

## Selección de cepas de rizobios aisladas de ecosistemas ganaderos de Canadá, inoculadas en trigo (*Triticum aestivum*, L.)

### Selection of rhizobium strains isolated from livestock ecosystems of Canada, inoculated to wheat (*Triticum aestivum* L.)

C.J. Bécquer, Beatriz Salas, U. Ávila, L. Palmero, J.A. Nápoles y Lisbet Ulloa

*Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spiritus*

*Apdo. 2228, Zona postal 1, Sancti Spiritus, Cuba*

*E-mail: becquer@pastos.yayabo.inf.cu*

#### Resumen

Se efectuó un experimento de campo con el objetivo de seleccionar cepas de rizobios inoculadas en trigo (*Triticum aestivum*, L., var. Cuba-204). Se evaluaron varios indicadores agroproductivos de la planta, tales como: peso seco aéreo, longitud del tallo, rendimiento de granos, peso de 1000 granos y rendimiento de nitrógeno. Como criterio de selección de los mejores tratamientos se consideraron los valores estadísticamente superiores al control fertilizado. Se utilizaron cuatro cepas de referencia, pertenecientes a diferentes géneros y especies de rizobios, y 10 cepas nativas, pertenecientes al género *Sinorhizobium*, que fueron aisladas de raíces de leguminosas (*Melilotus* y *Medicago*), adaptadas a ecosistemas ganaderos de Alberta, Canadá. Una de las cepas fue aislada de leguminosas adaptadas a suelos contaminados con hidrocarburos de esa misma zona geográfica. Las cepas crecieron en LMA y resuspendidas en CLM hasta lograr una UFC de  $10^6 - 10^8$  cél/mL. Se utilizaron métodos estándar para la inoculación de cereales. Se aplicó un diseño experimental de bloques completamente aleatorizado, con 16 tratamientos y cuatro réplicas. Uno de los tratamientos se fertilizó con 150 kg/ha ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Se utilizó análisis de varianza. Las diferencias entre medias fueron halladas por la prueba LSD de Fisher ( $p < 0,05$ ). Se construyó un dendrograma mediante el método centroide (distancia euclidiana). Se concluye que existió un incremento significativo de los valores en todas las variables en comparación con el testigo absoluto. Algunos tratamientos inoculados indistintamente con cepas nativas o comerciales, fueron estadísticamente superiores al control fertilizado. Se seleccionaron seis cepas como altamente promisorias para ser aplicadas en la práctica agrícola del territorio. Se recomienda la biofertilización con rizobios en trigo como una alternativa de alto valor ecológico y económico para la agricultura cubana.

Palabras clave: Inoculación, *Sinorhizobium*, *Triticum aestivum*

#### Abstract

A field experiment was carried out in order to select rhizobial strains inoculated to wheat (*Triticum aestivum*, L., var. Cuba-204). Several parameters of agricultural significance were assessed, such as: aerial dry weight, length of stems, grain yield, weight of 1 000 grains and nitrogen yield. As selection criterion of the best treatments, the statistically higher values compared to the fertilized control were considered. Four reference strains, belonging to several rhizobial genus and species were used, as well as ten native strains, belonging to *Sinorhizobium* that were isolated from roots of legumes (*Melilotus* and *Medicago*), adapted to Canadian livestock ecosystems in Alberta. One of the strains was isolated from legumes adapted to soils contaminated with hydrocarbons located in the same geographic zone. The strains grew YMA and re-suspended in YMB until they reached a CFU of  $10^6 - 10^8$  cells/mL. Standard methods for the inoculation of cereals were used. A complete randomized block experimental design with 16 treatments and four replications within plots was used. A treatment was fertilized with 150 kg/ha ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). Variance analysis was applied while differences between treatments were found through LSD (Fisher's test) ( $p < 0, 05$ ). A dendrogram was built through the centroid method (Euclidian

distance). It was concluded that a significant increase of values in all the variables was shown as compared to the absolute control. Several treatments, inoculated with reference or native strains showed values statistically higher than those of the fertilized control. Six rhizobial strains of highly promising use for the local agriculture were selected. Biofertilization of wheat with rhizobia is strongly recommended as an alternative of high ecological and economic value for the agriculture of Cuba.

