



Efecto de cepas de *Bradyrhizobium* sp en la nodulación de mutantes de soya

Effect of *Bradyrhizobium* sp. strains in soybean mutant's nodulation

 María Caridad Nápoles García*,  Belkis Morales Mena,  Ionel Hernández Forte,  Rodolfo Guillama Alonso,  María Caridad González Cepero

Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700

RESUMEN: La soya es un cultivo de gran importancia por su valor nutritivo tanto para el hombre como para los animales, además de su uso en múltiples renglones económicos. Resulta imprescindible ampliar su producción en Cuba, para lo cual se trabaja en la selección de variedades productivas y adaptadas a las condiciones edafoclimáticas del país. Como leguminosa, la soya se asocia en una interacción simbiótica con bacterias de la familia de los rizobios, formando nódulos en sus raíces que permiten la fijación biológica del nitrógeno y que la planta pueda asimilarlo de esta manera. Entre los inoculantes más estudiados y validados en el mercado internacional se encuentran aquellos a base de *Bradyrhizobium*, y tienen como punto de partida la selección de cepas por su competitividad y eficiencia en la formación de nódulos activos. Este trabajo tuvo como objetivo: seleccionar cepas de *Bradyrhizobium* en función de su capacidad para formar nódulos en cultivares cubanos de soya. Se utilizaron cinco cepas de *Bradyrhizobium*, procedentes de la colección de bacterias del INCA, las que se inocularon sobre semillas de seis cultivares de soya obtenidos en el INCA mediante selección o inducción de mutaciones por rayos gamma. El análisis bifactorial de los factores cultivar y cepa permitió definir interacción entre ambos, destacándose la nodulación de los cultivares Cuvin 22 y Cui 99 cuando se inoculan con la cepa *B. elkanii* ICA 8001. Se comprobó, además, que las cepas residentes en el suelo nodulan todos los cultivares estudiados.

Palabras clave: simbiosis, *Glycine max*, bacteria, selección.

ABSTRACT: Soybean is a crop of great importance due to its nutritional value for both human and animals, in addition to its use in multiple economic lines. It is essential to expand its production in Cuba, for which work is being done on the selection of productive varieties adapted to the country's soil and climate conditions. As a legume, soybeans associate in a symbiotic interaction with bacteria of the rhizobia family, forming nodules on their roots that allow the nitrogen biological fixation and that way supply it to the plant. Among the most studied and validated inoculants in the international market are those based on *Bradyrhizobium*, and their starting point is the strains selection for their competitiveness and efficiency in the formation of active nodules. The objective of this work was to select *Bradyrhizobium* strains based on their ability to form nodules in Cuban soybean cultivars. Five strains of *Bradyrhizobium*, from the INCA bacteria collection, were used. They were inoculated on seeds of six soybean cultivars obtained by selection or mutations by gamma rays induction. A bifactorial analysis with the cultivar-strain factors was carried out. The results showed interaction between the factors, also that the resident strains nodulate all the cultivars studied, and that the interaction of *B. elkanii* ICA 8001 strain with the cultivars Cuvin 22 and Cui 99 was highlighted.

Key words: Symbiosis, *Glycine max*, rhizobia, selection.

*Autor para correspondencia: tere@inca.edu.cu

Recibido: 21/11/2022

Aceptado: 27/01/2024

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución de los autores: **Conceptualización-** María Caridad Nápoles García, Ionel Hernández Forte, María Caridad González Cepero. **Investigación-** María Caridad Nápoles García, Belkis Morales Mena, Ionel Hernández Forte, Rodolfo Guillama Alonso.

Metodología y escritura del borrador inicial- María Caridad Nápoles García, Belkis Morales Mena, Ionel Hernández Forte. **Escritura, edición final y curación de datos-** María Caridad Nápoles García, Ionel Hernández Forte, Belkis Morales Mena.

Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



INTRODUCCIÓN

La soya (*Glycine max* (L.) Merrill) se encuentra entre los diez cultivos de mayor importancia en el mundo (1), con un área cultivable de más de 53 millones de hectáreas (2), conocida por su amplia gama de aplicaciones agrícolas, alimentarias e industriales, así como por sus beneficios para la salud (3). En Cuba, aún no se ha logrado cultivar en grandes extensiones; sin embargo, se continúa trabajando en seleccionar y desarrollar genotipos nacionales y foráneos que se adapten a las condiciones edafoclimáticas del país y que tengan buenas potencialidades productivas. Un modo de obtener nuevos cultivares con propiedades deseables desde el punto de vista agrícola, como es un mayor potencial de rendimiento y mayor adaptabilidad a condiciones de estrés abiótico, es la inducción de mutaciones mediante el uso de rayos gamma. El empleo de este método ha permitido obtener un conjunto de cultivares en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), los cuales se destacan por su resistencia a virosis y buenos rendimientos (4).

