

Selección de cepas de *Azotobacter chroococcum* para su aplicación en la aclimatización de plantas *in vitro* de piña cv. 'Cayena lisa'

Rayza M. González Rodríguez¹, Alitza Iglesias¹, José Calos Lorenzo¹, Bernardo Dibut². *Autor para correspondencia.

¹Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila. Carretera Morón km 9. Ciego de Ávila. CP 69 450. e-mail: rgonzalez@bioplantas.cu

²Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical. INIFAT. Calle 2 esq. 1 Santiago de las Vegas La Habana, Cuba, CP 17200.

RESUMEN

Azotobacter chroococcum es una bacteria rizosférica que ha sido utilizada durante décadas como estimulador del crecimiento vegetal en una amplia gama de cultivos. Es capaz de fijar nitrógeno y producir sustancias estimuladoras del crecimiento. En el presente trabajo se muestran los resultados de determinar la efectividad de la aplicación de diferentes cepas de *A. chroococcum* en la aclimatización de plantas *in vitro* de piña. Se evaluaron seis cepas provenientes de la colección de cepas del INIFAT. Para su multiplicación y aplicación se empleó la norma cubana para la producción de *A. chroococcum*. Se evaluaron los siguientes indicadores: supervivencia, altura de la planta, número de hojas, longitud de la raíz, masa fresca y masa seca. La cepa INIFAT 5 resultó ser la que mayor estimulación produjo en la mayoría de las variables analizadas y fue seleccionada para estudios posteriores como la cepa más efectiva para la aclimatización de plantas *in vitro* de piña.

Palabras clave: *Ananas comosus* L., bacterias promotoras del crecimiento vegetal, biofertilizante.

Selection of *Azotobacter chroococcum* strains for its application on *in vitro* pineapple cv. 'Cayena lisa' plants acclimatization

ABSTRACT

Azotobacter chroococcum is a rhizosphere bacterium that has been used for decades as a plant growth stimulator in a wide range of crops. It is able to fix nitrogen and produce growth promoting substances. In the present work we show the results to determine the effectiveness of the application of different strains of *A. chroococcum* on acclimatization of *in vitro* pineapple plants. Six strains were evaluated from the strain collection of INIFAT. For its multiplication and application the Cuban standard for the production of *A. chroococcum* was used. We evaluated the following indicators: survival, plant height, leaf number, root length, fresh weight and dry weight. Strain INIFAT 5 proved to be the greatest stimulation occurred in most of the variables analyzed and it was selected for further study as the most effective strain for acclimatization of *in vitro* pineapple plants.

Key words: *Ananas comosus* L., biofertilizer, plant growth promotion bacteria.

INTRODUCCIÓN

La piña (*Ananas comosus* L.) ocupa el tercer lugar en cuanto a volumen de producción después de los bananos (*Musa* spp.) y los cítricos (*Citrus* spp.) (Rohrbach *et al.*, 2003). Su producción mundial fue de 18.4 millones de toneladas en 2009 (FAOSTAT, 2011). Sin embargo, el área cultivable de esta fruta, continúa aumentando en el mundo (Bartholomew, 2009).

En Cuba, a pesar de que se ha incrementado su producción, no se logra satisfacer la demanda. Entre las causas se mencionan la carencia de material vegetal de plantación y las afectaciones fitosanitarias en las áreas de producción de semilla (Hernández, 2003; Hernández *et al.*, 2010).

Para elevar estas producciones también se han establecido varios métodos como la multiplicación de plantas a través del cultivo de

tejidos con el desarrollo de diferentes protocolos de propagación (Daquinta y Benega, 1997; Escalona *et al.*, 1999; Botella y Fairbairn, 2005; Wang 2009). Sin embargo, aún estos presentan dificultades en la fase de aclimatización por la baja supervivencia de las plantas y su crecimiento lento en esta fase (Van de Broek *et al.*, 1997; Yanes *et al.*, 2001).

El uso de microorganismos promotores del crecimiento vegetal podría contribuir a mejorar la calidad de las plantas, influir en su crecimiento y desarrollo y por ende disminuir el tiempo requerido para su trasplante a campo.