Key words: Inoculation, *Sinorhizobium*, *Triticum aestivum*

### Introducción

El efecto beneficioso de los rizobios como fijadores del nitrógeno atmosférico en las leguminosas a través de la simbiosis es bien conocido, por lo que son utilizados ampliamente en el mundo para el incremento de la producción de granos y forraje, con un ahorro sustancial de divisas y una contribución significativa al cuidado del medio ambiente. Estas bacterias pueden colonizar también las raíces de las plantas no leguminosas e influir significativamente en su crecimiento mediante la secreción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Chabot, Antoun, Klocpper y Beauchamp, 1996).

La inoculación de especies no leguminosas con bacterias dinitro fijadoras simbióticas o de vida libre, ha sido por espacio de muchos años una tarea investigativa de grandes perspectivas, pero de discretos avances. Al principio se esperaba que dichas bacterias fijaran cantidades aceptables de nitrógeno atmosférico a la planta, pero Van Berkum y Bohlool (1980) determinaron que las bacterias diazotróficas en la rizosfera de las plantas utilizan los productos de la fijación del N para su propio crecimiento. Otra de las mayores limitaciones de la fijación asociativa de N es que, en la mayoría de los casos, las bacterias colonizan solamente la superficie de las raíces, por lo que permanecen vulnerables en la competencia con otros microorganismos rizosféricos (Webster, Gough, Vasse, Batchelor, Callaghan, Kothari, Davey, Dénarie y Cocking, 1997). No obstante, existen trabajos que han demostrado la entrada y establecimiento de *Azorhizobium* en las raíces de trigo (Sabry, Saleh, Batchelor, Jones, Jotham, Webster, Kothari, Davey y Cocking, 1997), donde se encontraron evidencias de actividad de la enzima nitrogenasa.

### Introduction

The beneficial effect of rhizobia for fixing atmospheric nitrogen in legumes through symbiosis is well known, for which they are widely used in the world for the increase of the production of grains and forage, substantially saving money and contributing significantly to the protection of the environment. These bacteria can also colonize the roots of non leguminous plants and have significant influence on their growth by means of the secretion of plant-growth stimulating substances (Chabot, Antoun, Klocpper and Beauchamp, 1996).

The inoculation of non leguminous species with symbiotic or free-living nitrogen-fixing bacteria has been for many years a research task of great perspectives, but discreet advances. At the beginning, such bacteria were expected to fix acceptable quantities of atmospheric nitrogen to the plant, but Van Berkum and Bohlool (1980) determined that the diazotrophic bacteria in the rhizosphere of plants use the products of N fixation for their own growth. Another big limitation of the associative fixation of N is that, in most cases, the bacteria colonize only the root surface, for which they remain vulnerable in the competition with other rhizospheric microorganisms (Webster, Gough, Vasse, Batchelor, Callaghan, Kothari, Davey, Dénarie and Cocking, 1997). However, there are works that have demonstrated the entrance and establishment of *Azorhizobium* in the wheat roots (Sabry, Saleh, Batchelor, Jones, Jotham, Webster, Kothari, Davey and Cocking, 1997), where evidences of activity of the nitrogenase enzyme were found.

Other authors have pointed out that the fixation of atmospheric N is not the most important aspect in the inoculation of diazotrophic bacteria to non

Otros autores han afirmado que la fijación del N atmosférico no es el aspecto más importante en la inoculación de bacterias diazotróficas en las especies no leguminosas, sino la producción por éstas de sustancias promotoras del crecimiento vegetal, tales como: auxinas, citoquininas, riboflavina, vitaminas y otras fitohormonas (Phillips y Torrey, 1970; Dakora, 2003), lo cual favorece a su vez una mayor extracción de nutrientes en el suelo (Okon y Kapulnik, 1986; Zavalin, Kandaurova y Vinogradova, 1998; Saubidet, Fatta y Barneix, 2000).

A pesar de que los rizobios están siendo investigados desde hace algunos años en diversas instituciones en el extranjero para la inoculación de especies no leguminosas, en Cuba aún no se cuenta con antecedentes de resultados previos al presente trabajo, por lo que se considera que constituye una novedad científica en el país.

En Cuba es necesario mejorar la producción de granos básicos y nutritivos para la alimentación, tanto humana como animal, por lo que teniendo en cuenta la bibliografía consultada y la posibilidad de extender el cultivo del trigo en el país, se realizó esta investigación con el objetivo de evaluar el comportamiento de los principales indicadores agroproductivos del trigo inoculado con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (rizobios) adaptadas a ecosistemas ganaderos de Canadá.

