

SELECCIÓN DE AISLADOS DE RIZOBIOS PROVENIENTES DE NÓDULOS DE LA LEGUMINOSA FORRAJERA

Canavalia ensiformis

Selection of rhizobia isolates from forage legume's nodules

Canavalia ensiformis

Ionel Hernández Forte[✉], Guianeya Pérez Hernández, María C. Nápoles García, Pedro R. Rosales Genqui, Roberto Baños Gordillo y Juan F. Ramirez Pedroso

ABSTRACT. The objective of this work was to carry out a selection of rhizobia isolates from forage legume's nodules *Canavalia ensiformis* according to their characteristics and potentialities to develop nitrogen-fixing root nodules in *Macroptilium atropurpureum* (siratro), as model plant, so that they can constitute promissory strains for biofertilizer elaboration that improve the establishment of the canavalia in the cattle floors. Twelve rhizobia isolates and two commercial strains, BR 2001 and BR 2003a were used. The possible taxonomic distribution of the isolates was determined through the study of their morpho-cultural and physiological characteristics. *In vitro* nodulation assays were also performed in *Macroptilium atropurpureum* (siratro). Five possible members of the genera *Rhizobium* / *Sinorhizobium* and seven possible members of genera *Bradyrhizobium* were identified. Although the plants inoculated with the commercial strain BR 2003a presented a bigger number of total nodules and total effective nodules, the plants inoculated with the isolate CP5 presented a bigger number of nodules in the main root and those inoculated with CP12 had a bigger number of effective nodules in this root. The carried out study demonstrates that isolates of autochthonous rhizobia as CP5 and CP12 they could constitute promissory strains for the biofertilizer elaboration that improves the establishment of the cultivation of canavalia in the cattle floors.

Key words: *Canavalia ensiformis*, forage legumes, selection

RESUMEN. El objetivo del presente trabajo fue seleccionar aislados de rizobios provenientes de nódulos de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*, teniendo en cuenta sus características y potencialidades para nodular *Macroptilium atropurpureum* (siratro), como planta modelo, de manera que puedan constituir cepas promisorias para la elaboración de biofertilizantes que mejoren el establecimiento de la canavalia en los suelos ganaderos. Se utilizaron 12 aislados de rizobios y dos cepas comerciales, BR 2001 y BR 2003a. Se determinó la posible distribución taxonómica de los aislados mediante el estudio de sus características morfo-culturales y fisiológicas y se realizaron bioensayos de nodulación *in vitro* en *Macroptilium atropurpureum* (siratro). Se identificaron cinco aislados como posibles miembros del género *Rhizobium* / *Sinorhizobium* y siete aislados como posibles miembros del género *Bradyrhizobium*. A pesar de que las plantas inoculadas con la cepa comercial BR 2003a presentaron un mayor número de nódulos totales y de nódulos efectivos totales, las plantas inoculadas con el aislado CP5 presentaron un mayor número de nódulos en la raíz principal y las inoculadas con CP12 tuvieron un mayor número de nódulos efectivos en esta raíz. El estudio realizado demuestra que aislados de rizobios autóctonos como CP5 y CP12 pudieran constituir cepas promisorias para la elaboración de biofertilizantes que mejoren el establecimiento del cultivo de canavalia en los suelos ganaderos.

Palabras clave: *Canavalia ensiformis*, leguminosas forrajeras, selección

Ionel Hernández Forte, Reserva Científica; Dra.C. María C. Nápoles García, Investigador Titular; Pedro R. Rosales Genqui, Especialista del departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, gaveta postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, CP 32 700; M.Sc. Guianeya Pérez Hernández, Aspirante Investigador del departamento de Investigaciones; Roberto Baños Gordillo, Especialista del departamento Extensionismo, Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, avenida independencia, s/n, km 8 y medio, Boyeros. Ciudad de La Habana, Cuba; Juan F. Ramirez Pedroso, Investigador Auxiliar del departamento Administración, Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Cascajal

✉ ionel@inca.edu.cu; iip@enet.cu; tere@inca.edu.cu; prafael@inca.edu.cu

INTRODUCCIÓN

Los pastos y forrajes han estado constituidos tradicionalmente por especies de gramíneas y leguminosas. En la actualidad, constituyen la principal y más barata fuente de alimentos para la ganadería (1, 2). Sin embargo, la mayoría de los pastos naturales en Cuba presentan una baja calidad alimenticia, ya que en ellos predominan las gramíneas en comparación con los cultivos de leguminosas. Esto se debe fundamentalmente al bajo

establecimiento de las leguminosas en los suelos ganaderos, los cuales generalmente presentan una baja fertilidad y se encuentran afectados por diferentes factores biológicos, físicos y químicos (3, 4). Estos factores afectan tanto la simbiosis como la fijación del nitrógeno que tiene lugar en estas plantas (5).

