

EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON *AZOSPIRILLUM* Y TRES NIVELES DE NITRÓGENO EN CAÑA DE AZÚCAR (*SACCHARUM OFFICINARUM*) C266-70 "IN VITRO"

G. González, Isora González¹, N. Moya, Dayneí Sosa y W. Olivera

**Laboratorio de Biotecnología. Facultad de Agronomía
Universidad de Matanzas, Cuba**

**¹ Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"
Matanzas, Cuba**

Se realizó un estudio del efecto que ejerce el *Azospirillum* sobre la caña de azúcar variedad C266-70 "in vitro", para lo cual se emplearon tres niveles de nitrógeno: 100% (1 650 mg/1 de NH_4NO_3 y 1 900 mg/1 de KNO_3); 25% (412,5 mg/1 de NH_4NO_3 , y 475 mg/1 de KNO_3) y 0% con inoculación (I) y sin inoculación (NI). Se utilizó un diseño totalmente aleatorizado con diez réplicas. Se determinó la altura, el peso fresco del tejido verde, así como la concentración de proteínas solubles totales y el índice de efectividad a la inoculación. El tratamiento de 25% de N inoculado resultó el de mayor efecto con respecto a los restantes y los incrementos fueron de 49,9; 42,5 y 63,7%; respectivamente, en el peso fresco, la altura y el contenido de proteínas solubles. Se recomienda continuar los estudios en ensayos de invernadero y campo, con vistas a obtener una mayor información

Palabras claves: *Inoculación, Azospirillum, N, caña de azúcar*

Effect that exert the *Azospirillum* upon variety of sugar cane C266-70 "in vitro" was studied. Three nitrogen levels were used: 100% (1 650 mg/1 NH_4NO_3 and 1 900 mg/1 KNO_3); 25% (412,5 mg/1 NH_4NO_3 and 475 mg/1 KNO_3) and 0% with inoculation (I) and without inoculation (NI). A complete randomized design with ten replications was used. The height, fresh weight of green material, as soon as, the concentration of total soluble proteins and effectiveness inoculation index were determined. The treatment with 25% of N inoculated showed the most effect compared to the rests with increase of 49,9; 42,5 and 63,7% in the fresh weight, height and in the soluble proteins content respectively. It is recommended to continue the studies in greenhouse and field experiments in order to obtain more information about it.

Additional index words: *Inoculation, Azospirillum, N, sugarcane*

El género de bacterias *Azospirillum* vive en asociación con gramíneas y plantas cultivables de importancia económica como el maíz, la cebada, la avena, el centeno y el arroz.

En la literatura se informa que el *Azospirillum* puede afectar el crecimiento de la planta por la fijación del nitrógeno atmosférico (Dobereiner y Pedrosa, 1987) y que además es capaz de producir sustancias estimuladoras del crecimiento; ello produce cambios en la raíz y en la morfología de los pelos radiculares

(Jain y Patriquin, 1984; Okon. Fallik, Sarig. Yahalom y Tal, 1988) y se ha sugerido que dicho efecto juega el rol esencial en la interacción planta-bacteria.

El efecto de la inoculación con *Azospirillum* pudiera determinarse en las etapas tempranas del desarrollo de la planta, durante las primeras semanas, después de una colonización óptima de la raíz (Okon; Dobereiner y Pedrosa; Dell Gallo y Fendrik; Fallik, Sarig y Okon, citados por Okon y Labandera-González. 1994).

El empleo de la técnica de cultivo "*in vitro*" posibilitaría, en alguna medida, la reducción del tiempo para conocer el efecto positivo de nuevos genotipos aislados de *Azospirillum*.

De acuerdo con lo antes expuesto, el trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto producido por la Cepa 24 de *Azospirillum* y tres niveles de nitrógeno, en caña de azúcar variedad C266-70.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección del material. Fueron seleccionadas plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) de la variedad C266-70. Todos los individuos tenían aproximadamente un mismo tamaño y peso y ninguna de las plantas poseían raíces; esta variedad se seleccionó debido a que ha mostrado un buen comportamiento en los diferentes tipos de suelo de la provincia de Matanzas y fue recomendada para suelos pobres o zonas de baja precipitación.

Medios de cultivo y tratamientos. Los tratamientos consistieron en la utilización del medio nutritivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al 0%, al 25% (412,5 mg/1 de NH_4NO_3 y 475 mg/1 de KNO_3) y al 100% de N (1 650 mg/1 de NH_4NO_3 y 1 900 mg/1 de KNO_3 , combinado con la inoculación (I) y sin ella (NI); la cepa de *Azospirillum* empleada fue la C-24.