### Materiales y Métodos

**Procedencia de las cepas de rizobios.** Se utilizaron cuatro cepas de referencia, pertenecientes a diferentes géneros y especies de rizobios, y 10 cepas canadienses del género *Sinorhizobium* (tabla 1); estas se aislaron de raíces de leguminosas (*Melilotus* y *Medicago*), adaptadas a ecosistemas ganaderos de las praderas de Alberta, Canadá, caracterizados por un suelo loam arenoso y erosionado, así como escasas precipitaciones en esa zona geográfica (Slaski, J., comunicación personal). Una de las cepas (CAS2) fue aislada de leguminosas adaptadas a suelos contaminados con hidrocarburos.

**Procedimiento experimental.** Las cepas crecieron en medio levadura-manitol-agar

leguminosa especie, but the production by them of plant-growth stimulating substances, such as auxins, cytokinins, riboflavins, vitamins and other phytohormones (Phillips and Torrey, 1970; Dakora, 2003), which favors in turn a higher extraction of soil nutrients (Okon and Kapulnik, 1986; Zavalin, Kandaurova and Vinogradova, 1998; Saubidet, Fatta and Barneix, 2000).

Although rhizobia are being research since several years ago in different institutions abroad for the inoculation of non leguminous species, in Cuba there are no antecedents of results previous to this work, for which it is considered to constitute a scientific novelty in the country.

In Cuba it is necessary to improve the production of basic and nutritive grains, for human as well as for animal feeding, for which taking into consideration the bibliography reviewed and the possibility of extending wheat cultivation in the country, this study was carried out with the objective of evaluating the performance of the main agricultural and productive indicators of the wheat inoculated with plant-growth stimulating bacteria (rhizobia) adapted to livestock ecosystems of Canada.

### Materials and Methods

**Provenance of the rhizobium strains.** Four reference strains, belonging to different genera and species of rhizobia were used as well as 10 Canadian strains of the *Sinorhizobium* genus (table 1), which were isolated from roots of legumes (*Melilotus* and *Medicago*), adapted to livestock ecosystems of the grasslands of Alberta, Canada, characterized by sandy loam and eroded soil, as well as scarce rainfall in that geographical area (Slaski, J., personal communication). One of the strains (CAS2) was isolated from legumes adapted to soils contaminated with hydrocarbons.

**Experimental procedure.** The strains grew in yeast-mannitol-agar (YMA) medium and were re-suspended in yeast-mannitol-broth (YMB) until achieving a colony forming unit (CFU) of  $10^6$ - $10^8$  cells/mL. The inoculation was carried out through the immersion of the seeds for 24 hours in the inoculum at room temperature and they were afterwards extracted from the broth to be dried under shade and sown immediately. For the

Tabla 1. Cepas canadienses y de referencia utilizadas en el experimento.

Table 1. Canadian and reference strains used in the trial.

Cepa	Género y especie
CAC2	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
CAC4	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
CAC5	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
CAC7	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
CAC8	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
CAC9	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
CAC14	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
CAC16	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
CAC17	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
CAS2	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
De referencia	
ATCC10317	<i>Bradyrhizobium lupini</i>
ATCC 10004	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
USDA 191	<i>Sinorhizobium fredii</i>
25B6	<i>Bradyrhizobium</i> sp.

(LMA) y fueron resuspendidas en caldo-levadura-manitol (CLM) hasta lograr una unidad formadora de colonias (UFC) de  $10^6$ - $10^8$  cél./mL. La inoculación se realizó mediante la inmersión de las semillas durante 24 horas en el inóculo a temperatura ambiente y posteriormente se extrajeron del caldo para su secado a la sombra y siembra inmediata. Para el control absoluto y el control fertilizado no inoculado se utilizó solamente el CLM. La reinoculación de los tratamientos se hizo a los 18 días de la siembra, con el fin de asegurar una presencia efectiva de las bacterias en la rizosfera para la colonización radicular; para ello se usó un inóculo bacteriano en cantidad aproximada de 5-10 mL/planta, que contenía  $10^6$ - $10^8$  cél./mL, y con una mochila asperjadora se dirigió el chorro del inóculo líquido a la base del tallo de la planta. Esta actividad se llevó a cabo en horas frescas de la mañana para evitar la desecación excesiva del producto y, por ende, la muerte del microorganismo. La dosis de siembra fue de 69 kg/ha para ambos experimentos. El marco de siembra usado fue de 50 cm entre surcos, sembrados a chorrillo espaciado. Cada parcela medía 3 m x 15 m. Se aplicaron cuatro riegos. A los 90 días de la siembra se realizó la