Desde hace algunos años se viene introduciendo en el país el uso de los biofertilizantes (Dibut *et al.*, 2004), y especial énfasis ha cobrado la utilización de bacterias rizosféricas del género *Azotobacter*, debido fundamentalmente al papel que éstas cumplen en la nutrición vegetal y su influencia en la actividad fisiológica de las plantas. Sus principales efectos están relacionados con la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización de fosfatos, producción de antibióticos y de reguladores del crecimiento vegetal, entre otros (Ahmad, 2005; Adesemoye, 2009). El uso de estos biofertilizantes también constituye una alternativa para la obtención de productos cada vez más ecológicos y con menos efectos nocivos al medio ambiente que contribuyan a incrementar los rendimientos y disminuir el uso de fertilizantes químicos.

González *et al.* (1997), demostraron que la aplicación de *Azotobacter chroococcum* en el cultivo de piña cv. 'Cayena Lisa serrana' en fase de aclimatización mejoraba el crecimiento y desarrollo de las plantas. Sin embargo, se requerían estudios donde se incorporaran cepas empleadas para la producción de biofertilizantes en el país de las cuales se tienen estandarizados los protocolos para su producción.

Teniendo en cuenta estos precedentes y la necesidad de incrementar la eficiencia del proceso de propagación de piña por métodos biotecnológicos donde se aplicaran productos nacionales, se desarrolló la presente investigación con el objetivo de

determinar la efectividad de diferentes cepas de *A. chroococcum* de la colección de biofertilizantes del INIFAT en la aclimatización de plantas *in vitro* de piña cv. 'Cayena lisa'.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de interacción planta-patógeno, y en las casas de cultivo (área de aclimatización) del Centro de Bioplantas, adjunto a la Universidad de Ciego de Avila, Cuba.

Material vegetal. Procedencia y características del cultivo

Se utilizaron para el experimento plantas *in vitro* de piña cv. 'Cayena lisa' en fase de enraizamiento. Estas fueron propagadas por organogénesis en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) según el procedimiento descrito por Daquinta y Benega (1997). Las plantas se colocaron en frascos plásticos de 83 cm³ de capacidad que contenían como sustrato una mezcla de cachaza y suelo Ferralítico Rojo (SFR) en la proporción 1:1 (v/v). Los frascos se ubicaron en una casa de cultivo a una intensidad de luz de 458 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. El riego utilizado fue a través de un sistema de nebulización automatizada durante 25 segundos cada 30 min, siguiendo las instrucciones brindadas por Yanes *et al.* (2001). Se mantuvo un control fitosanitario visual durante todo el tiempo que duró el experimento. No se aplicó fertilización química en los tratamientos. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado.

Material microbiano empleado como base para la obtención del biofertilizante

Se utilizaron seis cepas de la especie *Azotobacter chroococcum*: INIFAT 4, INIFAT 5, INIFAT 9, INIFAT 12, INIFAT 15, INIFAT 17, provenientes de la colección nacional de *A. chroococcum* del Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT).

La multiplicación de las cepas se realizó en medio de cultivo Dimargon (Patente 22178) según Dibut *et al.* (2000) y la inoculación se efectuó a razón del 8% (v/v) a partir de un preinóculo en Erlenmeyers de 500 ml que

contenían 150 ml de medio de cultivo. Posteriormente, los frascos se colocaron en un agitador orbital (RETOMED) a 32°C y 180 r.p.m. durante 72 horas, hasta lograr una concentración final de 10^{10} - 10^{11} UFC.m⁻¹.

Determinación de la efectividad de las cepas

Los cultivos obtenidos con cada cepa para su aplicación fueron diluidos 1/10 con agua común, según la norma técnica establecida para la producción de *Azotobacter* (Dibut *et al.*, 1992).

Se emplearon 40 plantas por cada cepa (seis) evaluada y el control (plantas sin inocular) para un total de 280 plantas.

