

Selection of *Bradyrhizobium sp.* isolates due to their effect on maize under agricultural drought conditions in Sancti Spíritus, Cuba

Selección de aislados de *Bradyrhizobium sp.* por su efecto en maíz en condiciones de sequía agrícola en Sancti Spíritus, Cuba

C. J. Bécquer¹, U. Ávila¹, Yaldreisy Galdo¹, Maribel Quintana¹, Orquidia Álvarez², Adelaida Puentes³, F. Medinilla and Analeidis Mirabal¹

¹Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, Estación Experimental Sancti Spíritus, Apdo. 2255, ZP. 1, C.P. 60100, Sancti Spíritus, Cuba

²Universidad "José Martí", Sancti Spíritus

³Centro Meteorológico Provincial Sancti Spíritus

Email: pastosp@enet.cu

A field experiment was conducted in Sancti Spíritus, Cuba, under agricultural drought conditions, in order to evaluate the effect of inoculation on maize with five *Bradyrhizobium sp.* isolates, from forage legumes of an arid cattle rearing ecosystem from Holguín, and to select the treatments with the best positive effect on the agro-productive variables. TGH maize variety was used. Isolates were grown in a solid yeast-mannitol medium and re-suspended in a liquid medium up to 10^6 – 10^8 cfu/mL. It was inoculated when the seed (6 days) was germinated with doses of 8-10 mL/plant. Conventional cultivation labors were carried out, with seeding rate of 12 kg/ha and a seeding frame of 50 cm between furrows. Each plot measured 2 m x 4 m and four irrigations were applied. An experimental design of random blocks was used, with 7 treatments and 3 replicates. The control was fertilized with NH_4NO_3 (150 kgN/ha), absolute control and 5 inoculated treatments. Differences between means were determined with LSD test of Fisher. The evaluated variables were aerial dry weight, increase of aerial dry weight regarding absolute control, stem length, grain yield, increase of grain yield with respect to absolute control and weight of 1000 seeds. It should be noted that the aerial dry weight increase regarding absolute control in Ho9 was 21 %. The increase of the grain yield with respect to the absolute control was 10 and 20 % in Ho13 and Ho5, respectively. It is concluded that Ho5 and Ho13 isolates had a positive effect on grain yield, and to a lesser extent, Ho1 and Ho9, in cob length and increase of aerial dry weight, respectively. Future field experiments, under conditions of drought with the Ho5 and Ho13 isolates, are recommended in different soil types of Sancti Spíritus province.

Key words: *Bradyrhizobium sp.*, agricultural drought, grain yield

Rhizobia are soil bacteria with potential to form specific structures in legume roots, called nodules. In effective nodules, bacteria, in the shape of bacteroides, fix the atmospheric nitrogen (N_2) in ammonia. This is assimilated by the plant for its growth, particularly in nutrient deficient soils. In exchange, bacteroides are supplemented with nutrients (predominantly dicarboxylic acids), and protected within the nodular structure (Zahran *et al.* 2012).

In addition to their importance in legume inoculation, rhizobia can also stimulate the growth and productivity of other plant families, like cereals (Mia *et al.* 2012). In Cuba, there is a history of the positive effect of rhizobia

Se llevó a cabo un experimento de campo en Sancti Spíritus, Cuba, en condiciones de sequía agrícola, para evaluar el efecto de la inoculación en maíz con cinco aislados de *Bradyrhizobium sp.*, procedentes de leguminosas forrajeras de un ecosistema ganadero árido de Holguín, y para seleccionar los tratamientos con mayor efecto positivo en las variables agroproductivas. Se utilizó la variedad TGH de maíz. Los aislados crecieron en medio sólido levadura-manitol y se resuspendieron en medio líquido hasta 10^6 – 10^8 UFC/mL. Se inoculó al germinar la semilla (6 días) con dosis de 8-10 mL/planta. Se realizaron labores convencionales de cultivo. Dosis de siembra: 12 kg/ha. Marco de siembra: 50 cm entre surcos. Cada parcela midió 2 m x 4 m. Se aplicaron 4 riegos. Diseño experimental de bloques al azar, con 7 tratamientos y 3 réplicas. Testigo fertilizado con NH_4NO_3 (150 kgN/ha), control absoluto y 5 tratamientos inoculados. Diferencias entre medias: LSD de Fisher. Se evaluaron las variables peso seco parte aérea, incremento del peso seco parte aérea con respecto al control absoluto, longitud del tallo, rendimiento de grano, incremento del rendimiento de grano con respecto al control absoluto y peso de 1000 semillas. Se destaca que el incremento del PSPA con respecto al control absoluto en Ho9 fue de 21 %. En el incremento del rendimiento de grano con respecto al control absoluto, se obtuvo 10 y 20% en Ho13 y Ho5, respectivamente. Se concluye que los aislados Ho5 y Ho13, tuvieron un efecto positivo en el rendimiento de grano, y en menor medida, Ho1 y Ho9, en longitud de la mazorca e incremento del peso seco aéreo, respectivamente. Se recomienda realizar futuros experimentos de campo en condiciones de sequía con los aislados Ho5 y Ho13, en diferentes tipos de suelo de la provincia Sancti Spíritus.

Palabras clave: *Bradyrhizobium sp.*, sequía agrícola, rendimiento de grano.

Los rizobios son bacterias del suelo con potencial para formar estructuras específicas en raíces de leguminosas, llamadas nódulos. En los nódulos efectivos, las bacterias, en forma de bacteroides, fijan el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio. Este se asimila por la planta para su crecimiento, particularmente en suelos deficientes en nutrientes. A cambio, los bacteroides son suplementados con nutrientes (predominantemente ácidos dicarboxílicos), y protegidos en el interior de la estructura nodular (Zahran *et al.* 2012).

Además de su importancia en la inoculación de leguminosas, los rizobios también pueden estimular el crecimiento y la productividad de otras familias de plantas,

on cereals of *Triticum*, and *Sorghum* genus and in *Zea mays* (Bécquer *et al.*, 2012a).