Canavalia ensiformis (canavalia) es una leguminosa de altos rendimientos en granos y forraje. En las condiciones edafoclimáticas de Cuba, constituye una de las especies más utilizadas como cultivo de cobertura (6) y como abono verde (7). Su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con los rizobios favorece el crecimiento de otros cultivos acompañantes, incrementando el valor nutritivo y alimenticio de los mismos (8, 9). La utilización de este cultivo en la ganadería y en la agricultura permite el desarrollo de ambos y la protección del medio ambiente.

Por otra parte la leguminosa *Macroptilium atropurpureum* (siratro) constituye una planta modelo para el estudio de la interacción simbiótica rizobio-leguminosa, lo cual se debe a la promiscuidad de este cultivo para ser infectada por un amplio rango de rizobios del género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Sinorhizobium*, provenientes de leguminosas tan diversas como *Vigna*, *Lupinus*, *Ornithopus*, *Cicer*, *Sesbania*, *Leucaena*, *Mimosa*, *Lablab* y *Acacia* (10). Es por ello que el uso del siratro es una alternativa factible para evaluar la capacidad de infección y la eficiencia de la nodulación de aislados de rizobios bajo condiciones controladas (11).

Desde el punto de vista práctico, la selección de rizobios nativos adaptados a las condiciones edafoclimáticas de Cuba, garantizaría el establecimiento exitoso de la simbiosis. Contar con estos aislados para la confección de inoculantes permitiría un mejor establecimiento de las leguminosas y con ello un incremento en los rendimientos agrícolas y ganaderos, así como una reducción del empleo de fertilizantes nitrogenados. Basado en lo anterior nos propusimos en el presente trabajo: seleccionar aislados de rizobios provenientes de nódulos de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*, teniendo en cuenta sus características y potencialidades de nodular *Macroptilium atropurpureum* (siratro), de manera que puedan constituir cepas promisorias para inoculantes que mejoren el establecimiento de la canavalia en los suelos ganaderos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL MICROBIANO

El estudio se realizó en el período 2010-2011 en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Se utilizaron 12 aislados de rizobios provenientes de nódulos de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*, pertenecientes a la colección de cepas de rizobios del Laboratorio de Microbiología del departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal de esta institución. Además se utilizaron dos cepas comerciales, la BR 2001 y la BR 2003a (Tabla I).

Tabla I. Aislados y cepas comerciales de rizobios provenientes de *Canavalia ensiformis*

Material microbiano	Región de procedencia			
	Municipio	Provincia	País	Institución
Aislados				
Can2	Cascajal	Villa Clara	Cuba	EEPF
Can3	Cascajal	Villa Clara	Cuba	EEPF
Can4	Cascajal	Villa Clara	Cuba	EEPF
Can5	Cascajal	Villa Clara	Cuba	EEPF
Can6	Cascajal	Villa Clara	Cuba	EEPF
CP2	La Palma	Pinar del Río	Cuba	IIPF-INCA
CP3	La Palma	Pinar del Río	Cuba	IIPF-INCA
CP5	La Palma	Pinar del Río	Cuba	IIPF-INCA
CP8	La Palma	Pinar del Río	Cuba	IIPF-INCA
CP10	La Palma	Pinar del Río	Cuba	IIPF-INCA
CP12	La Palma	Pinar del Río	Cuba	IIPF-INCA
CP13	La Palma	Pinar del Río	Cuba	IIPF-INCA
Cepas comerciales				
BR 2001	-	-	Brasil	EMBRAPA
BR 2003a	-	-	Brasil	EMBRAPA

Can: aislados de canavalia

CP: aislados de canavalia, específicamente de la región de La Palma, Pinar del Río

EEPF: Estación Experimental de Pastos y Forrajes

IIPF: Instituto de Investigación de Pastos y Forrajes

INCA: Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuarias

ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFO-CULTURALES Y FISIOLÓGICAS

Las características micromorfológicas estudiadas fueron forma de la célula bacteriana, respuesta al Gram, tamaño de las células y la presencia de esporas. Estas características, así como la pureza de cada uno de los cultivos bacterianos fueron determinados mediante la Tinción de Gram (12).

