En: Azcon-Bieto, J.; Talón, M. (eds.), *Fundamentos de Fisiología vegetal*, McGraw-Hill Interamericana de España.pp. 31-43. 2000.
204. Sarić, M.R.; Sarić, Z.; Govedarica, M. Variability of molecular nitrogen fixation and its dependence on plant genotype and diazotroph strains. En: El Bassam N. (ed), *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition*. Kluwer Academic Publisher, Netherlands. pp. 373-379. 1990.
205. Sasson, A. La contribución de las biotecnologías a la alimentación. *Biotecnología aplicada* 17(1): 2-6. 2000.
206. Shahab, S.; Ahmed, N.; Khan, N.S. Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. *African Journal of Agricultural Research* 4(11): 1312-6. 2009.
207. Shaharooma, B.; Naveed, M.; Arshad, M.; Zahir, Z.A. Fertilizer-dependent efficiency. of Pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency (*Triticum aestivum* L.). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79: 147-155. 2008.
208. Sheng, X.F.; He, L.Y. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 52: 66-72. 2006.

209. Singh, R.; Behl, R.K.; Singh, K.P.; Jain, P.; Narula, N. Performance and gene effects for wheat yield under inoculation of Arbuscular Mycorrhiza fungi and *Azotobacter chroococcum*. *Plant Soil Environmental* 50: 409-415. 2004.
210. Smalla, K.; Sessitsch, A.; Hartmann, A. The rhizosphere: soil compartment influenced by the root'. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 165. 2006.
211. Sopia, E.Y.; Hilaire, T.K.; Kone, M.; Yatty, J.K.; Kouame, P.; Merillon, J.M. Regeneration of pineapple (*Ananas comosus* L.) plant through somatic embryogenesis. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 20(2): 196-204. 2011.
212. Souza, E.E.; Barboza, S.B.S.C.; Souza, L.A.C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimatização de plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr) cv. Pérola. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 31(2): 147-151. 2001.
213. Souza, F.V.D.; Cabral, J.R.S.; de Souza, E.H.; Santos, O.S.N.; Ferreira, F.R. Evaluation of F1 hybrids between *Ananas comosus* var. ananassoides and *Ananas comosus* var. erectifolius. *Acta Horticulturae* 822: 79-84. 2009.
214. Spaepen, S., Vanderleyden, J.; Remans, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* 31: 425-448. 2007.
215. Spaepen, S.; Vanderleyden, J.; Okon, Y. Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. *Advances in Botanical Research* 51: 285-286. 2009.
216. Sripaoraya, S.; Marchant, R.; Brian, J.P.; Davey, M.R. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39(5): 450-454. 2003.
217. Srivastava, A.K.; Singh, T.; Jana, T.K.; Arora, D.K. Induced resistance and control of charcoal rot in *Cicer arietinum* (chickpea) by *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Botany* 79(7): 787-795. 2001.
218. Steenhoudt, O.; Vanderleyden, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 487-506. 2000.
219. Subba-Rao, N.S. Biofertilizers in Agriculture. En: Balkema, A.A. (Ed), Rotterdam, Holanda. pp. 186. 1992.
220. Swete-Kelly, D.E. Nutricional disorders En: Broadley, R.H., Wassman, R.C.; Sinclair, E.R. (eds.) Pineapple Pest and disorders. Department of primary industries, Brisbane, Queensland. pp. 33-42. 1993.