Las plantas de soya se asocian a bacterias noduladoras, dentro de las que se encuentran las del género *Bradyrhizobium*, mediante un intercambio de señales que da como resultado una estrecha relación en la que ambos simbioses se benefician (5). Los agricultores inoculan las semillas de soya con productos comerciales que contienen dichas cepas noduladoras, para asegurar altos rendimientos y sustituir el uso de fertilizante nitrogenado (6). Para ello, se seleccionan cepas afines al cultivo, que se destaquen por su capacidad de inducir la formación de nódulos y que presenten una alta actividad nitro fijadora en las condiciones edafoclimáticas imperantes (7).

La inoculación de cepas de rizobios más eficientes en la nodulación y la fijación de nitrógeno en cultivares de soya más productivos y adaptados, constituye una alternativa biotecnológica atractiva para la producción de soya y para disminuir la fertilización del cultivo y los costos de producción. El presente trabajo tuvo como objetivo: seleccionar cepas de *Bradyrhizobium* en función de su capacidad para formar nódulos en seis cultivares cubanos de soya.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló en condiciones semicontroladas, con macetas que contenían 0,55 kg de suelo Ferralítico rojo. Se empleó un diseño completamente aleatorizado, se emplearon 10 plantas por tratamiento y el experimento se repitió dos veces.

Se emplearon seis cultivares obtenidos en el INCA, cuatro de ellos: Cuvi-02, Cuvi-22, Cuvi-84, Cuvi-99; por selección individual, a partir de mutantes procedentes del Instituto de Genética Agrícola de Vietnam. Los otros dos: Cuvin-22 y Cincuentenario, se obtuvieron por inducción de mutaciones con rayos gamma de ^{60}Co (200Gy).

Los cultivares de soya se inocularon con cinco cepas del género *Bradyrhizobium*, procedentes de diferentes países y conservadas en la colección de bacterias del departamento

de Fisiología y Bioquímica Vegetal, del INCA: *Bradyrhizobium elkani* ICA 8001 y *Bradyrhizobium* sp. S1 (Cuba); *Bradyrhizobium japonicum* E-109 (Argentina), *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (Estados Unidos) y *Bradyrhizobium elkani* 6134 (Bélgica). Todos con una concentración superior a 10^8 UFC mL.

Se realizó un arreglo bifactorial, donde los factores fueron: cultivar con seis niveles (Cuvi-02, Cuvi-22, Cuvi-84, Cuvi-99, Cuvin-22 y Cincuentenario) y el factor cepa con cinco niveles (*B. elkani* ICA 8001, *Bradyrhizobium* sp. S1, *B. japonicum* E-109, *B. japonicum* USDA110 y *B. elkani* 6134). A los 35 días post inoculación (dpi), se determinó: número de nódulos totales (u), efectividad nodular (%) y masa seca de nódulos totales (mg) por planta. Los datos se sometieron a la prueba de normalidad (test de Bartlett) y homogeneidad de varianzas (test de Kormogorov-Smirnov). Se aplicó análisis de varianzas de clasificación simple. Se utilizó el Test de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) para discriminar diferencias entre las medias. Se empleó el programa SPSS 21 para el procesamiento estadístico de los datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que hubo interacción entre los factores cepa de *Bradyrhizobium* y cultivar de soya, para las tres variables analizadas ($p \leq 0.05$). Aunque, en general, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en las variables que se analizaron, hubo algunos que se destacaron sobre otros. En el número de nódulos totales, se destacó el cultivar Cuvin 22 cuando se inoculó con las cepas ICA 8001, S1 y BJE-109; así como el cultivar Cuvi 22 inoculado con las cepas S1 y USDA 6134. Algo similar se constató en los valores de efectividad de nódulos para la fijación biológica de nitrógeno, con el empleo de la cepa S1 en el cultivar Cuvi 22 y el tratamiento no inoculado de ese mismo cultivar. Solo la inoculación de la cepa *B. elkani* ICA 8001 en los cultivares Cuvin 22 y Cuvi 99, produjo un efecto superior a la del tratamiento no inoculado en ambos cultivares en la masa seca de nódulos, lo que muestra una interacción más eficiente de esta cepa con estos cultivares. La masa seca nodular constituye un indicativo del contenido de bacteroides dentro del nódulo, por lo que mayor cantidad de estas células funcionales, debe incidir en un aporte superior de nitrógeno a la planta (8). La cepa *B. elkani* ICA 8001 se ha caracterizado por poseer atributos positivos como la capacidad de fijar nitrógeno, de producir fitohormonas como el ácido indol acético y poseer actividad de la enzima ACC desaminasa (9), lo cual le confiere ventajas en la promoción del crecimiento vegetal (Tabla 1).