Para conocer las características culturales, los aislados en estudio y las cepas comerciales se cultivaron por agotamiento en medio levadura-manitol-agar (YEM, por sus siglas en inglés) (13) con rojo congo a pH 6,8. Se incubaron durante 10 días a 28°C y se determinó entonces la forma, color, textura, producción de mucus y el diámetro de las colonias (mm). En dependencia de los valores de las mediciones realizadas para el diámetro de las colonias, fueron clasificadas como colonias grandes, medianas o pequeñas. Además se determinó la tasa de crecimiento de cada aislado y cepa, monitoreando la aparición o no de las colonias en las placas cada 24 h durante los 10 días de incubación. En este sentido, aquellos aislados y cepas cuyas colonias se hicieran visibles en medio YEM a los dos-tres días de incubación, se consideraron de rápido crecimiento, mientras que aquellos cuyas colonias

aparecieran sobre el medio a los cinco-siete días, se consideraron de lento crecimiento (14).

Para conocer si los diferentes aislados y cepas comerciales excretaban ácido o base al medio de cultivo, se cultivaron en medio YEM a pH 6,8 con indicador azul de bromotimol (0,5 % en NaOH 0,016N). Transcurrido el tiempo de crecimiento de cada aislado y cepa, se observó cambio de coloración en el medio de cultivo. En el caso de observar un cambio de color verde (color original del medio luego de formulado) a amarillo, se corresponde con la excreción de ácido al medio, mientras que si el cambio de coloración que se observa es de verde a azul, se corresponde con la excreción de base al medio de cultivo por el microorganismo (14).

ENSAYOS DE NODULACIÓN *IN VITRO*

Los ensayos de nodulación *in vitro* fueron realizados utilizando la leguminosa *Macroptilium atropurpureum* (siratro), la cual constituye una planta modelo en los estudios de nodulación debido a su alta promiscuidad con varios géneros de rizobios (10, 13). Las semillas de la leguminosa fueron donadas por la EEPF de Cascajal, Villa Clara.

Para la descarificación de las semillas se mantuvieron en etanol al 70 % durante cinco minutos. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se sometieron a un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 10 min. Luego se sumergieron en hipoclorito de sodio al 25 % (v/v) durante 15 minutos y fueron lavadas varias veces con agua destilada estéril. Seguidamente, las semillas fueron colocadas en placas con Agar-Agua (0.75 %) (m/v) e incubadas a 28°C en la oscuridad durante 24 h. Las semillas con raíces emergentes (de aproximadamente 1-2 cm) se colocaron en frascos de 200 mL (5,5 cm de diámetro y 12,0 cm de altura) que contenían 50 mL de medio Norris y Date (12), a razón de una semilla por frasco. Tres días después, se inocularon las raíces de las plantas con 1 mL de inóculo de los diferentes aislados y cepas comerciales en medio YEM líquido a pH 6.8, con una $A=0.1$ (medida a $\lambda=600$ nm), correspondiente a una concentración celular de 10^7 - 10^8 UFC.mL⁻¹. Fue utilizado un tratamiento control que no fue inoculado.

Las plantas crecieron en condiciones controladas, con un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad, a una temperatura día/noche de 26/22°C y humedad relativa del 70 %. Cuatro semanas después, se determinó: número de nódulos en raíz principal, nodulación total, efectividad de los nódulos y la masa seca de los nódulos en raíz principal (g). La efectividad de los nódulos fue determinada mediante el método visual detectando o no la presencia de una coloración rojiza en el interior de cada nódulo, característico de la proteína leghemoglobina (15). Para ello se realizó la disección de cada uno de los nódulos con la utilización de hojas de bisturí de acero inoxidable.

DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los ensayos de nodulación *in vitro* se realizaron dos veces. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado,

utilizando 10 réplicas por tratamiento. Los datos obtenidos fueron sometidos a la prueba de normalidad (test de Bartlett) y homogeneidad de varianza (test de Kormogorov-Smirnov) y se aplicó análisis de varianza de clasificación simple, utilizando el Test de comparación de medias de Tukey para $p<0.05$ para discriminar diferencias entre las medias (16). Los datos obtenidos fueron graficados utilizando el programa SigmaPlot 2001.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFO-CULTURALES Y FISIOLÓGICAS

Mediante la tinción de Gram se observó que la morfología de las células y sus características tintoriales se correspondían con las descritas para el grupo de los rizobios. En todos los aislados se observaron bacilos finos, Gram negativos, de tamaño pequeño y sin presencia de esporas (17).

En la Tabla II se muestran las características morfo-culturales y fisiológicas estudiadas de los 12 aislados y de las cepas comerciales. Del total de aislados, cinco presentaron un rápido crecimiento (dos-tres días) en medio YEM. Estos aislados se caracterizaron por formar colonias grandes y medianas, circulares, convexas, con bordes regulares, brillantes y de textura lisa y con un leve color rosado en el centro y más translúcidas hacia los bordes. Además se observó la excreción de mucus y ácido al medio de cultivo que fue detectado por el cambio de coloración del mismo (de verde a amarillo).