absolute control and the non inoculated fertilized control only the YMB was used. The re-inoculation of the treatments was done 18 days after sowing, aiming at ensuring an effective presence of the bacteria in the rhizosphere for root colonization; for that a bacterial inoculum in approximate quantity of 5-10 mL/plant was used, containing  $10^6$ - $10^8$  cells/mL, and with an sprinkling backpack the shower of liquid inoculum was directed towards the base of the plant stem. This activity was carried out in the fresh hours of morning to avoid the excessive desiccation of the product and, thus, the death of the microorganism. The sowing dosage was 69 kg/ha for both experiments. The sowing frame used was 50 cm between rows, sown with spaced drilling. The size of each plot was 3m x 15 m. Four irrigations were applied. Ninety days after sowing the harvest was done manually. The fertilized treatment consisted in an application of 150 kg N/ha ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ). On the other hand, due to the poor mineral content of the experimental soil (Alluvial: 2,63 mg  $\text{P}_2\text{O}_5$ /100g; 10,00 mg  $\text{K}_2\text{O}$ /100 g; 1,61% OM and pH 5,4) whole fertilizer was applied (NPK: 9-13-17) to all treatments, 21 days after sowing, at a rate of 80 kg N/ha.

**Experimental design.** A completely randomized block design (Somasegaran and Hoben, 1994) was used, with 16 treatments and four replications (fig. 1). The data were statistically analyzed by means of a variance analysis (StatGraphics Plus, version 2.0, 1994-1996, Statistical Graphics Corporation). The differences among means were found through the Fisher's LSD (Least Significant Difference) test ( $P < 0,05$ ). A dendrogram was built by means of the centroid method (Euclidian distance). The following variables were evaluated in both experiments: aerial dry weight (ADW, g/plot), stem length (SL, cm), grain yield (GY, kg/ha), weight of 1 000 grains (W1000G, g) and nitrogen yield (NY, mg/m<sup>2</sup>). As selection criterion of the best treatments the values statistically higher than the fertilized control were considered.

### Results

Figure 2 shows the aerial weight, which presented some treatments with values higher

cosecha de forma manual. El tratamiento fertilizado consistió en una aplicación de 150 kg de N/ha (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>). Por otra parte, debido al pobre contenido de minerales del suelo experimental (Aluvial: 2,63 mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/100 g; 10,0 mg de K<sub>2</sub>O /100 g; 1,61% de MO y un pH de 5,4) se aplicó fertilizante completo (NPK: 9-13-17) a todos los tratamientos, a los 21 días de la siembra, a razón de 80 kg de N/ha.

**Diseño experimental.** Se empleó un diseño experimental de bloques completamente aleatorizados (Somasegaran y Hoben, 1994), con 16 tratamientos y cuatro réplicas (fig. 1). Los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (StatGraphics Plus, versión 2.0, 1994-1996, Statistical Graphics Corporation). Las diferencias entre medias fueron halladas por la prueba LSD (Least Significant Difference) de Fisher (P<0,05). Se construyó un dendrograma mediante el método centroide (distancia euclidiana). Se evaluaron las siguientes variables en ambos experimentos: peso seco aéreo (PSA, g/parcela), longitud del tallo (LT, cm), rendimiento de granos (RG, kg/ha), peso de 1 000 granos (P1000G, g) y rendimiento de nitrógeno (RN, mg/m<sup>2</sup>). Como criterio de selección de los mejores tratamientos se consideraron los valores estadísticamente superiores al control fertilizado.

than the rest, among which stand out those inoculated with USDA 191 (492,7 g/plot), CAC5 (466,0 g/plot), ATCC 10004 (456 g/plot) and CAC2 (449,0 g/plot). Other treatments, such as CAC17 (442,1 g/plot and CAS2 (433,5 g/plot), had common letters with the above-mentioned ones, although with lower values. All the treatments inoculated, except CAC8 (322,4 g/plot), CAC9 (303,6 g/plot), 25B6 (278,3 g/plot) and CAC14 (311,6 g/plot), were significantly higher (p<0,05) than the absolute control. The treatments inoculated with the strains USDA 191, CAC5, ATCC 10004, CAC2, CAC17 and CAS2 stood out for their values statistically higher than the fertilized control.