Occasionally, crop productivity is affected by various stressful environmental factors. It is known that drought-induced water stress limits crop growth and productivity, especially in arid and semi-arid areas (Yang *et al.* 2008). However, rhizobacteria may help plants to tolerate better drought effects. Among rhizobacteria, rhizobia have an important part in the induction of stress tolerance in plants (Stiens *et al.* 2006). According to Timmusk *et al.* (2014), bacteria that come from stressful environments have more possibilities to contribute to the development of this tolerance. Several action mechanisms may be used by bacteria to induce stress tolerance, including the action of the ACC-deaminase enzyme, which prevents the inhibitory action of ethylene in the plant under a water stress situation (Shaharoon *et al.* 2006). Other authors also refer to the activity of cytokinins and catalase, which act as antioxidants, or prevent the presence of other compounds that hinder the normal development of the plant subjected to water stress (Yang *et al.* 2008).

The objective of this study was to evaluate the effect of the inoculation in maize with five *Bradyrhizobium sp.* isolates from forage legumes in an arid cattle ecosystem of Holguín, in addition to selecting the treatments with the highest positive effect on agro-productive variables.

Materials and Methods

The isolates Ho9, Ho7, Ho13, Ho1 and Ho5, from forage legumes collected in an arid cattle rearing ecosystem of Holguín province, Cuba, were used. These isolates were characterized according to their phenotype in previous studies and showed high similarity with reference strains belonging to the *Bradyrhizobium sp.* genus.

The strains chosen for this study showed tolerance to stressing abiotic factors, such as acid or basic pH, high NaCl gradients and high temperatures, as well as catalase production.

Maize (*Zea mays* L.), TGH variety, was used, coming from the Empresa Provincial de Semillas of Sancti Spiritus. In this province, this cereal has a history of high yields when inoculated with rhizobia (Bécquer *et al.* 2011). In addition, it constitutes, together with grasses, one of the possible alternatives for animal feeding in Cuba.

The isolates were grown in a yeast-mannitol solid medium (Vincent 1970) and re-suspended in yeast-mannitol liquid medium up to a cell concentration of 10^6 - 10^8 cfu/mL. For plant inoculation, the inoculum was diluted in a proportion of 1:10 in a 0.9 % saline solution.

The inoculation was carried out at the germination of the seed (6 d) by irrigating the bacterial suspension on the plants, with a buret graduated at the rate of about 8-10 mL/plant. The re-inoculation of the treatments

como los cereales (Mia *et al.* 2012). En Cuba, existen antecedentes del efecto positivo de los rizobios en cereales del género *Triticum*, *Sorghum* y en *Zea mays* (Bécquer *et al.* 2012a).

En ocasiones, la productividad de los cultivos se afecta por diversos factores ambientales estresantes. Se sabe que el estrés hídrico que provoca la sequía limita el crecimiento y la productividad de los cultivos, especialmente en áreas áridas y semiáridas (Yang *et al.* 2008). Sin embargo, las rizobacterias pueden contribuir a que las plantas puedan tolerar mejor los efectos de la sequía. Entre las rizobacterias, los rizobios ocupan un lugar importante en la inducción de tolerancia a estrés en las plantas (Stiens *et al.* 2006). Según Timmusk *et al.* (2014), las bacterias que proceden de ambientes estresantes tienen más posibilidad de contribuir al desarrollo de esta tolerancia. Varios pueden ser los mecanismos de acción de las bacterias para inducir tolerancia al estrés, entre los que se encuentra la acción de la enzima ACC-diaminasa, que impide la acción inhibitoria del etileno en la planta en situación de estrés hídrico (Shaharoon *et al.* 2006). Otros autores se refieren también a la actividad de las citoquininas y catalasa, que actúan como antioxidantes, o que impiden la presencia de otros compuestos que obstaculizan el desarrollo normal de la planta sometida a estrés hídrico (Yang *et al.* 2008).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación en maíz con cinco aislados de *Bradyrhizobium sp.*, procedentes de leguminosas forrajeras de un ecosistema ganadero árido de Holguín, además de seleccionar los tratamientos de mayor efecto positivo en las variables agroproductivas.

Materiales y Métodos

Se utilizaron los aislados Ho9, Ho7, Ho13, Ho1 y Ho5, procedentes de leguminosas forrajeras colectadas en un ecosistema ganadero árido de la provincia Holguín, Cuba. Estos aislados se caracterizaron según su fenotipo en trabajos anteriores y presentaron alta similitud con cepas de referencia, pertenecientes al género *Bradyrhizobium sp.* Las cepas que se escogieron para este trabajo se caracterizaron por presentar tolerancia a factores abióticos estresantes, como pH ácido o básico, altos gradientes de NaCl y altas temperaturas, así como producción de catalasa.

Se utilizó maíz (*Zea mays* L.), variedad TGH, procedente de la Empresa Provincial de Semillas de Sancti Spiritus. En esta provincia, este cereal tiene antecedentes de altos rendimientos al inocularse con rizobios (Bécquer *et al.* 2011). Además constituye, unido a las gramíneas pratenses, una de las alternativas posibles para la alimentación animal en Cuba.

Los aislados crecieron en medio sólido levadura-manitol (Vincent 1970) y se resuspendieron en medio líquido levadura-manitol hasta concentración celular de 10^6 - 10^8 UFC/mL. Para la inoculación de las plantas, se diluyó el inóculo en proporción 1:10 en solución salina

was carried out at 15 d of sowing, with bacterial inoculum of the same title, in an approximate amount of 8-10 mL/plant.

Conventional cultivation labors (burring, harrowing, crossing, re-crossing, harrowing and furrowing) was carried out. The sowing of the experiment was carried out during the first ten days of February and was harvested in the fourth tens of April. Sowing rate was 12 kg/ha, with a spaced drilling. Sowing frame was 50 cm between rows and each plot measured 2 m x 4 m.

Four irrigations were immediately applied after inoculation (6 d), after reinoculation (15 d), at the beginning of flowering, and in the incipient formation of cobs. Each irrigation was applied at a rate of 100 m³/ha, so that it only favored the survival of the rhizospheric microorganisms that were introduced. At 90 d of sowing, the harvest was performed.

Four applications of *Bacillus thuringiensis* biovar. 26 were made, from 15 d of sowing, every 7 d, at a rate of 6 L/ha. The bio-preparation was applied with a sprinkler, which spout was directed to all the parts of the plant, with emphasis in the foliar region, in a dilution with water of 1:15 until arriving at 16 L of total volume, with initial title of 10⁹ spores/mL.

Data of temperature, precipitation, relative humidity and winds, as well as their analysis, were collected at the Sancti Spiritus Meteorological Station.

Precipitations occurred in the area of study had an irregular performance. During November, 2013, and May and June, 2014, they were similar to the historical values, while during December (7.0 mm), January (64.3 mm) and March (45.9 mm), they were inferior. They only surpassed the historical means in February and April, but with less significant records (figure 1a).