Las características morfo-culturales presentes en estos aislados, así como la excreción de sustancias ácidas al medio de cultivo, han sido descritas para los géneros *Rhizobium/Sinorhizobium*, pertenecientes a la familia Rhizobiaceae (14). Mediante la caracterización realizada en este trabajo no fue posible diferenciar entre estos dos géneros, debido a la cercanía filogenética que existe entre los mismos. En este caso se requiere emplear técnicas de taxonomía polifásica que incluye estudios moleculares que permiten el estudio de los genes cromosomales, los cuales son comunes del genoma básico para su propia ubicación filogenética; de los genes involucrados en la fijación biológica de nitrógeno, para establecer relaciones con otras bacterias fijadoras de nitrógeno ya que es una característica ancestral de amplio espectro filogenético y el estudio de los genes de la nodulación, los cuales son marcadores de la coevolución de los rizobios con su hospedero, así como de su origen biogeográfico (10).

El resto de los aislados en estudio (siete) resultaron tener un lento crecimiento en medio YEM (cinco-siete días). Las colonias se caracterizaron por ser pequeñas, circulares, con los bordes regulares y por presentar un color translúcido y en ocasiones blanco hacia el centro. Además se identificaron por su escasa o ninguna producción de mucus y la excreción de base al medio, lo cual se evidenció por el cambio de coloración de verde a

Tabla II. Características morfo-culturales y fisiológicas de los aislados de rizobios y las cepas comerciales provenientes de *Canavalia ensiformis*

Material microbiano	Morfología de la colonia			Tasa de crecimiento en medio YEM	Producción de ácido-base	Posible distribución taxonómica
	Tamaño de la colonia (mm)	Color	Aspecto			
Aislados						
Can2	2-4	semitranslúcidas	mucosas	+	ácido	<i>Rhizobium/Sinorhizobium</i>
Can3	2-4	semitranslúcidas	mucosas	+	ácido	<i>Rhizobium/Sinorhizobium</i>
Can4	2-4	semitranslúcidas	mucosas	+	ácido	<i>Rhizobium/Sinorhizobium</i>
Can5	2-4	semitranslúcidas	mucosas	+	ácido	<i>Rhizobium/Sinorhizobium</i>
Can6	2-4	semitranslúcidas	mucosas	+	ácido	<i>Rhizobium/Sinorhizobium</i>
CP2	< 1	blancas	secas	-	base	<i>Bradyrhizobium</i>
CP3	< 1	blancas	secas	-	base	<i>Bradyrhizobium</i>
CP5	< 1	blancas	secas	-	base	<i>Bradyrhizobium</i>
CP8	< 1	blancas	secas	-	base	<i>Bradyrhizobium</i>
CP10	< 1	blancas	secas	-	base	<i>Bradyrhizobium</i>
CP12	< 1	blancas	secas	-	base	<i>Bradyrhizobium</i>
CP13	< 1	blancas	secas	-	base	<i>Bradyrhizobium</i>
Cepas						
BR 2001	< 1	blancas	secas	-	base	<i>Bradyrhizobium</i>
BR 2003a	2-4	semitranslúcidas	mucosas	+	ácido	<i>Rhizobium</i>

(+) rápido crecimiento (dos a tres días), (-) lento crecimiento (cinco-siete días)

azul. Todas estas características morfo-fisiológicas coinciden con lo descrito para el género *Bradyrhizobium* (14), por lo cual pudiera considerarse estos aislados como posibles miembros de este género.

Fue posible comparar los aislados en estudio con dos cepas comerciales empleadas en la confección de inoculantes para el cultivo de la canavalia, la cepa BR 2001 perteneciente al género *Bradyrhizobium* y la cepa BR 2003a perteneciente al género *Rhizobium*. Todos los aislados de lento crecimiento presentaron similitud en cuanto a las características morfo-culturales y fisiológicas estudiadas con la cepa comercial BR 2001, mientras que los aislados Can2, Can3, Can4, Can5 y Can6, de rápido crecimiento, resultaron similares a la cepa BR 2003a. Esto confirma la posible ubicación asignada a los aislados en este estudio.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos, resulta evidente la presencia de diversos géneros de rizobios como simbioses de una misma leguminosa (canavalia), ya que se obtuvieron posibles miembros del género *Bradyrhizobium* y de la familia Rhizobiaceae (*Rhizobium/Sinorhizobium*), lo que evidencia la inespecificidad de este cultivo. En este sentido, se clasifica a *Canavalia ensiformis* como promiscua y efectiva con un amplio rango de especies de rizobios (18). Esta característica ha sido descrita también para *Phaseolus unguiculata* (frijol caupí), en la cual se ha encontrado la presencia de especies de *Bradyrhizobium* y *Rhizobium*, como simbioses de este cultivo (19).