Regarding stem length (fig. 3) all the treatments inoculated, except CAC9 (64,9 cm) and CAC14 (65,8 cm), were statistically higher as compared to the absolute control. The treatments inoculated with the strains USDA 191 (79,5 cm), CAC5 (79,1 cm), CAC2 (74,0 cm), ATCC 10004 (73,2 cm), CAC16 (73,5 cm), CAC17 (73,5 cm) and CAC7 (75,1 cm), were significantly higher (p<0,05) than the fertilized control.

In the grain yield it was observed that, with the exception of the treatments inoculated with the strains CAC8 (134,6 g/m<sup>2</sup>), CAC9 (132,8 g/

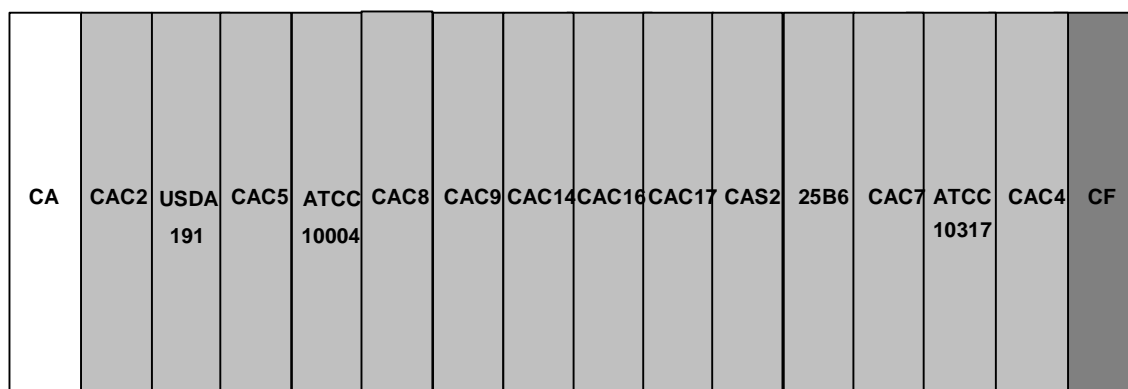


Fig. 1. Esquematación del diseño experimental de campo. Tratamientos distribuidos de acuerdo con un bloque completamente aleatorizado con cuatro réplicas dentro de cada parcela (Somasegaran y Hoben, 1994).

Fig. 1. Scheme of the experimental field design. Treatments distributed according to a completely randomized block with four replications within each plot (Somasegaran and Hoben, 1994).

### Resultados

En la figura 2 se muestra el peso aéreo, el cual presentó algunos tratamientos con valores superiores al resto, entre los que se destacaron los inoculados con USDA 191 (492,7 g/parcela), CAC5 (466,0 g/parcela), ATCC 10004 (456,0 g/parcela) y CAC2 (449,0 g/parcela). Otros tratamientos, como CAC17 (442,1 g/parcela) y CAS2 (433,5 g/parcela), presentaron letras comunes con los anteriormente señalados, aunque con valores inferiores. Todos los tratamientos inoculados, excepto CAC8 (322,4 g/parcela), CAC9 (303,6 g/parcela), 25B6 (278,3 g/parcela) y CAC14 (311,6 g/parcela), fueron superiores significativamente ( $p < 0,05$ ) al control absoluto. Los tratamientos inoculados con las cepas USDA 191, CAC5, ATCC 10004, CAC2, CAC17 y CAS2 se destacaron por sus valores estadísticamente superiores al control fertilizado.

En cuanto a la longitud del tallo (fig. 3) todos los tratamientos inoculados, excepto el CAC9 (64,9 cm) y CAC14 (65,8 cm), fueron superiores estadísticamente con respecto al control ab-

m<sup>2</sup>), CAC14 (143,4 g/m<sup>2</sup>) and 25B6 (118,9 g/m<sup>2</sup>), the others were statistically superior with regards to the absolute control. Those inoculated with the strains USDA 191 (191,0 g/m<sup>2</sup>) and CAC5 (189,9 g/m<sup>2</sup>) were significantly higher ( $P < 0,05$ ) as compared to the fertilized control (fig. 4).