En el momento de la siembra, las plantas fueron inoculadas por aspersión al sistema foliar y al sustrato, con ayuda de un asperjador manual (en las primeras horas de la mañana). Cada planta se inoculó con aproximadamente 2 ml m⁻². Además, se realizaron aplicaciones periódicas de cada producto (seis cepas) cada 8 semanas (tres aplicaciones en 24 semanas) según el procedimiento descrito anteriormente y tomando como base la norma cubana antes mencionada.

Al cabo de 24 semanas (seis meses) se realizaron evaluaciones sobre diferentes indicadores del crecimiento y desarrollo de las plantas tales como: número de hojas por planta, masa fresca y masa seca de la planta (g), longitud de la raíz más larga (cm) y altura de la planta (cm) medida desde la base del tallo hasta el extremo de la hoja más larga. 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 con respecto al control.

Análisis bioestadístico

Previamente en todos los casos se comprobó la distribución normal y homogeneidad de varianzas según las pruebas de Kolmogorov-Smirnov (5%) y Levene (5%), respectivamente. El procesamiento estadístico de los datos

se realizó a través de la prueba de Kruskal Wallis y la prueba de rango Student-Newman-Keuls. Se realizó la transformación de la variable número de hojas mediante la ecuación \sqrt{x} . Se empleó el utilitario estadístico SPSS (versión 11 para Windows) con un intervalo de confianza de 95%.