Preparación del material vegetal e inoculación. Se emplearon plántulas obtenidas a partir del ápice caulinar, las cuales fueron podadas, pesadas y medidas, con el objetivo de obtener un material homogéneo, este material fue sembrado en el medio nutritivo MS e inoculado a los 7 días posteriores a su plantación. Los individuos fueron sumergidos durante 15 minutos (parte basal 5 mm de profundidad) en una suspensión bacteriana de *Azospirillum* (C-24) con un título superior a 10^7 ufc/ml.

Variables analizadas. Se estudiaron variables de crecimiento como la altura y el peso fresco del tejido verde; además, se estudió la concentración de proteínas solubles por el método descrito por Bradford (1976) y se calculó el índice de efectividad a la inoculación (IEI) en los diferentes parámetros, empleando la fórmula siguiente:

$$\text{IEI} = \frac{P(I) - P(\text{NI})}{P(I)} \times 100$$

Donde:

P = parámetro medido

I = inoculado

NI = no inoculado

Se empleó el test de Duncan (1955) para comparar las diferencias entre los tratamientos y se utilizó un diseño totalmente aleatorizado y diez réplicas.

RESULTADOS

La tabla 1 muestra el comportamiento de la caña de azúcar con tres niveles de nitrógeno inoculado (I) y sin inocular (NI). Para el peso fresco se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos, y se encontró que en los niveles cero y 25% de N la mayor respuesta fue observada en los tratamientos inoculados, mientras que para un nivel superior (100%) la inoculación produjo un decremento de este parámetro. La altura mostró un efecto similar al antes señalado y no ocurrió lo mismo en el contenido de proteínas solubles, ya que el tratamiento con 100% de nitrógeno inoculado no presentó diferencia significativa con respecto al no inoculado.

Además, se observó que en el peso fresco y en el contenido de proteínas solubles totales del tratamiento con 25% de N e inoculado, se obtuvieron los mejores resultados, con diferencias significativas del resto de los tratamientos, incluidos los que recibieron el 100%.

La tabla 2 refleja el índice de efectividad a la inoculación (IEI) en los tres niveles de nitrógeno. Para el peso fresco se obtuvo una respuesta positiva a la inoculación en los tratamientos de 0 y 25% de N y se destacó el segundo con un IEI de 49,95%; mientras que en el tratamiento con 100% el IEI fue negativo.

El comportamiento de la altura fue similar al anterior y sobresalió también el tratamiento con 25% de N. La proteína soluble mostró un efecto positivo en los tres niveles de N, el cual fue más marcado cuando se aplicó el 25% de N, con un IEI de 63,73%.

Tabla 1. Valores obtenidos con la inoculación de *Azospirillum* y diferentes concentraciones de nitrógeno.

T	Peso fresco (mg)	Altura (cm)	Proteínas solubles (mg/g)
0 I	46,62 ^d	2,20 ^b	225,48 ^d
0 NI	41,46 ^e	1,85 ^c	181,21 ^e
25 I	80,95 ^a	2,42 ^a	700,85 ^a
25 NI	40,51 ^e	1,39 ^d	254,17 ^c
100 I	54,72 ^c	1,49 ^d	509,22 ^b
100 NI	66,52 ^b	2,32 ^a	504,08 ^b
ES ±	0,99 ^{***}	0,003 ^{***}	7,07 ^{***}

a,b,c,d,e Superíndices no comunes difieren para $P < 0,05$ (Duncan, 1955)

*** $P < 0,001$

DISCUSIÓN

La mayor respuesta a la inoculación se obtuvo para el peso fresco y la altura en los niveles 0 y

Tabla 2. Índice de efectividad a la inoculación con *Azospirillum* en los diferentes parámetros estudiados (%).

	Peso fresco	Talla	Proteínas solubles
0	11,06	15,9	19,63
25	49,95	42,56	63,73
100	-21,56	-55,7	1,00

25% de N, lo cual puede deberse a la propiedad del *Azospirillum* de producir sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal, tales como auxinas, giberilinas y citoquininas (Zimmer, Roeben y Bothe, 1988), así como a la reducción del nitrógeno atmosférico, aunque algunos autores han

planteado que el proceso de fijación del N es bastante pobre. En este sentido, se ha sugerido que el poco efecto encontrado en los suelos tropicales se debe a la presencia de escasas cantidades de estos microorganismos, lo que hace que no contribuyan significativamente con la demanda de nitrógeno en la planta (Okon. citado por Rodelas, Salmerón, Martínez-Toledo y González-López, 1993).