221. Szabados, L.; Savoure, A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* 15(2): 89-95. 2010.
222. Teale, W.D.; Paponov, I.A.; Palme, K. Auxin in action: signalling transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 847-859. 2006.
223. Teixeira, J.B.; Cruz, A.R.R.; Ferreira, F.R.; Cabral, J.R. Biotecnología aplicada à produção de mudas: Produção de mudas micropropagadas de abacaxi. *Biotecnología Ciência y Desenvolvimento* 3: 42-47. 2001.
224. Terry, E.A.; Leyva, A.G. Evaluación agrobiológica de la coinoculación micorrizas-rizobacterias en tomate. *Agronomía Costarricense* 30(1): 65-73. 2006.
225. Thakore, Y. The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology* 2: 194-208. 2006.
226. Thompson, J.P.; Skerman, V.B.D. *Azotobacteraceae*: the taxonomy and ecology of the aerobic nitrogen - fixing bacteria. Academic Press, Londres. pp. 405. 1981.
227. Torres, A.C. Condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. *Circular Técnica* 24: 19. 2007.
228. Van Huylbroeck, J.; Piqueras, A.; Debergh, P. The evolution of photosynthesis capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. *Plant Science* 155: 59-66. 2000.
229. Van Loon, L.C.; Geraats, B.P.J.; Linthorst, H.J.M. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 11: 184-191. 2007.
230. Van Loon, L.C.; Rep, M.; Pieterse, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162. 2006.
231. Velazco, A.; Castro, R. Estudio de la inoculación de *Azospirillum brasilense* en el cultivo del arroz (*Oryza sativa*) var. A´82 en condiciones de macetas. *Cultivos Tropicales* 20(1): 5-9. 2001.
232. Verbruggen, N.; Herman, C. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35: 753-759. 2008.
233. Viator, R.P., Kovar J.L, Hallmark W.B. Gypsum and compost effects on sugarcane root growth, yield, and plant nutrients. *Agronomy Journal* 94: 1332-1336. 2002.
234. Villadas, P.J.; López, F.M.; Saad, R.H.; Toro, N. Rhizosphere-bacterial community in *Eperua falcata* (*Caesalpinaceae*) a putative nitrogen-fixing tree from French Guiana Rainforest. *Microbial Ecology* 53: 317-327. 2006.

235. Viñals, M.; Villar, J. Avances en la formulación y aplicación de inoculantes bacterianos de uso agrícola. *Cultivos tropicales* 20(4):9-17. 1999.
236. Wainwright, H. Overcoming problem in stablishing micropropagules-guidelines for growers. *Professional Horticulture* 2: 67-72. 1988.
237. Walters, D.R. Induced resistance: destined to remain on the sidelines of crop protection?. *Phytoparasitica* 38: 1-4. 2010.
238. Wang, L.; Uruu, G.; Xiong, L.; He, X.; Nagai, C.; Cheah, T.; Hu, S.; Nan, G.; Sipes, S.; Atkinson, J.; Moore, H.; Rohrbach, G.; Paull, R. Production of transgenic pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) plants via adventitious bud regeneration. *In Vitro Cellular Development of Biology-Plant* 45: 113-12. 2009.
239. Weber, B.O.; Lima; R.N. Crisóstomo, L.A.; D. Freitas, J.A.; Carvalho, A.C.P.P.; Maia, A.H.N. Effect of diazotrophic bacterium inoculation and organic fertilization on yield of Champaka pineapple intercropped with irrigated sapota. *Plant and Soil* 327(1-2): 355-364. 2010.
240. Yanes, E.; González-Olmedo, J.L.; Rodríguez, R. Empleo de giberelinas y fertilización foliar durante la aclimatización de plantas de piña Cayena lisa cv. Serrana. *Biotecnología Vegetal* 1: 23-28. 2001.
241. Yanes, P.E.; González, O.J.; Sánchez, R.R. A technology of acclimatization of pineapple vitroplants. *Pineappel. News.* 7: 24. 2000.
242. Zarra, I.; Revilla, G. La Fisiología vegetal y su impacto social: La célula vegetal. En: Azcon-Bieto, J.; Talón, M. (eds.), *Fundamentos de Fisiología vegetal*, McGraw-Hill Interamericana de España. pp. 1-16. 2000.
243. Zayed, M.S. Improvement of growth and nutritional quality of *Moringa oleifera* using different biofertilizers. *Annals of Agricultural Science* 57(1): 53-62. 2012.
244. Zhang, L.; Hurek, T.; Reinhold, H. A *nifH*-based oligonucleotide microarray for functional diagnostics of nitrogen-Fixing microorganisms. *Microbial Ecology* 53: 456-470. 2007.
245. Zonta, E.; da Costa, F.B.; Goi, S.R.; Teixeira, M.M.R. O sistema radicular e suas interações com o ambiente edáfico. En: Silvestre, M.F. (ed) *Nutrição mineral de plantas*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Brasil, pp. 7-52. 2006.
246. Zorita, M.D.; Canigia, M.V.F. Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilienses* on dryland wheat productivity. *European Journal of Soil Biology* 45:3-11.2009.
247. Zuberer, D.A. Soil rhizosphere aspects of N₂-fixing plant-microbe associations. En: Lynch, J.M. (ed.) *The Rhizosphere*. John Warley and sons, Nueva York .pp.317-352. 1990.