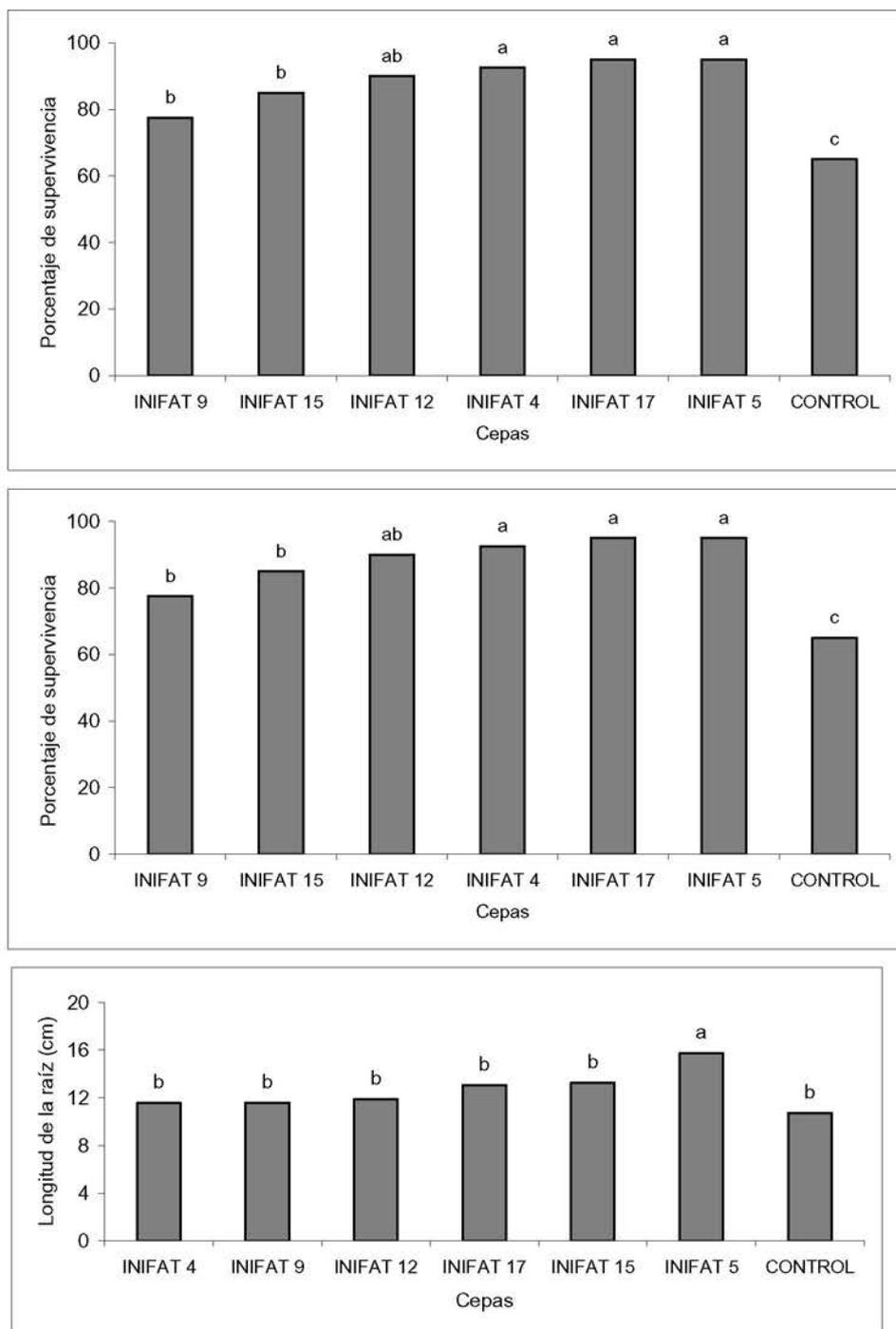
RESULTADOS Y DISCUSION

Determinación de la efectividad de las cepas

La correcta selección de cepas de microorganismos biofertilizadores en estudios agrobiológicos que implican su uso para mejorar la productividad de los cultivos resulta indispensable en los esquemas de investigación que se diseñan con estos fines (Dibut, 2000, Rojas *et al.*, 2006). Muchos errores se han cometido en el diseño de obtención de inoculantes comerciales al emplear cepas de microorganismos procedentes de colecciones referenciadas o aisladas de agroecosistemas de forma arbitraria, o sea, sin realizar ensayos de selección que permitan disponer de la estirpe que se muestra como la más efectiva del total de microorganismos probados (Dibut *et al.*, 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.

En este estudio se comprobó que las cepas de *A. chroococcum* tuvieron efecto sobre las plantas *in vitro* de piña durante su aclimatización.

En todos los tratamientos se logró más de 70% de supervivencia con diferencias significativas con respecto al control (Figura 1A) con incrementos entre 12.5 y 30.0%. Los mayores valores se obtuvieron en los tratamientos donde se inocularon las cepas INIFAT 4, 5 y 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 este o cualquier otro cultivo de interés económico (Barriuso *et al.*, 2008; Bartholomew, 2009).



Letras iguales sobre barras indican que las medias no difieren significativamente (Kruskal Wallis, Student-Newman-Keuls, $p > 0.05$).

Figura 1. Efecto de las diferentes cepas de *Azotobacter chroococcum* sobre la supervivencia (A), altura (B) y longitud de la raíz más larga (C) de plantas *in vitro* de piña cv. Cayena lisa en fase de aclimatización.

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 1B), con la cepa INIFAT 5 se obtuvieron los mayores valores. Otros autores han referido la efectividad cepas de *Azotobacter*

sobre el crecimiento de diferentes plantas. Por ejemplo, al aplicar la cepa INIFAT-17 de *Azotobacter chroococcum* a semilleros de cebolla (*Allium cepa* L.) se logró un incremento en la altura de las posturas, lo que permitió obtener plántulas aptas para el trasplante en un período de 7 días antes, en comparación con los semilleros que no recibieron el efecto del biofertilizante (Dibut *et al.*, 1992). En otros estudios similares el efecto de la bacteria arrojó altos valores de estimulación de este indicador en este mismo cultivo, con un aumento de la calidad de las posturas obtenidas bajo condiciones de cepellón (Pulido, 2002).

Igualmente, en sistemas de viveros de frutales se ha logrado la obtención de plantas de mayor calidad y con mayor altura al inocular cepas bacterianas. Específicamente, en papaya (*Carica papaya* L.) se obtuvieron plantas más altas al aplicar *Gluconacetobacter diazotrophicus*, lo que definió la calidad de las posturas para su adaptación a la fase de campo (Dibut *et al.*, 2004). Igualmente, estos resultados coinciden con los informados por Canbolat *et al.* (2006), al estudiar la efectividad de cepas de *Bacillus* sp. aisladas de la rizosfera de plantas de pimienta (*Piper nigrum* L.), y aplicadas en semilleros de plantas de cebada (*Hordeum sativum* L.), donde apreciaron que todas las cepas estimularon el crecimiento del cultivo.