When analyzing the weight of 1 000 grains it was observed that the inoculated treatments, except CAS2 (27,6 g), showed common letters with the absolute control (29,7 g). Some of them, inoculated with CAC2 (31,3 g), ATCC 10004 (30,8 g), CAC7 (31,2 g) and CAC4 (30,4 g), were higher than the fertilized control (28,4 g), which in turn showed common letters with the absolute control (fig. 5).

The nitrogen yield was statistically higher in the inoculated treatments as compared to the absolute control, except in CAC8 (461,2 mg/m<sup>2</sup>), CAC9 (442,3 mg/m<sup>2</sup>), CAC14 (492,8 mg/m<sup>2</sup>) and 25B6 (417,3 mg/m<sup>2</sup>) (fig. 6). On the other hand, the ones inoculated with the strains CAC5 (682,3 mg/m<sup>2</sup>), USDA 191 (655,1 mg/m<sup>2</sup>), CAC2 (629,6 mg/m<sup>2</sup>) and ATCC 10004 (637,6 mg/m<sup>2</sup>), were

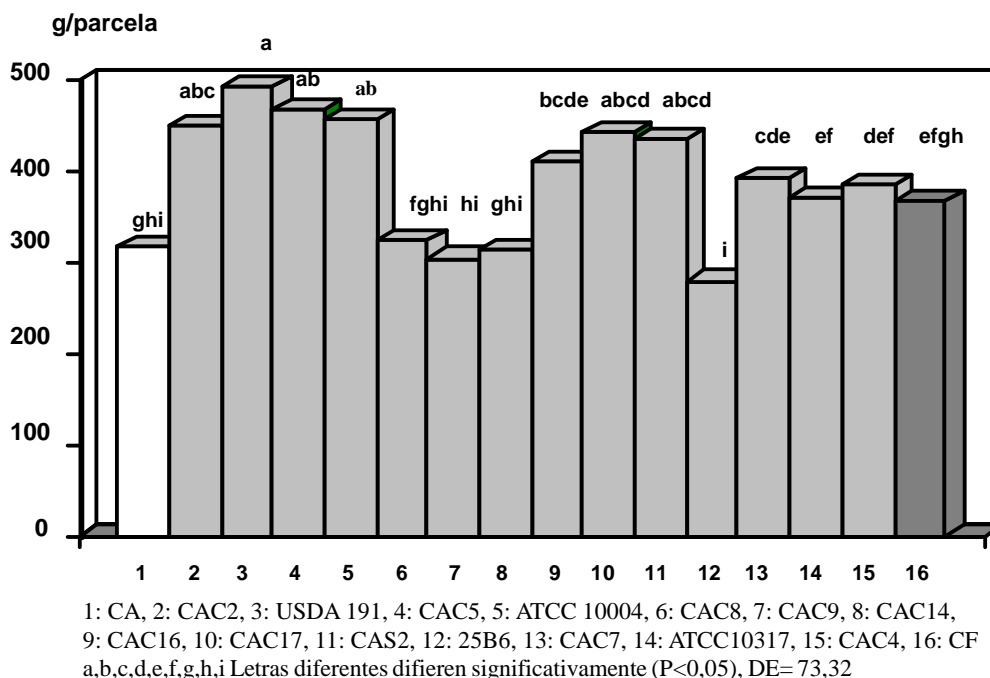


Fig. 2. Comportamiento del peso seco aéreo de la planta en el momento de la cosecha.  
Fig. 2. Performance of the aerial dry weight of the plant at the time of harvest.