ENSAYO DE NODULACIÓN *IN VITRO*

Los aislados de rizobios de rápido crecimiento, posibles miembros del género *Rhizobium*, Can2, Can3, Can4, Can5 y Can6 (datos no mostrados) no reflejaron la capacidad de producir nodulación en las plantas de siratro, utilizada como modelo para el estudio de la interacción simbiótica rizobio-leguminosa.

Dentro de las posibles causas que pudieran explicar este fenómeno están las de tipo genético o de tipo ecológico. A diferencia del género *Bradyrhizobium* donde los genes de la nodulación y los que garantizan la fijación del nitrógeno son genes cromosómicos, en el género *Rhizobium* estos genes son extracromosómicos pues se localizan en determinados plásmidos (20). Estos paquetes genómicos pueden transferirse mediante mecanismos de conjugación, provocando la pérdida de la capacidad de nodulación de la bacteria (21). Desde el punto de vista ecológico, en la literatura se ha hecho referencia a determinados factores bióticos y abióticos que ejercen diferentes efectos sobre la capacidad de nodulación de las poblaciones de rizobios.

Dentro de los factores bióticos se encuentran la producción de antibióticos y bacteriocinas, número y tipos de microorganismos residentes y la predación selectiva por protozoos, mientras que entre los factores abióticos se numeran las limitaciones de nutrientes, contenido de materia orgánica, disponibilidad de agua, salinidad, temperatura y la acidez del suelo (22). Los suelos de la

región de Cascajal son conocidos por su acidez (23) lo que, unido a otros factores, tanto bióticos como abióticos pudieran también haber provocado la pérdida de la capacidad de nodulación de estos aislados bacterianos.

En adición se ha informado acerca de la selección que ejerce la acidez de los suelos sobre las poblaciones de rizobios, lo que favorece al tipo de especie más adecuada para la simbiosis en dependencia de su tolerancia a este factor (24).

En la Figura 1 se muestra el número de nódulos totales (A) y número de nódulos efectivos totales (B), obtenidos al inocular los diferentes aislados y cepas comerciales en plantas de siratro. Se observó que el mayor número de nódulos totales y efectivos totales se corresponde con aquellas plantas inoculadas con la cepa comercial BR 2003a perteneciente al género *Rhizobium*, diferenciándose significativamente del resto de los tratamientos en ambas variables. Aunque los aislados CP3, CP8, CP10 y CP13, posibles miembros del género *Bradyrhizobium*, formaron una mayor cantidad de nódulos en las plantas de siratro, en relación con la cepa comercial BR 2001 también de este género bacteriano, no se

observaron diferencias significativas entre estos tratamientos cuando fue analizado el número de nódulos efectivos totales por planta.

En la Figura 2 se muestra el número de nódulos (A) y el número de nódulos efectivos en la raíz principal (B). Se observó que las plantas que fueron inoculadas con los aislados CP5 y CP12 fueron las que presentaron un mayor número de nódulos en la raíz principal, en comparación con el resto de los aislados y las cepas comerciales BR 2003a y BR 2001. La presencia de nódulos en la raíz principal es uno de los criterios más importantes que se tienen en cuenta en los estudios de selección de cepas de rizobios, ya que se ha demostrado que aquellas plantas con abundantes nódulos en la raíz principal presentan un gran desarrollo radical y foliar, todo lo cual contribuye decisivamente a la producción de altos rendimientos en el cultivo. Debido a que es por la raíz principal por donde fluyen la mayor cantidad de nutrientes resultantes del metabolismo de la planta, los que son utilizados por los rizobios presentes en el interior de los nódulos; aquellos nódulos que se encuentran ubicados en esta parte del sistema radical son generalmente los que presentan una mayor actividad de fijación de nitrógeno (25).