Figure 1b shows the temporary distribution of tens rain accumulates. It is observed that, from the third tens of March, there were precipitations during the rest of the tens. The highest records were focused on May and June.

Climate was characterized by high temperatures, mainly in March and April, although low temperatures were considered as cold and very cold. Relative humidity was high, mainly in February and May (table 1).

The state of agricultural drought was determined through aridity index or agricultural drought index (IE) (Solano and Vázquez. 1999):

$$IE = ETR / ETP,$$

where:

E o ETR – estimated real evapotranspiration, depending on the humidity of soil

Eo o ETP- estimated potential evapotranspiration, depending on atmospheric conditions

When ETR = ETP, soil water provision is adequate. When ETR < ETP, there is an insufficiency of water.

January, in the area of study, ended with a critical to insufficient IE, which had a slight improvement in February and March (regular). Therefore, under these

0.9 %.

La inoculación se realizó al germinar la semilla (6 d) mediante el riego de la suspensión bacteriana sobre las plantas, con una bureta graduada a razón de unos 8-10 mL/planta. La reinoculación de los tratamientos se efectuó a los 15 d de siembra, con inóculo bacteriano del mismo título, en una cantidad aproximada de 8-10 mL/planta.

Se realizaron labores convencionales de cultivo (roturación, grada, cruce, recuce, grada y surcado). La siembra del experimento se realizó en la primera decena de febrero y se cosechó en la cuarta decena de abril. La dosis de siembra fue de 12 kg/ha, a chorrillo espaciado. El marco de siembra fue de 50 cm entre surcos. Cada parcela midió 2 m x 4 m.

Se aplicaron cuatro riegos, inmediatamente después de la inoculación (6 d), después de la reinoculación (15 d), al comienzo de la floración, y en la formación incipiente de las mazorcas. Cada riego se aplicó a razón de 100 m³/ha, de forma que solo favoreciera la supervivencia de los microorganismos rizosféricos que se introdujeron. A los 90 d de siembra, se realizó la cosecha.

Se realizaron cuatro aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* biovar. 26, a partir de los 15 d de siembra, cada 7 d, a razón de 6 L/ha. El biopreparado se aplicó con un aspersor, cuyo surtidor fue dirigido a todas las partes de la planta, con énfasis en la región foliar, en una dilución con agua de 1:15 hasta llegar a 16 L de volumen total, con título inicial de 10⁹ esporas/mL.

Los datos de temperatura, precipitaciones, humedad relativa y vientos, así como su análisis, se colectaron en la Estación Meteorológica Sancti Spiritus.

Las precipitaciones que ocurrieron en la zona de estudio tuvieron un comportamiento irregular. Durante noviembre de 2013 y mayo y junio de 2014 fueron similares a los valores históricos, mientras que durante diciembre (7.0 mm), enero (64.3 mm) y marzo (45.9 mm) resultaron muy inferiores. Solamente superaron los promedios históricos en febrero y abril, pero con registros poco significativos (figura 1a).

En la figura 1b se muestra la distribución temporal de los acumulados decenales de lluvias. Se observa que a partir de la tercera decena de marzo precipitó en todas las decenas siguientes. Los mayores registros se concentraron en mayo y junio.

El clima se caracterizó por el predominio de altas temperaturas, sobre todo en marzo y abril, aunque las temperaturas mínimas se catalogaron de frías y muy frías. La humedad relativa fue alta, predominantemente en febrero y mayo (tabla 1).

El estado de la sequía agrícola se determinó mediante el índice de aridez o índice de sequía agrícola (IE) (Solano y Vázquez. 1999):

$$IE = ETR / ETP,$$

donde:

E o ETR - Evapotranspiración real estimada,

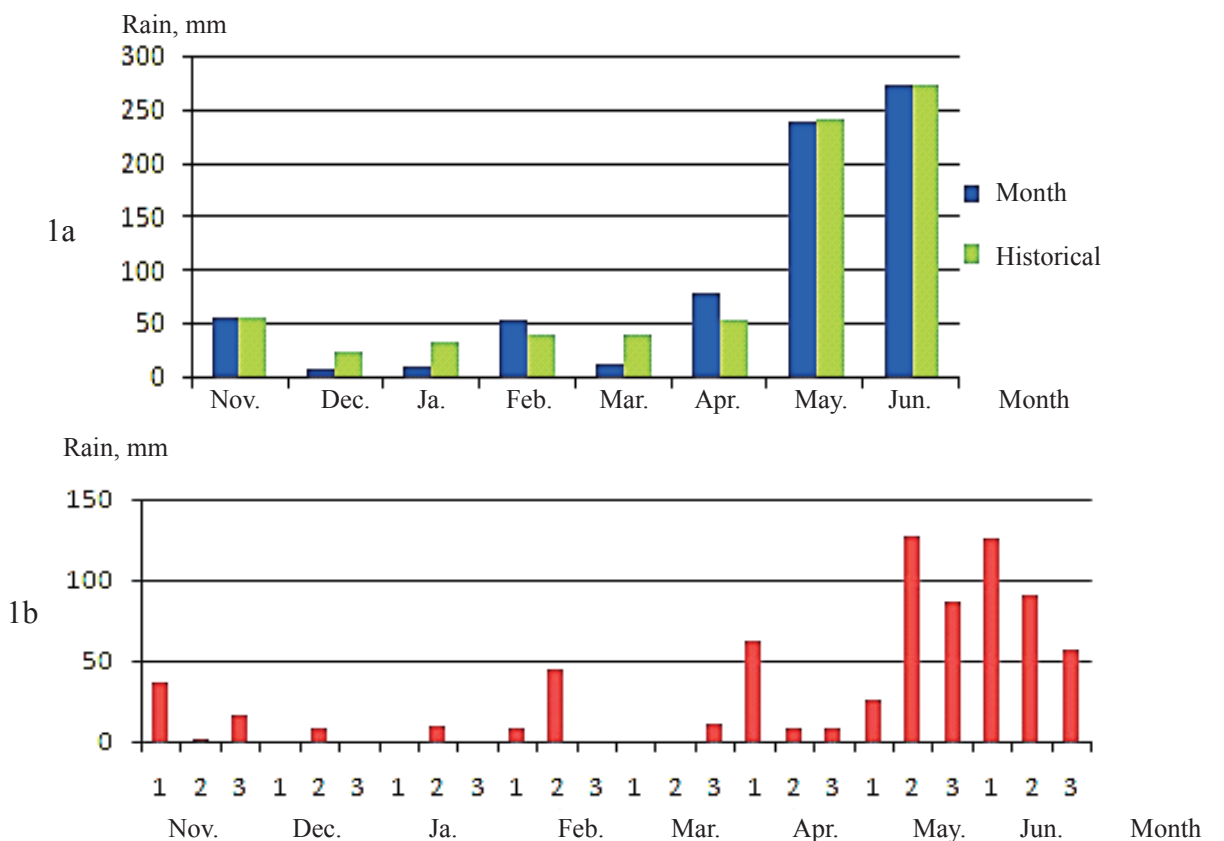


Figure 1: Distribution of precipitations per months (1a), and per tens (1b) from November/2013 to June/2014. The experimental period is included in a color frame