Se evidenció un efecto de las cepas residentes en el suelo utilizado (Controles no inoculados), las cuales también mostraron la capacidad de asociarse a los cultivares en estudio y lograr resultados similares de nodulación a las que se inocularon. La eficiencia simbiótica de cepas naturalizadas con una mejor adaptación al ambiente, constituye un material genético promisorio para la selección de nuevos aislados (10), los que pudieran

Tabla 1. Efecto combinado de los factores cultivar de soya y cepa de *Bradyrhizobium* en variables de nodulación de plantas de soya en condiciones semicontroladas

Tratamientos (cultivar soya*cepa de <i>Bradyrhizobium</i>)	Nódulos totales (u)	Efectividad (%)	Masa seca nódulos totales (mg)
Cuvi 99*ICA8001	7.0 bc	7.0 abcdef	28.93 abcd
Cuvi 99*S1	4.6 bc	4.6 bcdef	19.70 abcdefg
Cuvi 99*USDA110	11.3 abc	8.3 abcdef	22.23 abcdefg
Cuvi 99*BJE-109	11.3 abc	10.3 abcdef	25.86 abcdef
Cuvi 99*USDA6134	8.0 abc	7.3 abcdef	11.30 bcdefg
Cuvi 99*no inoculado	0.6 c	0.3 f	2.86 fg
Cuvin 22*ICA 8001	12.6 ab	11.3 abcde	34.30 ab
Cuvin 22*S1	12.6 ab	12.0 abcd	30.63 abc
Cuvin 22*USDA110	6.0 bc	5.3 bcdef	18.33 abcdefg
Cuvin 22*BJE-109	13.0 ab	12.3 abc	27.16 abcd
Cuvin 22*USDA6134	6.3 bc	5.6 abcdef	17.16 abcdefg
Cuvin 22*No inoculado	5.3 bc	4.0 bcdef	6.02 cdefg
Cuvi 22*ICA 8001	11.0 abc	10.0 abcdef	37.900 a
Cuvi 22*S1	18.3 a	16.3 a	27.600 abcd
Cuvi 22*USDA110	6.0 bc	5.6 abcdef	26.967 abcd
Cuvi 22*BJE-109	5.0 bc	5.0 bcdef	14.367 bcdefg
Cuvi 22*USDA6134	2.3 ab	2.0 cdef	3.267 fg
Cuvi 22*No inoculado	13.0 bc	13.0 ab	34.133 ab
Cincuentenario*ICA 8001	6.0 bc	2.6 bcdef	9.333 cdefg
Cincuentenario*S1	4.3 bc	3.3 bcdef	22.933 abcdefg
Cincuentenario*USDA110	8.6 abc	1.6 cdef	27.967 abcd
Cincuentenario*BJE-109	7.3 abc	7.3 abcdef	11.100 bcdefg
Cincuentenario*USDA6134	7.3 abc	4.6 bcdef	16.433 abcdefg
Cincuentenario*No inoculado	2.0 bc	0.3 f	1.233 g
Cuvi 84*ICA 8001	6.6 bc	6.6 abcdef	23.833 abcdefg
Cuvi 84*S1	4.3 bc	2.6 bcdef	6.300 cdefg
Cuvi 84*USDA110	7.0 bc	6.0 abcdef	24.367 abcdefg
Cuvi 84*BJE-109	2.6 bc	1.3 def	7.200 cdefg
Cuvi 84*USDA6134	8.0 abc	6.6 abcdef	14.767 abcdefg
Cuvi 84*No inoculado	6.0 bc	1.0 ef	4.067 efg
ESx ANOVA	2.81	2.720	5.938

Se muestran las medias y el error estándar del Anova (ESx). Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas (Tukey HSD $p < 0.05$, $n=3$)

ejercer un efecto superior en la simbiosis con estos cultivares. Es importante considerar que no existen cepas indígenas o nativas en Cuba por no ser centro de origen de la soya. Sin embargo, las siembras sucesivas de esta leguminosa inoculada con rizobios introducidos, ha generado la aparición de cepas naturalizadas que han logrado adaptarse a las nuevas condiciones edafoclimáticas y que constituyen fuente de diversidad biológica para procesos de selección de cepas más efectivas en la fijación de N.