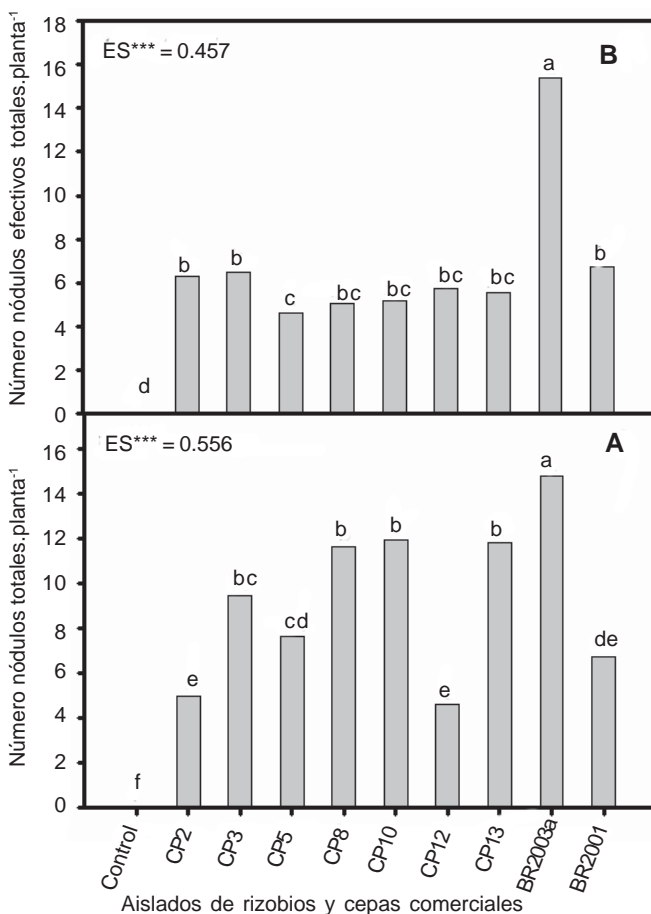


Figura 1. Número de nódulos totales (A) y número de nódulos efectivos totales (B), en plantas inoculadas con aislados de rizobios procedentes de canavalia y cepas comerciales para este cultivo

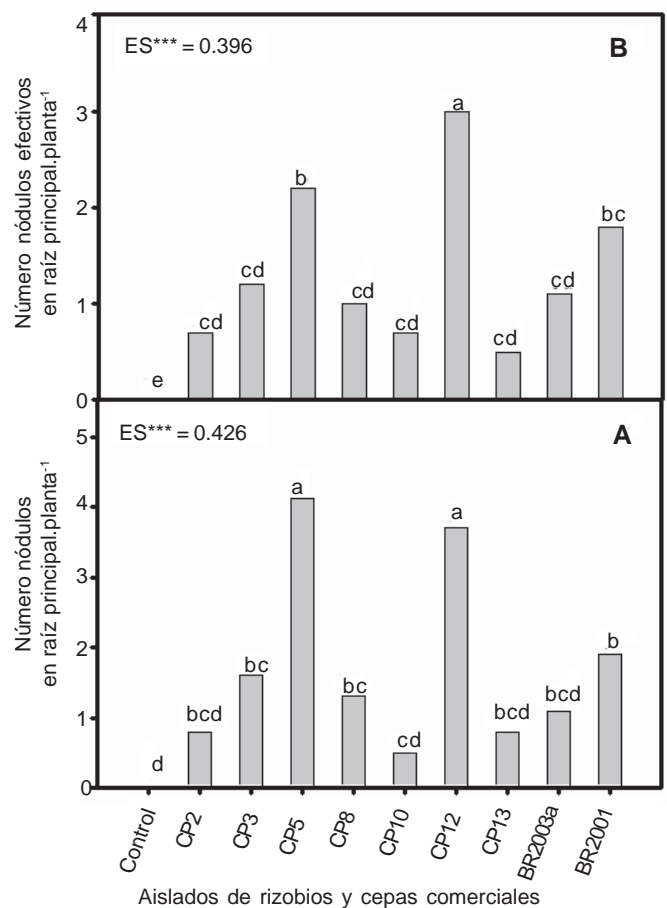


Figura 2. Número de nódulos (A) y número de nódulos efectivos en raíz principal (B), en plantas inoculadas con aislados de rizobios procedentes de canavalia y cepas comerciales para este cultivo

A pesar de que no se observaron diferencias significativas en el número de nódulos de las plantas inoculadas con CP5 en relación con las inoculadas con CP12, la eficiencia del proceso de nodulación en raíz principal, resultante de la diferencia en valor absoluto de nódulos formados y los efectivos, fue superior a un 90 % para el aislado CP12 mientras que para CP5 fue entre un 45 y un 55 %, resultados superiores a los observados para ambas cepas comerciales en esta variable.

Es necesario destacar que aunque la cepa comercial BR 2003a formó una mayor cantidad de nódulos totales en las plantas de siratro en comparación con los aislados CP5, CP8 y CP12, la masa seca de los nódulos de las plantas tratadas con estos aislados fue mayor que la masa seca de los nódulos de las tratadas con la cepa comercial (Figura 3). Esto es lógico si se tiene en cuenta que entre un 90 y un 95 % de los nódulos formados por la cepa BR 2003a se encontraron en las raíces secundarias mientras que para el aislado CP5 solo se encontraron en estas raíces de un 45 a un 50 % de los nódulos y para el caso de CP12 casi el 100 % de los nódulos totales estaban localizados en la raíz principal.