Table 1: Data of temperature and humidity in the experimental area. Year 2014

Month	Mean Temperature	Absolute Max. Temperature	Absolute Min. Temperature	Average Relative Humidity (%)
February	23.9	31.8	15.0	77.6
March	24.1	34.0	12.5	71.0
April	25.3	34.5	15.4	71.7
May	25.3	33.5	18.8	78.9

conditions, the crop was developed under a great water stress (Solano and Vázquez 1999).

In the experiment, irrigation was applied four times, twice during February, one in March, and another in April, at a rate of 100 m³/ha in each irrigation, only to favor the survival of the introduced rhizosferic microorganisms. This irrigation frequency only constitutes 13 % of the average number of irrigation, as well as 22.5 % of the total volume (1775.4 m³/ha), used by Montero *et al.* (2012) in the cropping of maize.

The soil of experimentation area was carbonated mollified brown soil, from brown clay to slightly dark brown, with a slight reaction to HCl, and shows some gravels in the A1 horizon, good superficial and internal drainage, with erosion (Hernández *et al.*, 2015). The content of macronutrients was low in phosphorus and potassium (table 2) (2.63 mg/100 g of P₂O₅; 6.0 mg/100 g of K₂O), as well as that of organic matter (1.51 %), con pH de 5.9.

dependiente del estado de humedad del suelo.

EO o ETP- Evapotranspiración potencial estimada, dependiente de las condiciones atmosféricas.

Cuando ETR = ETP, el aprovisionamiento de agua del suelo es adecuado. Cuando ETR < ETP, hay insuficiencia de agua.

Enero, en el área de estudio, culminó con IE de crítico a insuficiente, lo que mejoró ligeramente en febrero y marzo (regular). Por lo que se considera que, en estas condiciones, el cultivo se sometió a un gran estrés hídrico (Solano y Vázquez 1999).

En el experimento, el riego se aplicó cuatro veces, dos veces durante febrero, una en marzo, y otra en abril, a razón de 100 m³/ha en cada riego. De tal forma que solo favoreciera la supervivencia de los microorganismos rizosféricos que se introdujeron. Esta frecuencia de riego, solo constituye 13 % del número promedio de riegos, así como 22.5 % del volumen total (1775.4 m³/ha), utilizado por Montero *et al.* (2012) en el cultivo de maíz.

El suelo del área experimental correspondió al

Due to the poor content of nutrients in the soil, a fertilization was performed (N: 9, P: 13, K: 17) at 21 d of sown, to all treatments, with doses of 80 kgN/ha.

An experimental design of random blocks was applied, with 7 treatments and 3 replications (table 3).

The fertilized control consisted on the application of nitrogen of 150 kg/ha (NH_4NO_3). Data was statistically processed according to the analysis of variance

tipo pardo mullido carbonatado, de arcilla parda a pardo ligeramente oscuro, con reacción ligera al HCl, presenta algunas gravas en el horizonte A1, buen drenaje superficial e interno, medianamente erosionable (Hernández *et al.*, 2015). El contenido de macronutrientes fue bajo en fósforo y potasio (tabla 2) (2.63 mg/100 g de P_2O_5 ; 6.0 mg/100 g de K_2O), así como el de materia orgánica (1.51 %), con pH de 5.9.

Debido al pobre contenido en nutrientes del suelo, se realizó fertilización de fondo (N: 9, P: 13, K: 17) a los 21 d

Table 2. Basic characteristics of the soil in the collecting site

Type of soil	P_2O_5 , mg/100g	K_2O , mg/100g	O.M., %	pH (KCl)	Ccc, me/100 g	Ca/Mg relationship
Carbonated mollified brown soil (Hernández <i>et al.</i> 2015)	2.63	6.0	1.51	5.9	22.1	3.0

Table 3. Used treatments

No.	Treatments
1	Ho9
2	Ho7
3	Ho13
4	Ho1
5	Ho5
6	Absolute control
7	Fertilized control

(ANOVA) (StatGraphics Plus, v. 5.1, 1994-2001, Statistical Graphics Corporation). Differences among means were determined by LSD (Least Significant Difference) test of Fisher ($P < 0.05$) (Fisher 1935).

The evaluated agro-productive variables were aerial dry weight (ADW, g/m^2), increase of ADW regarding absolute control (IADW, %), stem length (SL, m), grain yield (GY, kg/ha, extrapolated), increase of grain yield regarding absolute control (IGY, %), cob length (CL, cm), cob dry weight (CDW, g) and weight of 1000 grains (W1000G, g).

Results and Discussion

Aerial dry weight and increase of aerial dry weight. Table 4 shows that, in ADW, inoculated treatments showed superscripts similar to absolute control (1.9 g/m^2), while the fertilized control (2.5 g/m^2) showed statistical superiority ($P < 0.05$), regarding Ho5, Ho1, Ho13 and Ho7, as well as superscripts similar to absolute control and Ho9. These results may respond to the conditions of water stress in which the experiment was developed, mainly in the first phenological phases of the plant, from February to April (50-80 mm of rain) (figure 1a) and 71-77.6 % of humidity (table 1). Recorded levels of humidity should have implied

de siembra a todos los tratamientos, con dosis de 80 kgN/ha.

Se aplicó un diseño experimental de bloques al azar, con siete tratamientos y tres réplicas (tabla 3).

El testigo fertilizado consistió en aplicación de nitrógeno de 150 kg/ha (NH_4NO_3). Los datos se procesaron estadísticamente, según el análisis de varianza (ANOVA) (StatGraphics Plus, v. 5.1, 1994-2001, Statistica Graphics Corporation). Las diferencias entre medias se determinaron por la prueba LSD (Least Significant Difference) de Fisher ($P < 0.05$) (Fisher 1935).