8. ANEXOS

Anexo 1. Ficha de factibilidad económica de la fase de aclimatización de plantas de piña por la tecnología vigente de Yanes *et al.*, (2000).

 Centro de Bioplasmas Universidad de Ciego de Avila	FICHA FACTIBILIDAD	Fecha			VARIANTE A (TESTIGO)
		D	M	A	
		3	1	13	
Variedad de planta: <i>Piña Ananas Comosus var. CL</i>		Fase de desarrollo: <i>Vitroplanta Fase IV (Adaptada en vaso plástico)</i>		Unidad de Medida 50.000	
CONCEPTOS					
Materiales	Cantidad	Precio		IMPORTE	
		moneda total		moneda total	
<i>Vitroplanta Piña Fase III</i>	51.546	\$	0,1915	\$	9.871,06
<i>Vaso plástico desechable</i>	51.546	\$	0,8900	\$	45.875,94
<i>MultiCOMBI (g)</i>	946,8	\$	0,6660	\$	630,54
<i>MultiNPK (g)</i>	18.892,2	\$	0,0131	\$	247,07
<i>Cachaza (TM)</i>	4,3	\$	84,8500	\$	362,99
<i>Suelo Ferralítico Rojo (TM)</i>	2,1	\$	36,0000	\$	76,68
				\$	-
TOTAL				\$	57.064,28
Salario Básico	Salario	Tasa	Cantidad	Horas	IMPORTE
Categoría Trabajador		Horaria			moneda total
Labor de preparación de sustrato y siembra					
<i>Auxiliar de Investigación Agropecuaria</i>	\$ 396,00	\$ 2,06	4	120,27	\$ 992,26
					\$ -
Labor de aplicación foliar de Fertilizantes					
<i>Auxiliar de Investigación Agropecuaria</i>	\$ 396,00	\$ 2,06	1	54,00	\$ 111,38
					\$ -
Total					\$ 1.103,64
9,09%					\$ 100,32
14 % Seguridad Social					\$ 168,55
20 % Impuesto Fuerza de Trabajo					\$ 240,79
Total Salario e Impuestos					\$ 1.613,30
Total de Gastos Directos					\$ 58.677,58
Gastos Indirectos				25%	\$ 14.670,57
COSTO TOTAL					\$ 73.348,15
COSTO TOTAL (Unitario)					\$ 1,47
Hecho por:		Calculado por:		Observaciones:	

Anexo 2. Ficha de factibilidad económica de la fase de aclimatización de plantas de piña con el empleo de *Azotobacter chroococcum* (cepa INIFAT 5).

 Centro de Bioplasmas Universidad de Ciego de Avila	FICHA FACTIBILIDAD	Fecha			VARIANTE B (AZOTOBACTER)
		D	M	A	
		3	1	13	
Variedad de planta: <i>Piña Ananas Comosus</i> var. CL		Fase de desarrollo: <i>Vitroplanta Fase IV (Adaptada en vaso plástico)</i>		Unidad de Medida 50.000	
CONCEPTOS					
Materiales	Cantidad	Precio		IMPORTE	
		moneda total		moneda total	
<i>Vitroplanta Piña Fase III</i>	51.546	\$ 0,1915		\$ 9.871,06	
<i>Vaso plástico desechable</i>	51.546	\$ 0,8900		\$ 45.875,94	
<i>Azotobacter chroococcum (mL)</i>	1.610,8	\$ 0,0356		\$ 57,26	
<i>Cachaza (TM)</i>	4,3	\$ 84,8500		\$ 362,99	
<i>Suelo Ferralítico Rojo (TM)</i>	2,1	\$ 36,0000		\$ 76,68	
				\$ -	
TOTAL				\$ 56.243,93	
Salario Básico	Salario	Tasa	Cantidad	Horas	IMPORTE
Categoría Trabajador		Horaria			moneda total
Labor de preparación de sustrato y siembra					
<i>Auxiliar de Investigación Agropecuaria</i>	\$ 396,00	\$ 2,06	4	120,27	\$ 992,26
					\$ -
Labor de aplicación foliar de Azotobacter					
<i>Auxiliar de Investigación Agropecuaria</i>	\$ 396,00	\$ 2,06	1	8,00	\$ 16,50
					\$ -
Total					\$ 1.008,76
9,09%					\$ 91,70
14 % Seguridad Social					\$ 154,06
20 % Impuesto Fuerza de Trabajo					\$ 220,09
Total Salario e Impuestos					\$ 1.474,61
Total de Gastos Directos					\$ 57.718,54
Gastos Indirectos					\$ 9.620,53
					17%
COSTO TOTAL					\$ 67.339,07
COSTO TOTAL (Unitario)					\$ 1,35
Hecho por:		Calculado por:		Observaciones:	

9. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE TESIS.