Se observó también que en el nivel superior (100%) se produjo un decremento de los resultados como producto de la inoculación; ello pudiera estar relacionado con la característica del *Azospirillum*. que al igual que otros microorganismos fijadores de N, se inhibe al aplicar ciertas cantidades de N. De esta forma, Hartmann y Zimmer (1994) han planteado que al añadir compuestos nitrogenados como amonio y glutamina, la fijación de N es completamente inhibida en cultivos de *A. brasilense* y *A. lipoferum*.

En cuanto a las proteínas solubles, los tratamientos de 0 y 25% de N inoculados difirieron significativamente de los no inoculados; mientras que a un nivel más alto de N no ocurrió así, ya que el tratamiento inoculado fue similar al no inoculado. Esto pudiera estar relacionado con la propiedad del *Azospirillum* de incrementar significativamente la actividad específica de las enzimas, como ha sido informado en diversos cultivos (Goodman, Kiraly y Wood, 1986; Hadas y Okon, 1987).

En todas las variables analizadas el tratamiento con 25% de nitrógeno inoculado mostró un efecto más marcado, lo cual se corresponde con lo planteado en la literatura acerca de que las gramíneas inoculadas con *Azospirillum*, pueden cubrir una parte de la necesidad de nitrógeno que demanda la planta (Boddey y Dobereiner, 1988).

El índice de efectividad a la inoculación reflejó que el *Azospirillum* C-24 fue capaz de producir incrementos en todos los parámetros estudiados en los niveles de 0 y 25% de N, con un mayor efecto en el nivel de 25% de N. En el nivel superior se obtuvo un efecto positivo sobre la síntesis de proteína soluble; mientras que para la altura y el peso fresco se obtuvo un decremento. Esto pudiera deberse a que la inoculación con altos niveles de nitrógeno no afecta la síntesis de proteína, pero sí los parámetros de crecimiento en la caña de azúcar.

Los resultados del presente trabajo indican que el tratamiento con 25% de N inoculado mostró un efecto más marcado en las variables estudiadas que el resto de los tratamientos. De acuerdo con los aspectos analizados, se sugiere continuar estos estudios en ensayos de invernadero y campo con vistas a obtener una mayor información.

REFERENCIAS

- BODDEY, R.M. & DOBEREINER, JOHANNA. 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. *Plant and Soil*. 108:53
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein. utilizing the principle of protein-dyes binding. *Anal. Biochem.* 72:248
- DOBEREINER, JOHANNA & PEDROSA, F.O. 1987. Nitrogen fixing-bacteria in non-leguminous crop plants. Brock Springer Series in Contemporary Bioscience. Science Tech. Publishers, Madison, WI. 155 p.
- GOODMAN, R.N.; KIRALY, Z. & WOOD, K.R. 1986. Biochemistry and physiology of plant disease. University of Missouri Press. Columbia
- HADAS, R. & OKON, Y. 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biol. Fertil. Soils*. 5:241
- HARTMANN, A. & ZIMMER, W. 1994. Physiology of *Azospirillum*. In: *Azospirillum Plant Associations*. (Ed. Y. Okon). CRC Press, Inc. USA. p. 15
- JAIN, D.K. & PATRIQUIN, D.G. 1984. Root hair deformation, bacterial attackment and plant growth in wheat *Azospirillum* associations. *Applied Environmental Microbiology*. 48:1208
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*. 15:473
- OKON, Y.; FALLIK, E.; SARIG, S.; YAHALOM, E. & TAL, S. 1988. Plant growth promoting effects of *Azospirillum*. In: Nitrogen fixation: Hundred years after. (H. Bothe, F.J. de Bruijn and W.E. Newtron, Eds.). Fisher, Stuttgart West Germany. p. 741

- OKON, Y. & LABANDERA-GONZALEZ, C.A. 1994
Agronomic applications of Azospirillum: an
evaluation of 20 years worldwide field
inoculation. **Soil Biol. Biochem.** 26:1591
- RODELAS, B.; SALMERÓN, V.; MARTÍNEZ-
TOLEDO, M.W. & GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.
1993. Production of vitamins by *Azospirillum*
brasile in chemically defined media. **Plant
and Soil.** 153:97
- ZIMMER. W.; ROEBEN, K. & BOTHE, H. 1988. An
alternative explanation for plant growth
promotion by bacteria of the genus
Azospirillum. **Planta.** 176:333

Recibido el 15 de mayo de 1995