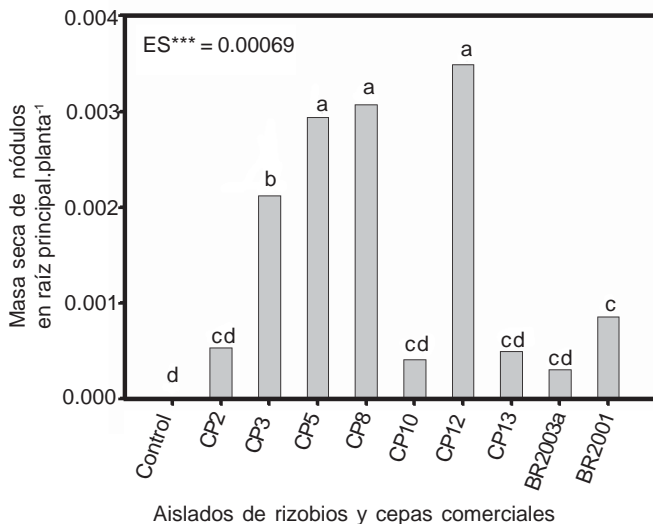


Figura 3. Masa seca (g) de nódulos en la raíz principal de plantas de siratro inoculadas con aislados procedentes de la leguminosa canavalia y cepas comerciales de este cultivo

A pesar de que el aislado CP8 produjo un menor número de nódulos totales y efectivos en raíz principal, en comparación con los producidos por los aislados CP5 y CP12 no se observaron diferencias significativas en la masa seca de estos nódulos entre estos tratamientos. Esto indica que los nódulos que produce CP8 en la raíz principal de las plantas son de mayor tamaño que los que se producen por CP5 y CP12.

El análisis de las variables estudiadas en este ensayo nos permitió distinguir algunas de las potencialidades de estos aislados de rizobios en relación con las cepas comerciales pues constituyen microorganismos nativos

de la región de La Palma, Pinar del Río, adaptados a las condiciones presentes en esos suelos, lo cual no se cumple para las cepas comerciales. Es por ello que debemos enfocar nuestra atención en la utilización de estos microorganismos como posibles inoculantes, aprovechando las adaptaciones que han desarrollado estas bacterias a los factores limitantes presentes en estos suelos, lo cual les permite ser más competitivos en la interacción simbiótica con la planta huésped.

CONCLUSIONES

Los aislados de rizobios CP5 y CP12 constituyen cepas promisorias nativas de los suelos de La Palma, Pinar del Río, para la elaboración de un biofertilizante que permita el mejor establecimiento de Canavalia en estas regiones.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la técnico de laboratorio Alicia Hernández y a la auxiliar Magalis Rivera por haber contribuido decisivamente a la obtención de los resultados durante este estudio.

REFERENCIAS

- Lamela, L.; López, O.; Sánchez, T. /et al./ Efecto del sistema silvopastoril en el comportamiento productivo de vacas Holstein. *Pastos y Forrajes*, 2009, vol. 32, p. 175.
- Simón, L.; López, O. y Álvarez, D. Evaluación de vacas de doble propósito de genotipos Holstein x Cebú en sistemas de pastoreo arborizado. I. Primíparas. *Pastos y Forrajes*, 2010, vol. 33, no.1. p. 1-2.
- Sánchez, S.; Crespo, G.; Hernández, M. /et al./ Factores bióticos y abióticos que influyen en la descomposición de la hojarasca en pastizales. *Pastos y Forrajes*, 2008, vol. 31, no. 2, p. 1.
- Crespo, G. Recuperación de la fertilidad del suelo en áreas ganaderas degradadas. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 2009, vol. 43, no. 4, p. 355.
- Kantar, F.; Shivakumer, B. G.; Arrese-Igor, C. /et al./ Climate change and management of cool season grain legume crops. Efficient biological nitrogen fixation under warming climates. 2010. p. 283-306.
- Puertas, F.; Arévalo, E.; Zúñiga, L. /et al./ Establecimiento de cultivos de cobertura y extracción total de nutrientes en un suelo de trópico húmedo en la amazonia Peruana. *Ecología Aplicada*, 2008, vol. 7, p. 1-2.
- Crespo, G.; Ruiz, T. E. y Álvarez, J. Efecto del abono verde de *Tithonia (T. diversifolia)* en el establecimiento y producción de forraje de *P. purpureum* vc. Cuba CT-169 y en algunas propiedades del suelo. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 2011, vol. 45, no. 1, p. 79.
- Martín, G. M.; Rivera, R.; Arias, L. /et al./ Efecto de la *Canavalia ensiformis* y micorrizas arbusculares en el cultivo del maíz. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 2009, vol. 43, no. 2, p. 1-2.