9.1. Publicaciones Científicas.

1. Ramón Santos, Raúl Tapia, María Blanco, **Rayza González**, Jorge L. Glez, Martha Hernández, Yoanis Portilla. Producción de reguladores de crecimiento vegetal por una cepa de *Azotobacter* sp. Centro Agrícola (1) 23: 39-44. 1996.
2. **Rayza González**, Quintín Domínguez, Luis A. Expósito, Jorge L. González, Teresa Martínez, Miguel Hidalgo. Effectiveness of eight strains of *Azotobacter* sp. in the adaptation of pineapple vitroplants cv Smooth Cayenne. Acta Horticulturae # 425. 1997.
3. **R. González**, T. Laudat, M. Arzola, R. Méndez, P. Marrero, L. Pulido, B. Dibut, J. C. Lorenzo. Effect of *Azotobacter chroococcum* on *in vitro* pineapple plants' growth during acclimatization. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant: 1-4. 2010.
4. **Rayza M. González** Rodríguez, Alitza Iglesias, José Carlos Lorenzo, Bernardo Dibut. Selección de cepas de *Azotobacter chroococcum* para su aplicación en la aclimatización de plantas de piña cv. Cayena lisa. Biotecnología Vegetal 12(3): 157-164. 2012
5. **R. M. González-Rodríguez**, R. Serrato, J. Molina, C.E. Aragón, V. Olalde, L.E. Pulido, B. Dibut, J.C. Lorenzo. Biochemical and physiological changes produced by *Azotobacter chroococcum* (INIFAT 5 strain) on *in vitro* plantlets during acclimatization. Acta y Fisiología Plantarum. DOI 10.1007/s11738-013-1373-z. 2013.

9.2 Participación en eventos científicos.

1. **Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal Bioveg 2005. Rayza González**, José C. Lorenzo, Mayda Arzola, Julia Martínez, Bernardo Dibut. 2005. Efecto de diferentes cepas de *Azotobacter* en el proceso de aclimatización de vitroplantas de piña.
2. **VI Taller Internacional sobre Recursos Fitogenéticos, FITOGEN´2005. Rayza González**, J.C. Lorenzo, Alitza Iglesias, Mayda Arzola, Julia Martínez, B. Dibut. Efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococcum* en el proceso de aclimatización de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr).
3. **XVI Forum de Ciencia y Técnica. 2005. Rayza González**, José C. Lorenzo, Mayda Arzola, Julia Martínez, Bernardo Dibut. Efecto de diferentes cepas de *Azotobacter* en el proceso de aclimatización.
4. **I Taller de Biodiversidad, Biotecnología y Agricultura sostenible. 2005. Rayza González**, J.C. Lorenzo, Alitza Iglesias, Mayda Arzola, Julia Martínez, B. Dibut.. Efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococcum* en el proceso de climatización de vitroplantas de piña.

5. **Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal Bioveg 2009. Rayza González,** Taletha Laudat, Mayda Arzola, Roberto Méndez, Pedro Marrero, Lázaro E. Pulido, Bernardo Dibut, José C. Lorenzo Caracterización anatómica de vitroplantas de piña biofertilizadas con *A. chroococcum*.
6. **IX Simposio Internacional de biotecnología de las plantas, Villa Clara, Cuba. 2010. Rayza González,** Taletha Laudat, Mayda Arzola, Roberto Méndez, Pedro Marrero, Lázaro E. Pulido, Bernardo Dibut, José Carlos Lorenzo. Effect of *Azotobacter chroococcum* on pineapple *in vitro*-plantlets growth during acclimatization.
7. **XX Simposio internacional del centro científico de fertilizantes (CIEC), Villa Calara. 2012:** Hacia nuevos conceptos en el manejo de nutrientes; agricultura urbana, suburbana y agricultura alternativa. **Rayza M. González R.,** Alitza Iglesias, Rosalinda Serrato F., José C. Lorenzo F, Víctor Olalde P., Lázaro E. Pulido, Bernardo Dibut. Bioestimulación de vitroplantas de piña cv. Cayena lisa mediante la inoculación de *Azotobacter chroococcum*.
8. **Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal Bioveg 2013. Rayza M. González R.,** Alitza Iglesias, Rosalinda Serrato F., Enrique Ramírez, Yolanda Rodríguez, José C. Lorenzo F, Víctor Olalde P., Jorge Molina., Lázaro E. Pulido, Bernardo Dibut A. Estimulación del crecimiento de plantas de piña (*Ananas comosus*, L. Merr) cv. Cayena lisa, en fase de aclimatización mediante la inoculación de *Azotobacter chroococcum*