Se evaluaron las variables agroproductivas: peso seco parte aérea (PSPA, g/m^2), incremento del PSPA con respecto al control absoluto (IPSPA, %), longitud del tallo (LT, m), rendimiento de grano (RG, kg/ha, extrapolado), incremento del rendimiento de grano con respecto al control absoluto (IRG, %), longitud de la mazorca (LM, cm), peso seco de la mazorca (PSM, g) y peso de 1000 granos (P10000G, g).

Resultados y Discusión

Peso seco aéreo e incremento del peso seco aéreo. En la tabla 4 se muestra que en el PSPA los tratamientos inoculados presentaron superíndices comunes con el control absoluto (1.9 g/m^2), mientras que el testigo fertilizado (2.5 g/m^2) presentó superioridad estadística ($P < 0.05$) con respecto a Ho5, Ho1, Ho13 y Ho7, así

the increase of plant evapotranspiration, which increases water demand and, consequently, generates higher water stress in crops (Solano and Vázquez 1999).

Nevertheless, the increase of ADW regarding absolute control in the treatment inoculated with Ho9 was 21 %, which, although it was obtained under conditions of agricultural drought stress, surpassed the

como superíndices comunes con control absoluto y Ho9. Estos resultados pudieran responder a las condiciones de estrés hídrico en las que se desarrolló el experimento, sobre todo en las primeras fases fenológicas de la planta, de febrero a abril (50-80 mm de lluvia) (figura 1a) y 71-77.6 % de humedad) (tabla 1). Los niveles de humedad registrados debieron implicar incremento de la evapotranspiración de las plantas, lo que hace crecer

Table 4. Results obtained in variables aerial dry weight (ADW), increase of ADW, stem length (SL) and cob length (CL).

Treatments	Variables			
	ADW, g/m ²	IADW, %	SL, m	CL, cm
Ho9	2.3 ^{ab}	21.1	2.0	17.9 ^d
Ho7	1.7 ^b	(-)	2.0	18.2 ^{cd}
Ho13	1.8 ^b	(-)	1.9	19.9 ^{bc}
Ho1	1.8 ^b	(-)	1.9	20.2 ^b
Ho5	1.8 ^b	(-)	2.1	20.6 ^{ab}
Absolute control	1.9 ^{ab}		1.9	17.1 ^d
Fertilized control	2.5 ^a		1.9	22.4 ^a
S.E. ±	0.15		0.51	0.65
Significance	P<0.05		NS	P<0.05

values reached by Antoun and Prévost (2000) in a maize experiment, with the application of commercial strains of *Bradyrhizobium japonicum*. These authors reported increases of ADW of the plant from 6.7 % to 8.7 %. Kumari *et al.* (2009) stated that growth-promoting molecules, like indoleacetic acid, gibberellins and cytokinins produced by the present rhizobia, whether it is in the rhizosphere or in plant tissues, stimulate the highest radical development and increase the nutrient absorption ability for the benefit of the plant. It is not dismissed the possibility that catalase production in these isolates had an influence on the results, as a factor of degradation of reactive oxygen species (ROS), which are formed during the water stress (Yang *et al.* 2008). Although there was no statistical superiority in the values of inoculated treatments, it is evident the increase regarding the control, which indicates a possible influence of the previously mentioned physiological factors.

Stem length (SL). This variable showed no significant differences among treatments. Several authors, like Döbbelaere *et al.* (2002) and Pecina-Quintero *et al.* (2005), consider that the response of the plant to inoculation depend on different factors, such as plant genotype. Bécquer *et al.* (2012a) also obtained similar results in maize, with the use of different sources of fertilization and different varieties.

Cob length (CL). In CL, there was statistical superiority ($P < 0.05$) of the fertilized control (22.4 cm) regarding the treatments inoculated with Ho1, Ho13,

la demanda de agua y por consiguiente, genera mayor estrés hídrico en los cultivos (Solano y Vázquez 1999).

No obstante, el incremento del PSPA con respecto al control absoluto en el tratamiento inoculado con Ho9 fue de 21 %, valor que aunque se obtuvo en condiciones de estrés por sequía agrícola, superó lo alcanzado por Antoun y Prévost (2000) en un experimento con maíz, al aplicar cepas comerciales de *Bradyrhizobium japonicum*. Estos autores informaron incrementos en el PSPA de la planta, desde 6.7 % hasta 8.7 %. Kumari *et al.* (2009) sostiene que las moléculas promotoras del crecimiento, como el ácido indolacético, las giberelinas y las citoquininas producidas por los rizobios presentes, sea en la rizosfera o en los tejidos de las plantas, estimulan el mayor desarrollo radical e incrementan la capacidad de absorción de nutrientes en beneficio de la planta. No se descarta la posibilidad de que la producción de catalasa en estos aislados haya influido en los resultados, como factor de degradación de especies reactivas del oxígeno (ROS), que se forman durante el estrés hídrico (Yang *et al.* 2008). Aunque estadísticamente no hubo superioridad en los valores de los tratamientos inoculados, es obvio el incremento con respecto al control, lo que indica una posible influencia de los factores fisiológicos antes mencionados.

Longitud del tallo (LT). Esta variable no presentó diferencias significativas entre tratamientos. Diversos autores, como Döbbelaere *et al.* (2002) y Pecina-Quintero *et al.* (2005), consideran que la respuesta de la planta a la inoculación depende de factores diversos, entre los que se encuentra el genotipo de la planta. Bécquer *et al.* (2012a) también obtuvieron resultados similares en maíz, al utilizar

Ho7 and Ho9. Treatments inoculated with Ho1 (20.2cm), Ho13 (19.9 cm) and Ho5 (20.6 cm) were superior to the absolute control. Likewise, Ho5 shared common superscripts with the fertilized control.

Because CL is a variable closely related to yield, these results were an evidence of the positive effect of isolates Ho1, Ho13 y Ho5. There are many mechanisms through which rhizobia may have a positive effect on crops. Ahmad *et al.* (2008) found that 80 % dinitrogen-fixing bacteria produce indoleacetic acid. This growth substance leads to an increase of total phenols, calcium content and activity of oxidase polyphenol enzyme that protects the plant against pathogens and improves its growth through the removal of oxygen reactive species, formed in the plants due to the water stress (Chowdhury 003). According to Kaplan *et al.* (2013), isolation of plant growth-promoting bacteria in stressing ecosystems, like arid ecosystems or deserts, may provide inoculants that stimulate the development of crops in environments resulting from climate change, which coincides with the stressing environmental conditions of the experiment. It is important to notice that, despite of the scarce precipitation level during the first plant growth stages (50-80 mm) (figure 1a, 1b), there was a positive effect of these isolates in this variable.