El incremento de la altura de las plantas resulta de mucho interés ya que este indicador es uno de los que define su calidad para su plantación en campo según la metodología propuesta por Yanes *et al.* (2000) para la aclimatación de plantas *in vitro* de piña.

En este estudio se comprobó que sólo con la cepa INIFAT 5 aumentó significativamente la longitud de la raíz más larga de las plantas (Figura 1C).

En este tratamiento se incrementó en 36.0% la longitud del sistema radicular con respecto al tratamiento control, lo cual pudiera fundamentarse por la excreción de sustancias estimuladoras del crecimiento como las auxinas que juegan un papel decisivo en la rizogénesis. Algunos reguladores del crecimiento, producidas por microorganismos rizosféricos, pueden provocar un aumento de la superficie de la raíz, que permite a la planta una mayor absorción de nutrientes (Artursson *et al.*, 2004; Narula *et al.*, 2006).

Azotobacter 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 la misma excreta al medio. Este microorganismo al encontrarse en elevadas poblaciones en el suelo logra asociarse al sistema radical de algunas especies vegetales y ocasiona una aceleración del desarrollo y un aumento en volumen del sistema de raíces (Aquilanti *et al.*, 2004).

Al ser la adaptación y supervivencia de las plantas obtenidas *in vitro* objetivo de la presente 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). Al lograr un mejor enraizamiento de las plantas de piña se logran plántulas más vigorosas en la fase de aclimatación.

En otros cultivos de 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 *Azotobacter chroococcum* lo que finalmente se tradujo en el manejo exitoso de las posturas en semilleros y casas de cultivo (Pulido *et al.*, 2003).

Otros estudios con la aplicación de reguladores del crecimiento (ej. ácido indolacético y citoquininas) provenientes de cultivos microbianos han permitido incrementar la superficie de la raíz, que permiten a la planta un mejor anclaje y una mayor absorción de nutrientes (De Salmone *et al.*, 2001). En este caso las rizobacterias *Azotobacter chroococcum* y *Azospirillum brasilense* constituyen los microorganismos más empleados con estos fines (Jha *et al.*, 2009). Para los viveros de plántulas de piña, el hecho de lograr una estimulación de este tipo en el sistema radicular abre nuevas perspectivas para la coinoculación con otros microorganismos rizosféricos o mezclas de nuevos sustratos que permitan obtener plántulas con mayor calidad.

Tanto la masa fresca de las plantas, como la masa seca se incrementaron significativamente en los tratamientos inoculados con las cepas bacterianas (Tabla 1). La masa seca aumentó entre 11.0% (en presencia de la cepa INIFAT 17) y 28.0% (Cepa INIFAT 9). Ello sugiere que el metabolismo del cultivo se vio estimulado por la

acción de la bacteria. Resultados similares refirieron autores como Cupull *et al.* (2006) en viveros de posturas de café (*Coffea arabica* L.) donde utilizaron siete cepas de este microorganismo y obtuvieron incrementos significativos en los indicadores morfológicos evaluados, entre ellos masa seca. Igualmente, Aseri *et al.* (2008) informaron resultados positivos en estos indicadores al realizar estudios de selección de cepas de esta especie bacteriana en varios cultivos donde se destaca la importancia de estimular este indicador (masa) por la influencia que tiene sobre el desarrollo del sistema planta en general.

Los valores obtenidos se corresponden con los encontrados por varios autores al evaluar el indicador biomasa en experimentos agrobiológicos donde se emplearon ésta y otras rizobacterias como *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia* y *Herbaspirillum* sp. (Egamberdieva, 2008).

En el número de hojas no se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos que recibieron el efecto de las diferentes cepas de *A. chroococcum* evaluadas. Sin embargo, a partir de observaciones visuales se comprobó que las hojas en el control eran de menor tamaño lo cual se corresponde con los menores valores de masa fresca y seca.

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 control pero con mucho menor desarrollo que en las plantas inoculadas, lo que a efecto de los procesos fotosintéticos y metabólicos en general, no representa ventajas medibles para el desarrollo del cultivo (Maynard y Hochmuth, 2007).