9.3 Distinciones y reconocimientos

1. **Resolución 63/90 del Ministerio de la Ciencia, Tecnología y medio ambiente: Por su aporte al desarrollo de la provincia. 1995:** Tecnología para la adaptación de vitroplantas de piña. **Resolución 63/90 del Ministerio de la Ciencia, Tecnología y medio ambiente. 1996.** Obtención e introducción del clon de piña Cayena lisa.
2. **Sello Forjadores del futuro. 2004.** Efecto de diferentes cepas de *A. chroococcum* en el proceso de aclimatización de vitroplantas de piña.
3. **Premio destacado XVI Forum de C. y T. (base) Centro de Bioplantas, Cuba . 2005.** Efecto de diferentes cepas de *Azotobacter* en el proceso de aclimatización de vitroplantas de piña.
4. **Mención en Fórum Nacional de Estudiantes de Ciencias Agropecuarias (como tutor, estudiante: Taletha Laudat)** Efectos fisiológicos y anatómicos de la biofertilización de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L) Merr.) en la fase de aclimatización con *Azotobacter chroococcum*.

5. **Premio Anual Provincial de la Academia de Ciencias de Cuba, 2011 al resultado por su impacto científico:** Efecto de *Azotobacter chroococcum* sobre el crecimiento de vitroplantas de piña en fase de aclimatización.

9.4 Tutoría de tesis

1. Laudat, T. 2011. Efectos fisiológicos y anatómicos de la biofertilización de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L) Merr.) en la fase de aclimatización con *Azotobacter chroococcum* Tesis de Diploma, Facultad de Ciencias Agroprecuarias, UNICA.

9.5 Síntesis del currículo del autor.

Nació el 19 de noviembre de 1969 en el municipio Morón, provincia de Ciego de Ávila. Cursó sus estudios primarios en la escuela Ignacio Agramonte y los secundarios en la ESBU Benito Juárez. Los estudios preuniversitarios los cursó en el IPUEC Eulogio Fernández Ruiz. En el año 1987 ingresó en la Universidad de la Habana en la Facultad de Biología, donde cursó la carrera de Licenciatura en Microbiología. Durante ese período ocupó responsabilidades en la FEU, desempeñándose durante los cinco años como jefa de grupo. Desde el cuarto año de la carrera se vinculó al Centro de Química Farmacéutica (CQF) para realizar las prácticas laborales. Se graduó en el año 1992. Comenzó su vida laboral en el Centro de Bioplantitas donde se ha desempeñado hasta la fecha. Cursó la Maestría de Biotecnología Vegetal la cual culminó en el año 2006. Ostenta la categoría científica de Investigador Agregado. Ha participado en cuatro proyectos de investigación y ha desarrollado más de 30 resultados científicos. Ha sido autora o coautora de más de 20 publicaciones científicas. Es autora de un capítulo de un libro. Ha participado en más de 40 eventos científicos de carácter nacional e internacional. Ha recibido 28 cursos de postgrado. Ha impartido docencia, entrenamientos y conferencias en cursos de pregrado y postgrado nacional e internacional. Ha realizado trabajos de asesoría en cuatro ocasiones. Ha tutorado tres tesis de diploma. Es miembro de la red CYETD BIOFAG. Como resultado de su trabajo investigativo ha recibido más de 25 premios y reconocimientos entre los que se encuentran: 2 Menciones especiales (1993,1995) y un premio destacado (1994) en el Fórum Nacional de C.y T. (C. Habana), 2 Resoluciones 63/90, 1 Premio anual al mérito científico técnico, 1 premio destacado en la 8va Exposición Nacional Forjadores del Futuro (BTJ), 3 Sellos forjadores del futuro (BTJ) (1996, 1998, 2004), Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 34/98, .Premio Anual Provincial de la Academia de Ciencias de Cuba al mejor resultado científico (2011).