Grain yield and increase of grain yield. Table 5 shows that, in GY, the fertilized control (5.9 t/ha) was statistically superior ($P < 0.05$) to the treatments inoculated with the isolates Ho1 (2.5 t/ha), Ho7 (2.3 t/ha) and Ho9 (3.7 t/ha), as well as the absolute control (3.9 t/ha), while sharing common superscripts with the treatments inoculated with Ho5 and Ho13. This last treatment shared common superscripts with the absolute control. Treatments inoculated with isolates Ho1, Ho7 and Ho9, likewise, were statistically inferior ($P < 0.05$) to the absolute control.

These results indicate certain uniformity regarding those obtained with the variable CL, in which the treatment inoculated with Ho5 showed common superscripts with the fertilized control. This indicates a clear influence of this isolate in agro-productive parameters of the plant, related to yield, even under drought conditions. Bécquer *et al.* (2012a) obtained high yields in sorghum, statistically similar to the fertilized control, after the inoculation of the crop with a strain of *Bradyrhizobium sp.* The ACC-deaminase production by bacteria, which inhibits the ethylene production in plants (Yang *et al.* 2008), allows the development of the radical system with the inhibition of this compound, which favors a higher absorption of nutrients and, subsequently, higher grain production.

Treatments inoculated with Ho13 and Ho5 increased in 10 and 20 %, respectively, their grain yield regarding the absolute control. Cardoso *et al.* (2007) stated increases of 11 % in maize grain yields after the inoculation with rhizobia. According to Mia and Samsuddin (2010), the

diferentes fuentes de fertilización y distintas variedades.

Longitud de la mazorca (LM). En la LM se constató superioridad estadística ($P < 0.05$) del testigo fertilizado (22.4 cm) con respecto a los tratamientos inoculados con Ho1, Ho13, Ho7 y Ho9. Los tratamientos inoculados con Ho1 (20.2cm), Ho13 (19.9 cm) y Ho5 (20.6 cm) fueron superiores al control absoluto. El aislado Ho5, a su vez, compartió superíndices comunes con el testigo fertilizado.

Al ser LM una variable más estrechamente relacionada con el rendimiento, en estos resultados se constató el efecto positivo de los aislados Ho1, Ho13 y Ho5. Diversos pueden ser los mecanismos mediante los que los rizobios pueden incidir positivamente en los cultivos, Ahmad *et al.* (2008) encontraron que 80 % de las bacterias fijadoras de dinitrógeno producen ácido indolacético. Esta sustancia de crecimiento conlleva al aumento de fenoles totales, contenido de calcio y actividad de la enzima polifenol oxidasa, que protege la planta contra patógenos y mejora su crecimiento mediante la eliminación de las especies reactivas del oxígeno, que se forman en la planta a partir de un estrés hídrico (Chowdhury 003). Según Kaplan *et al.* (2013), el aislamiento de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en ecosistemas estresantes, como los ecosistemas áridos o de desiertos, puede proveer inoculantes que estimulen el desarrollo de los cultivos en ambientes derivados del cambio climático, lo que coincide con las condiciones ambientales estresantes presentes en el experimento. Nótese que a pesar del escaso nivel de precipitaciones durante las primeras etapas del crecimiento de la planta (50-80 mm) (figura 1a, 1b), hubo efecto positivo de estos aislados en esta variable.

Rendimiento de grano e incremento del rendimiento de grano. En la tabla 5 se observa, en el RG, que el testigo fertilizado (5.9 t/ha) fue estadísticamente superior ($P < 0.05$) a los tratamientos inoculados con los aislados Ho1 (2.5 t/ha), Ho7 (2.3 t/ha) y Ho9 (3.7 t/ha), así como al control absoluto (3.9 t/ha), mientras que compartió superíndices comunes con los tratamientos inoculados con Ho5 y Ho13. Este último tratamiento compartió superíndices comunes con el control absoluto. Los tratamientos inoculados con los aislados Ho1, Ho7 y Ho9, a su vez, resultaron estadísticamente inferiores ($P < 0.05$) al control absoluto.

Estos resultados indican cierta uniformidad con respecto a los obtenidos en la variable LM, en la cual precisamente el tratamiento inoculado con Ho5 presentó superíndices comunes con el testigo fertilizado. Esto indica una clara influencia de este aislado en indicadores agroproductivos de la planta, relacionados con el rendimiento, aún en condiciones de sequía. Bécquer *et al.* (2012a) obtuvieron altos rendimientos en sorgo, similares estadísticamente con el testigo fertilizado, al inocular el cultivo con una cepa de *Bradyrhizobium sp.* La producción de ACC (1-Aminociclopropano-1 Carboxilato)-diaminasa por las bacterias, que inhibe la producción de etileno en las plantas (Yang *et al.* 2008), permite que el sistema radical se desarrolle sin la inhibición propia de dicho compuesto, lo que propicia mayor absorción de nutrientes y, por

inoculation with rhizobia produced an increase of 16 % in grain yield, in different rice varieties, so the results of this experiment are within this range, despite the crop undergoes a water stress

Cob dry weight. Regarding this variable (table 5), the fertilized control (211.9 g) was statistically superior ($p < 0.05$) to absolute control (161.9 g), and the rest of the treatments. Treatments inoculated with Ho5 (146.1 g) and Ho9 (147.0 g) shared common superscripts with the absolute control, while treatments Ho9, Ho7, Ho1 and Ho5 were statistically inferior ($P < 0.05$). However, the treatment inoculated with Ho13 (189.2 g), although it showed statistically inferior values to the fertilized control, was superior ($P < 0.05$) to absolute control and the rest of the treatments. These results confirm those obtained by Bécquer *et al.* (2011) with this variable, after the inoculation of maize in a field experiment with strains of *Bradyrhizobium sp.*, isolated in stressing cattle rearing ecosystems from Sancti Spíritus, Cuba. Hussain *et al.* (2014), after applying strains of *Mesorhizobium ciceri* and *Rhizobium phaseoli* on maize, under drought simulated conditions, also obtained increase of humid weight of cob, as well

consiguiente, mayor producción de granos.