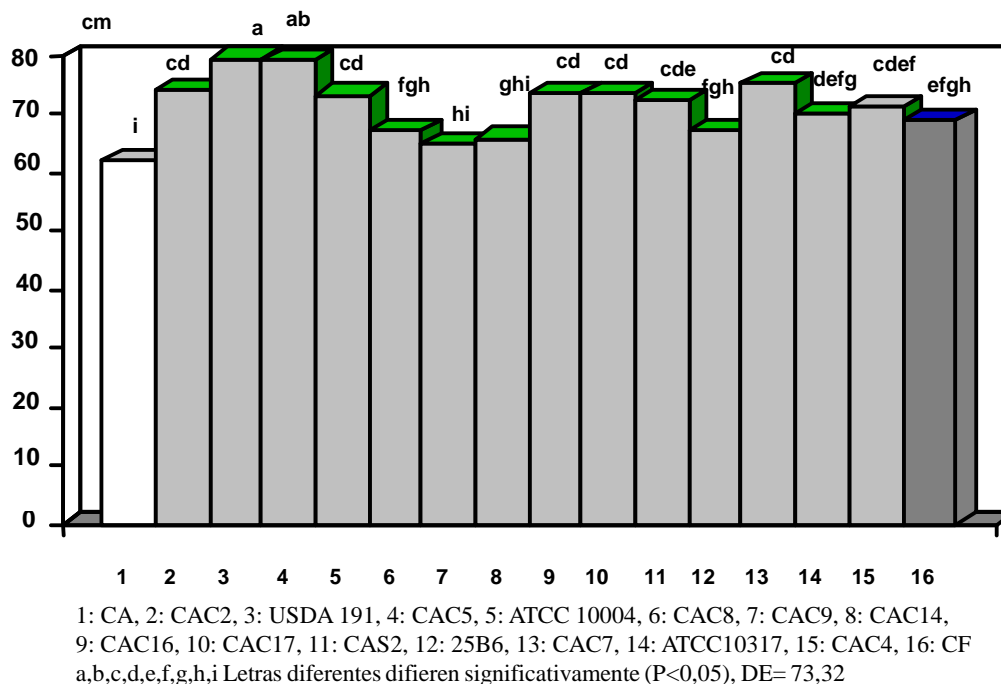


Fig. 3. Comportamiento de la longitud del tallo de la planta en el momento de la cosecha.  
Fig. 3. Performance of the stem length of the plant at the time of harvest.

soluto. Los tratamientos inoculados con las cepas USDA 191 (79,5 cm), CAC5 (79,1 cm), CAC2 (74,0 cm), ATCC 10004 (73,2 cm), CAC16 (73,5 cm), CAC17 (73,5 cm) y CAC7 (75,1 cm), fueron superiores significativamente ( $p < 0,05$ ) con respecto al control fertilizado.

En el rendimiento de granos se comprobó que, con excepción de los tratamientos inoculados con las cepas CAC8 (134,6 g/m<sup>2</sup>), CAC9 (132,8 g/m<sup>2</sup>), CAC14 (143,4 g/m<sup>2</sup>) y 25B6 (118,9 g/m<sup>2</sup>), los demás fueron estadísticamente superiores al control absoluto. Los inoculados con las cepas USDA 191 (191,0 g/m<sup>2</sup>) y CAC5 (189,9 g/m<sup>2</sup>) fueron superiores significativamente ( $P < 0,05$ ) con respecto al tratamiento fertilizado (fig. 4).

Al analizar el peso de 1 000 granos se observó que los tratamientos inoculados, excepto CAS2 (27,6 g), presentaron letras comunes con el control absoluto (29,7 g). Algunos de estos, inoculados con CAC2 (31,3 g), ATCC 10004 (30,8 g), CAC7 (31,2 g) y CAC4 (30,4 g), fueron superiores al control fertilizado (28,4 g), el cual a su vez presentó letras comunes con el control absoluto (fig. 5).

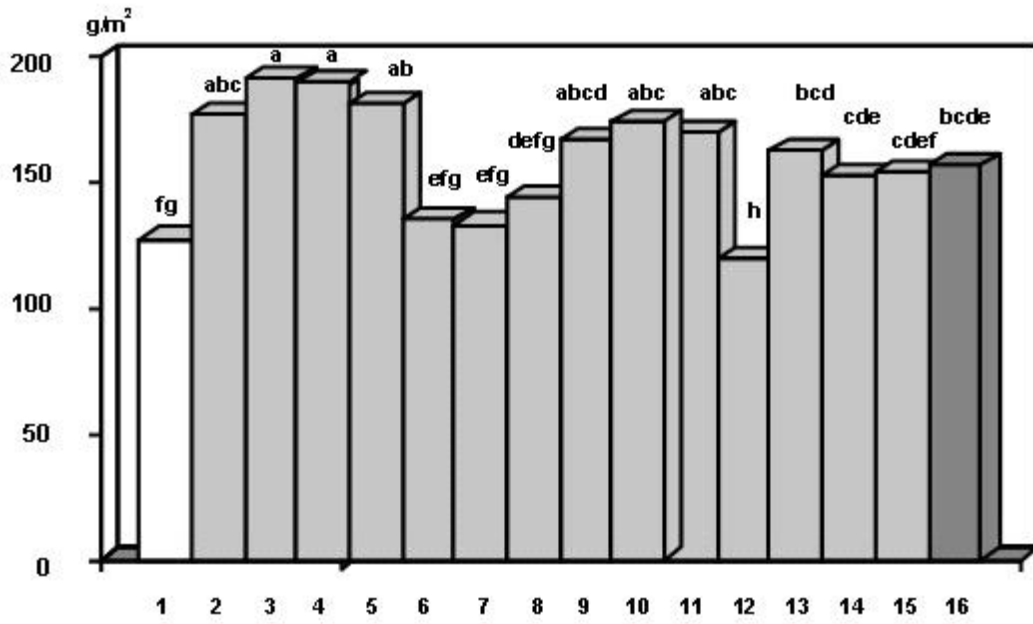
significantly higher than the fertilized control (570,3 mg/m<sup>2</sup>).