9. Córdova-Sánchez, S.; Castelán-Estrada, M.; Salgado-García, S. /et al./ Fijación biológica de nitrógeno por tres fabáceas (Leguminosae) en suelos ácidos de Tabasco, México. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 2011, vol. 15, no. 1, p. 31-50.
10. Ezura, H.; Nukui, N.; Yuhashi, K. I. /et al./ In Vitro plant regeneration in *Macroptilium atropurpureum*, a Legume with a broad symbiont range for nodulation. *Plant Science*, 2000, vol. 159, p. 21-27.
11. Silva, A.; Simão, R.; Nóbrega, A. /et al./ Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). *Plant Soil*, 2009, vol. 309, p. 127-145.
12. Norris, D. O. y Daves, R. A. Legume bacteriology Tropical Pasteur Reserch. Principles and Methods. C. A. B. Bill, 1976. vol 51, p 134-174.
13. Vincent, J. M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria /J.M Vincent. - En: International Programme Handbook. No. 15. Blackwele scientific publications, Oxford, England, 1970.
14. Wang, T.; Romero-Martínez, J. y López-Lara, I. *Rhizobium* y su destacada simbiosis. In E. Martínez-Romero y J. Martínez-Romero (eds.). Microbios. Centro de investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 2001.
15. Rodríguez, M. y López, M. Evaluación de la fertilización del frijol con cepas nativas de *Rhizobium* aislados de un ultisol de la altiplanicie del estado guarico. *Agronomía Tropical*, 2009, vol. 59, no. 4. p. 381-386.
16. Sigarrosa, A. Biometría y Diseño Experimental. Primera parte. Editorial Pueblo y Educación. Ciudad de La Habana, Cuba, 1985. p. 319-328.
17. Garrity, G. M. y Holt, J. G. The road map to the manual. Bergey's Manual of systematic bacteriology. Second Edition, vol. I. (Eds. Boone, D. R., Castenholz, R. W. & Garrity, G. M.). Springer-Verlag, New York, USA, 2001. p. 119.
18. Beyra, A.; Matos, G.; Reyes, A. /et al./ Revisión taxonómica del género *Canavalia* DC. (Leguminosae-papilionoideae) en Cuba. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas*, 2004, vol. 28, no. 107, p. 157-175.
19. Cuadrado, B.; Rubio, G. y Santos, W. Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 2009, vol. 38, no. 1, p. 78-104.
20. Martínez-Romero, E. y Caballero-Mellado, J. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1996, vol. 2, p. 113-140.
21. Rogel, M. A.; Hernández-Lucas, I.; Kuykendall, L. D. /et al./ Nitrogen-fixing with Ensifer adhaerens harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, vol. 67, no. 7, p. 3264-3268.
22. Luyten, E. y Vanderleyden, J. Survey of genes identified in *Sinorhizobium meliloti* spp., necessary for the development of an efficient symbiosis. *European Journal Soil Biology*, 2000, vol. 36, no.1, p. 1-26.
23. González, Y.; Reino, J. y Machado, R. Dormancia y tratamientos pregermináticos en las semillas de *Leucaena* spp. cosechadas en suelo ácido. *Pastos y Forrajes*, 2009, vol. 32, no. 4, p. 2.
24. Morón, B.; Soria-Díaz, M. E.; Ault, J. /et al./ Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT 899. *Chemistry and Biology*, 2005, vol. 12, no. 9, p. 1029-1040.
25. McDermott, T. R. y Graham, P. H. *Bradyrhizobium japonicum* inoculant mobility, nodule occupancy, and acetylene reduction in the soybean root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, vol. 55, p. 2493-2498.

Recibido: 24 de noviembre de 2011

Aceptado: 6 de junio de 2012

¿Cómo citar?

Hernández Forte, Ionel; Pérez Hernández, Guianeya; Nápoles García, María C.; Rosales Genqui, Pedro R.; Baños Gordillo, Roberto y Ramírez Pedroso, Juan F. Selección de aislados de rizobios provenientes de nódulos de la leguminosa forrajera *Canavalia ensiformis*. *Cultivos Tropicales*, 2012, vol. 33, no. 3, p. 27-33. ISSN 1819-4087