Los tratamientos inoculados con Ho13 y Ho5 incrementaron en 10 y 20 % respectivamente, su rendimiento de grano con respecto al control absoluto. Cardoso *et al.* (2007) refirieron incrementos de 11 % en el rendimiento del grano de maíz, al inocular con rizobios. Según Mia y Samsuddin (2010), la inoculación con rizobios produjo incremento de 16 % en el rendimiento de grano en las diferentes variedades de arroz, por lo que los resultados obtenidos en este experimento están en ese rango, a pesar de someterse el cultivo a un estrés hídrico.

Peso seco de la mazorca. Con respecto a esta variable (tabla 5), el testigo fertilizado (211.9 g) fue estadísticamente superior ($P < 0.05$) al control absoluto (161.9 g), y al resto de los tratamientos. Los tratamientos inoculados con Ho5 (146.1 g) y Ho9 (147,0 g) compartieron superíndices comunes con el control absoluto, mientras que los tratamientos Ho9, Ho7, Ho1 y Ho5 resultaron estadísticamente inferiores ($P < 0.05$). Sin embargo, el tratamiento inoculado con Ho13 (189.2 g), aunque mostró valores estadísticamente inferiores al control fertilizado, fue superior ($P < 0.05$) al control absoluto y al resto de los tratamientos. Estos resultados corroboran los que Bécquer

Table 5: Results obtained in variables grain yield (GY), cob dry weight (CDW) and weight of 1000 grains (W1000G)

Treatments	Variables			
	GY, t/ha (extrapolate)	IGY, %	CDW, g	W1000G, g
Ho9	3.7 ^d	(-)	147.0 ^{cd}	219.5 ^c
Ho7	2.3 ^e	(-)	123.7 ^e	220.0 ^c
Ho13	5.0 ^{bc}	10.0	189.2 ^b	261.4 ^c
Ho1	2.5 ^e	(-)	131.4 ^{de}	220.0 ^c
Ho5	5.1 ^b	20.0	146.1 ^{cd}	229.5 ^{bc}
Absolute Control	3.9 ^{cd}		161.9 ^c	216.3 ^c
Fertilized Control	5.9 ^a		211.9 ^a	311.0 ^a
S. E.	0.4		7.0	12.8
Significance	P<0.05		P<0.05	P<0.05

as in the aerial and root part of plants.

Weight of 1000 grains. Table 5 confirmed, for W1000G, that fertilized control (311.0 g) was statistically superior to the rest of treatments, and inoculated treatments were statistically equal to absolute control (216.3 g). In this variable, there was no positive effect of isolates, although Mehboob (2010), after applying strains of *Mesorhizobium ciceri* on maize under greenhouse conditions, obtained values statistically superior to the control not inoculated in this variable. It is possible that these results may vary after performing these experiments under field conditions, where stressing factors are involved, mainly due to agricultural drought. February and April

et al. (2011) obtuvieron en esta variable, al inocular maíz en un experimento de campo, con cepas de *Bradyrhizobium sp.*, aisladas en ecosistemas ganaderos estresantes de Sancti Spíritus, Cuba. También Hussain *et al.* (2014), al aplicar cepas de *Mesorhizobium ciceri* y *Rhizobium phaseoli* en maíz, en condiciones simuladas de sequía, obtuvieron incremento en peso húmedo de la mazorca, así como en la parte aérea y radical de las plantas.

Peso de 1000 granos. En la tabla 5 se constató, en el P1000G, que el testigo fertilizado (311.0 g) fue estadísticamente superior al resto de los tratamientos, y que los tratamientos inoculados igualaron estadísticamente al control absoluto (216.3 g). En esta variable no se observó efecto positivo de los aislados, aunque Mehboob

were the most important phenological stages for the experimental cultivation (from germination to filling of grains), which coincided with the lowest occurrence of rains. It is important to notice that rain level during growth period of the plant was below the recommended average for its normal development, which was 550 mm (Bonilla 2008).

It can be concluded that the results of the inoculation of *Bradyrhizobium sp.* on maize, although they were not uniform in the studied variables, showed that isolates Ho5 and Ho13, had a positive effect on grain yield, and, in a lesser extent, Ho1 and Ho9, on cob length and increase of aerial dry weight, respectively. Further field experiments are recommended under drought conditions with isolates Ho5 and Ho13, in different types of soil from Sancti Spiritus province.

(2010) al aplicar cepas de *Mesorhizobium ciceri* en maíz en condiciones de invernadero, obtuvo valores estadísticamente superiores al control no inoculado en dicha variable. Es posible que estos resultados puedan variar al realizarse los experimentos en condiciones de campo, donde intervienen factores estresantes, principalmente por la sequía agrícola. En febrero y abril transcurrieron las etapas fenológicas más importantes para el cultivo experimental (desde germinación hasta llenado de los granos), que coincidió con la menor ocurrencia de lluvias. Es de notar que el nivel de lluvias en el período de crecimiento de la planta estuvo muy por debajo del promedio recomendado para su desarrollo normal, de 550 mm (Bonilla 2008).

Se concluye que los resultados en la inoculación de *Bradyrhizobium sp.* en maíz, aunque no fueron uniformes en las variables estudiadas, mostraron que los aislados Ho5 y Ho13, tuvieron efecto positivo en el rendimiento de grano, y en menor medida, Ho1 y Ho9, en longitud de la mazorca e incremento del peso seco aéreo, respectivamente. Se recomienda realizar futuros experimentos de campo en condiciones de sequía con los aislados Ho5 y Ho13, en diferentes tipos de suelo de la provincia Sancti Spiritus.