CONCLUSIONES

Las diferentes cepas mostraron un comportamiento similar en el número de nódulos y su efectividad sobre los seis cultivares de soya evaluados. Sólo se obtuvieron diferencias con la inoculación de *B. elkanii* ICA 8001 en los cultivares Cuvin 22 y Cuvi 99, con respecto a la no inoculación de los mismos. Todos los cultivares mostraron una predisposición positiva para asociarse con cepas inoculadas o residentes, lo que debe evaluarse en estudios posteriores en condiciones de campo.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto: Fortalecimiento de capacidades nacionales para el desarrollo de nuevas variedades mutantes para mejorar la seguridad alimentaria con menor impacto ambiental. Financiado por la OIEA.

BIBLIOGRAFÍA

- USDA. World Production, Markets, and Trade Reports. Browse Data y Analysis. Foreign Agricultural Service/ USDA Office of Global Analysis (blog). 2019. Available from: https://www.fas.usda.gov/data/search?search_api_views_fulltext=soybean
- Mammadov J, Buyyarapu R, Guttikonda SK, Parliament K, Abdurakhmonov IY, Kumpatla SP. Wild Relatives of Maize, Rice, Cotton, and Soybean: Treasure Troves for Tolerance to Biotic and Abiotic Stresses. *Front Plant Sci.* 2018; 28(9):886. doi: <http://doi.org/10.3389/fpls.2018.00886>.
- Cabanos C, Matsuoka Y, Maruyama N. Soybean proteins/ peptides: A review on their importance, biosynthesis, vacuolar sorting, and accumulation in seeds. *Peptides.* 2021; 143:170598. doi: <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2021.170598>.

4. González M C, Guillama R. CUVIN-22. Cultivar de soya (*Glycine max* Merrill) de grano negro. *Cultivos Tropicales*. 2021; 42(4, Supl.1), e02. Epub 30 de diciembre de 2021. Recuperado en 12 de octubre de 2022. Available from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362021000500002&lng=es&tlng=es.
5. Ferguson BJ, Mens C, Hastwell AH, Zhang M, Su H, Jones CH, Chu X, Gresshoff PM. Legume nodulation: The host controls the party. *Plant Cell Environ*. 2019; 42(1):41-51. doi: <http://doi.org/10.1111/pce.13348>. Epub 2018 Jun 21. PMID: 29808564.
6. Rong Li, Haifeng Chen, Zhonglu Yang, Songli Yuan, Xin'an Zhou. Research status of soybean symbiosis nitrogen fixation, *Oil Crop Science*, Volume 5, Issue 1, 2020, Pages 6-10, ISSN 2096-2428. Available from <https://doi.org/10.1016/j.ocsci.2020.03.005>.
7. Machaculeha A, Kyei-Boahen S, Guimarães M F, Nogueira M A, Hungria M. Isolation, characterization and selection of indigenous Bradyrhizobium strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2017; 246, Pages 291-305, <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.06.017>.
8. Bayou B, Nana E, Vincent L, Demelash K. Legume-rhizobium specificity effect on nodulation, biomass production and partitioning of faba bean (*Vicia faba* L.). *Sci Rep.*, 2021; 11: 3678. doi: <http://doi.org/10.1038/s41598-021-83235-8>.
9. Hernández I, Nápoles MC, Morales B. Caracterización de aislados de rizobios provenientes de nódulos de soya (*Glycine max* (L.)Merril) con potencialidades en la promoción del crecimiento vegetal. *Cultivos Tropicales*, 2015; 36 (1): 65-72.
10. Lagurara PF. Eficiencia simbiótica y capacidad competitiva de cepas de rizobios que nodulan soja en suelos con y sin historia del cultivo. [Tesis de Magíster en Ciencias Agrarias]. Montevideo, Uruguay; junio 2018. 90 p.