Cuando en las plantas se forman hojas con propiedades fotosintéticas más relevantes, este fenómeno influye notablemente sobre el desarrollo de la planta en general como sistema, es decir, en el vigor que es capaz de desarrollar, y por consiguiente, en la adaptación a cualquier sustrato o tipo de suelo (Babaloa, 2010).

Es por esto, que según la experiencia actual que se ha proyectado en este tipo de estrategia, 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. Además, garantizan una asociación altamente efectiva y persistente en el tiempo (Berg y Smalla, 2009).

Teniendo en cuenta los resultados en los diferentes indicadores evaluados se seleccionó la cepa INIFAT 5 para ser aplicada en la aclimatización de plantas de piña cv. 'Cayena lisa' obtenidas por métodos biotecnológicos. Mediante este estudio se corroboró la capacidad de cepas de *A. chroococcum* de estimular el crecimiento vegetal y se abren perspectivas para su uso en este campo.

Tabla 1. Efecto de diferentes cepas de *Azotobacter chroococcum* sobre el crecimiento de plantas *in vitro* de piña cv. 'Cayena lisa' en fase de aclimatización.

Cepas	Masa fresca (g)	Masa seca (g)
INIFAT 5	16.09 b	1.62 b
INIFAT 15	16.44 b	1.60 b
INIFAT 17	15.35 c	1.50 c
INIFAT 9	17.59 a	1.74 a
INIFAT 12	16.02 b	1.57 b
INIFAT 4	15.84 b	1.54 b
Control	13.60 d	1.35 d

Medias con letras iguales en una misma columna, no difieren significativamente (Kruskal Wallis, Student-Newman-Keuls, $p > 0.05$)

REFERENCIAS

- Adesemoye, AO, Kloepper JW (2009) Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1–12
- Ahmad, F, Ahmad I, Khan MS (2005) Indole Acetic Acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.* 29: 29-34
- Aquilanti, L, Favilli F, Clementi F (2004) Comparison of different strategies for isolation and preliminary identification of *Azotobacter* from soil samples. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1475–1483
- Artursson, V, Finlay R, Jansson J (2006) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* 8: 1–10
- Aseri, GK, Jain N, Panwar J, Rao AV, Meghwal PR (2008) 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
- Babalola, O O (2010) Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett* 32:1559–1570
- Barriuso, J, Solano BR, Fray RG, Camara M, Hartmann A, Manero FJG (2008) Transgenic tomato plants alter quorum sensing in plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Biotechnol J.* 6(5):442–452
- Bartholomew, D (2009) MD2 pineapple transforms the world's pineapple fresh fruit export industry. *Pineap News* 16: 2–5
- Benizri, E, Amiaud B (2005) Relationship between plants and soil microbial communities in fertilized grasslands. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 2055–2064
- Berg, G, Smalla K (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 68:1–13
- Botella, JR, Fairbairn D J (2005) Present and future potential of pineapple biotechnology. *Acta Hort.* 622: 23–28
- Canbolat, MY, Bilen S, Çakmakçý R, Ahin F, Aydin A (2006) 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
- Cupull, R S, Cupull MCS, Sánchez CE, Ortiz AA, González C F, Viva MF (2006) Efecto de siete cepas de la familia *Azotobacteriaceae* en la producción de posturas de *Coffea arabica* L. *Centro Agrícola* 33 (2): 5-9
- Daquinta, M, Benega R (1997) Brief review of tissue culture in pineapple. *Pineap. News* 3: 7–9
- De Salmone, IEG, Hynes RK, Nelson LM (2001) Cytoquinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology* 47(5): 404-411
- Dibut, AB (2000) 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
- Dibut, AB, Martínez R, Ortega M, García R, Tejada G, Rodríguez J, Simanca ME, Fey Gobín L (2004) AZOMEG, nuevo biofertilizante mixto de amplio espectro de acción. El efecto sobre el cultivo de la rosa. *Memorias del Cuarto Encuentro Base de Agricultura Orgánica, ACTAF. La Habana*
- Dibut, AB, Martínez VR, González R (1992) Uso de biopreparados a base de *Azotobacter* en la agricultura cubana. Resultados y perspectivas. I Taller Internacional sobre biofertilización en los trópicos, pp. 25-27. La Habana
- Dibut, AB, Ortega M, Martínez R, Fey L, Ríos Y (2005) Nuevos aislados de en cultivos de importancia económica para Cuba. *Cultivos tropicales* 25 (2): 13-17
- Egamberdieva, D (2008) Plant growth promoting properties of rhizobacteria isolated from wheat and pea grown in loamy sand soil. *Turk J Biol.* 32(1): 9–15
- Escalona, M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González J L, Desjardins Y, Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* 18: 743–748
- FAOSTAT (2011) FAO Statistic División. Helping to build a world without hunger. [En línea] En: FAO STATISTIC DIVISION. <http://faostat.fao.org>.: 567. Consultado 23 de febrero de 2012
- González, R, Domínguez Q, Expósito LA, González JL, Hidalgo M (1997) Efectividad de ocho cepas de *Azotobacter* en la adaptación de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.), cv Cayena Lisa. *Acta Horticulturae* 425: 277-281
- Hernández AA, Muiño B L, Rosón C, Casola C, Porras A, López A (2010) Control químico de