References

- Ahmad, F., Ahmad, I. & Khan, M. S. 2008. "Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities". *Microbiol. Res.*, 168: 173-181. ISSN: 0944-5013, DOI:10.1016/j.micres.2006.04.001
- Antoun, H. & Prévost, D. 2000. PGPR activity of Rhizobium with non-leguminous plants. *Proceedings of the 5th International PGPR workshop*. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina. p. 62.
- Bécquer, C. J.; Nápoles, J. A.; Álvarez, Orquidia; Ramos, Yamilka; Quintana, Maribel & Galdo, Yaldreisi. 2012a. "Respuesta de diferentes variedades de cereales a la inoculación con *Bradyrhizobium sp.*" *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 3(1): 187-200, ISSN: 2007-0934
- Bécquer, C. J., B., Ávila, U., Palmero, L., Nápoles, J. A., Ulloa, L., Suárez, Y. & Colina, O. L. 2011. "Selection of rhizobium strains, inoculated in corn (*Zea mays*, L.), in field conditions in cattle ecosystems of Sancti Spiritus, Cuba". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 45(4): 445-449, ISSN: 2079-3480.
- Bonilla, M. N. (ed.). 2008. *Manual de recomendaciones técnicas: cultivo de maíz (Zea mays)*. San José, Costa Rica: Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, 68 p., ISBN: 978-9968-586-00-9.
- Cardoso, E. J. B. N., Nogueira, M.A. & Ferraz, S. M. G. 2007. "Biological N₂ fixation and mineral N in common Bean-Maize intercropping or sole cropping in southeastern Brazil". *Expl. Agric.* 43:319-330. ISSN: 1469-4441 DOI: 10.1017/500144797070052
- Chowdhury, A.K. 2003. "Control of Sclerotium blight of groundnut by growth substances". *Crop Res.* 25: 355-359, ISSN: 0970-4884.
- Döbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, P. J., & Okon, Y. 2002. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biol. Fertil. Soils*. 36:284-297. ISSN: 0178-2762, 1432-0789, DOI: 10.1807/s00374-002-0534-9
- Fisher, R. A. 1935. *The design of experiments*. Edinburgh: Oliver and Boyd.
- Hernández, A., Pérez, J.M., Bosch, D. & Castro, N. 2015. "Clasificación de los Suelos de Cuba 2015". Ediciones INCA. Mayabeque, Cuba, 64 p. ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Hussain, M. B., Zahir, Z. A., Asghar, H. N. & Mahmood, S. 2014. "Srutinizing Rhizobia to rescue maize growth under reduced water conditions". *Soil Science Society of america Journal*. 78 (2): 538-545. ISSN: 0361-595, DOI: 10.2136G/ssa2013.07.0315
- Kaplan, D., Maymon, M., Agapakis, C. M., Lee, A., Wang, A., Prigge, B. A., Volkogon, M. & Hirsch, A. M. 2013. "A survey of the microbial community in the rhizosphere of two dominant shrubs of the Negev Desert highlands, *Zygophyllum dumosum* (Zygophyllaceae) and *Atriplexhalimus* (Amaranthaceae), using cultivation-dependent and cultivation-independent methods". *American Journal of Botany*. 100: 1713 – 1725. ISSN: 1537-2197. DOI: 10.3732/ajb.1200614
- Kumuri, B. S., Ram, M. R. & mallaiah, K. V. 2009 "Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by Rhizobium strains from Indigofera". *African Journal of Microbiology Research*, 3(1): 10-14, ISSN: 1996-1808.
- Mehboob, I. 2010. Plant growth promoting activities of rhizobium with non-legumes. Ph.D. Thesis, Institute of Soil and Environmental Sciences – University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan, 211 p.
- Mia, M.A., Shamsuddin, Z.H. & Mahmood, Maziah. 2012. Effects of rhizobia and plant growth promoting bacteria inoculation on germination and seedling vigor of lowland rice. *African Journal of Biotechnology*. 11(16) 3758-3765, ISSN: 1684-5315,

- DOI:10.5897/AJB09.1337.
- Mía, M. B. & Shamsuddin, Z. H. 2010. "Rhizobium as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production". *African Journal of Biotechnology*, 9(37): 6001-6009, ISSN: 1684-5315.
- Montero, L., Cun, R., Pérez, Jeny, Ricardo, Marta & Herrera, J. 2012. "Riego con aguas residuales en la producción sostenible de granos para alimento animal". *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 21(2): 48-52, ISSN: 2071-0054.
- Pecina-Quintero, V., Díaz-Franco, A., Williams-Alanis, H., Rosales-Robles, E. & Garza-Cano, I. 2005. "Influencia de fecha de siembra y biofertilizantes en Sorgo". *Rev. Fitotec. Mex.* 28:389-392. ISSN: 0187-7380
- Shaharoon, B., Arshad, M. & Zahir, Z. 2006. "Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.)". *Letters in Applied Microbiology* 42(2): 155-159. ISSN: 0266-8254, DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01827.x.
- Solano, O. & Vázquez, R. 1999. Modelo Agrometeorológico de Evaluación de la Sequía Agrícola. Referencia MT026. Convención Trópico'99. Congreso de Meteorología Tropical. La Habana. Cuba.
- Statistical Graphics Crop 2000. STATGRAPHIC® Plus. (ser. Profesional), version 5.1, [Windows], Available: <<http://www.statgraphics.com/statgraphics/statgraphics.nsf/pd/pdpricing>>.
- Stiens, M., Schneiker, S., Keller, M., Kuhn, S., Puhler, A. & Schluter, A. 2006. "Sequence analysis of the 144-kilobase accessory plasmid psmesm11a, isolated from a dominant Sinorhizobium meliloti strain identified during a long-term Weld release experiment". *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3662-3672. ISSN: 0099-2240, 1098-5336, DOI: 10.1128/AEM.75.5.3662-3672. 2006
- Timmusk S, Abd El-Daim IA, Copolovici L, Tanilas T, Kännaste A, Behers, L., Nevo, E., Seisenbaeva Gulaim, Stenström, Elna & Niinemets, Ülo. 2014. "Drought-Tolerance of Wheat Improved by Rhizosphere Bacteria from Harsh Environments: Enhanced Biomass Production and Reduced Emissions of Stress Volatiles". *PLoS ONE* 9(5): ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0096086. Available: <<http://www.ncbi.nlm.gov/pmc/articles/PMC4014485/>>, [Consulted] January 8, 2007]
- Vincent, J. M. 1970. *A manual for the practical study of root nodules bacteria*. International Programme Handbook. No. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh. 164 p. Google-Book-ID de QcAQAAIAAJ, Available: <<http://books.google.com/culbooks?id=dcQcAQAAIAAJ>>[Consulted: January 8, 2017]
- Yang, J., Kloepper, J. W. & Ryu, C. 2008. "Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress". *Trends in Plant Science*. 14 (1): 1-4. ISSN: 1360-1383, DOI: 10.1016/j.tplants.2008.10.004
- Zahran, H. H., Abdel-Fattah, M., Yasser, M. M., Mahmoud A. M. & Bedmar, E. J. 2012. "Diversity and Environmental Stress Responses of Rhizobial Bacteria from Egyptian Grain Legumes". *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 6(10): 571, ISSN: 1991-8187

Received: January 3, 2016