- patógenos fúngicos en piña de vivero. *Fitosanidad* 14 (1): 31-37
- Hernández, M (2003) Obtención y caracterización de preparados enzimáticos de bromelina a partir de tallos de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) cosechados en Cuba. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de Ciego de Avila. Centro de Bioplantas. Ciego de Avila
- Jha, B, Thakur MC, Gontia I, Albrecht V, Stoffels M, Schmid M, Hartmann A (2009) Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. *Eur J Soil Biol.* 45(1):62–72
- Maynard, DN, Hochmuth GJ (2007) Knott's handbook for vegetable growers. 5th ed. pp 65–68. Wiley Hoboken, New Jersey
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497
- Narula, N., Deubel, A, Gans W, Behl RK, Merbach W (2006) Paranodules and colonization of wheat roots by phytohormone producing bacteria in soil. *Plant Soil Environ* 52: 119–129
- Pulido, L, Medina N, Cabrera A (2003) La biofertilización con rizobacterias y hongos micorrízicos arbusculares en la producción de posturas de tomate y cebolla. *Crecimiento vegetativo. Cultivos Tropicales* 24(1): 45-50
- Rohrbach, KG, Leal F, Coppens D' Ecckenbrugge G (2003) History, distribution and world production. En: DP Bartholomew, RE Paull, KG Rohrbach (Eds) *The Pineapple. Botany, production and uses*, pp. 1-12. CAB International. Roma
- Rojas, M, Montoute M, Heydrich M (2006) Potencialidades de cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* aisladas de diferentes ecosistemas para la estimulación del crecimiento vegetal. Congreso Científico INCA (15: 2006, nov 7-10, La Habana) Memorias. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana
- Van de Broek, A, Van Dommet A, Costacura A, Prensén E, De Zamaroczy M, Okon Y, Lambrecht M, Dosselere F, Keijers V, Vanderleyden J (1997) *Azospirillum*-plant associations: Genetics of indol-3-acetic acid biosynthesis and ammonium transport. Proceedings of the 11th International Congress in Nitrogen Fixation, Institute Pasteur, Paris
- Wang, L, Uruu G, Xiong L, He X, Nagai C, Cheah T, Hu S, Nang Sipes S, Atkinson J, Moore H, Rohrbach G, Paull R (2009) Production of transgenic pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) planta via adventitious bud regeneration. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 45: 113–121
- Yanes, E, González J, Rodríguez R (2000) A technology of acclimatization of pineapple vitroplants. *Pineapple News* 7: 24
- Yanes, E, González-Olmedo J L, Rodríguez R (2001) Empleo de giberelinas y fertilización foliar durante la aclimatización de vitroplantas de piña *Cayena lisa* cv. Serrana. *Biotecnología Vegetal* 1: 23-28

Recibido: 19-4-2012

Aceptado: 6-6-2012