Figure 7 shows the grouping based on the variables studied. The groups formed by inoculated treatments that stood out for their statistically higher values with regards to the control were numbered (USDA 191, ATCC 10004, CAC5, CAC2, CAC16 and CAC17).

### Discussion

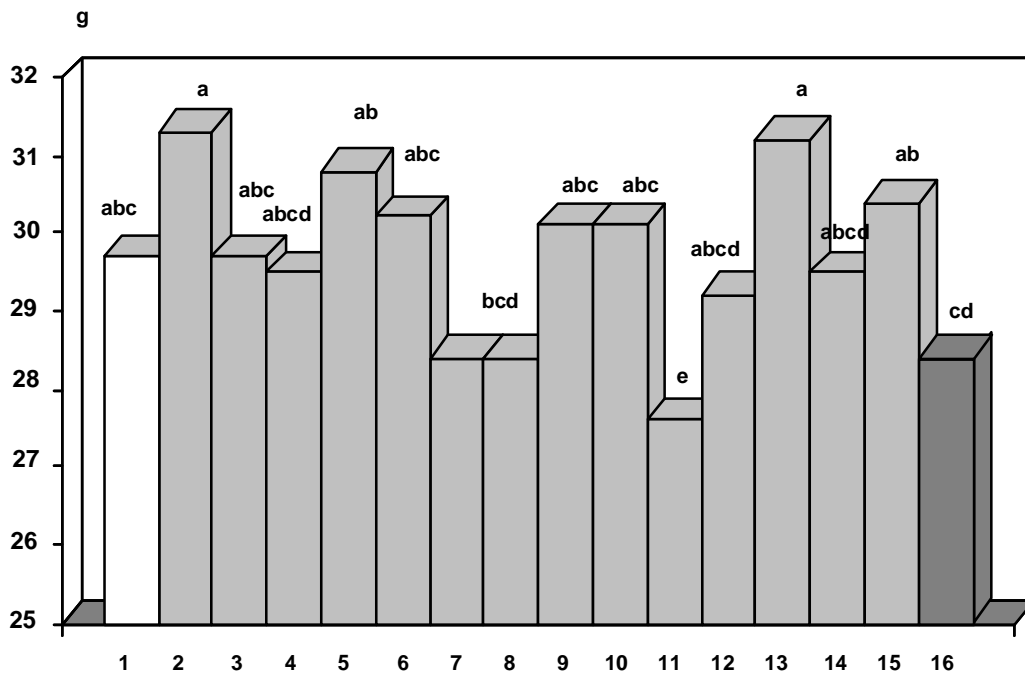
In this experiment higher results were observed due to the effect of wheat inoculation with strains belonging to different genera.

The native rhizobium strains used are from livestock areas of Alberta, Canada, where rainfall is scarce and the soil is sandy and eroded. When applying them to this essay, it was taken into consideration that the edaphoclimatic conditions corresponded approximately to the ones in the zone of origin. It has been observed by other authors (Prévost, 1987; Prévost, Bordeleau, Caudry-Reznich, Schulman and Antoun, 1987; Prévost, Drouin and Antoun, 1999) that the rhizobia from geographical zones under stressing



1: CA, 2: CAC2, 3: USDA 191, 4: CAC5, 5: ATCC 10004, 6: CAC8, 7: CAC9, 8: CAC14, 9: CAC16, 10: CAC17, 11: CAS2, 12: 25B6, 13: CAC7, 14: ATCC10317, 15: CAC4, 16: CF  
 a,b,c,d,e,f,g,h Letras diferentes difieren significativamente (P<0,05), DE= 73,32

Fig. 4. Comportamiento del rendimiento de grano de la planta en el momento de la cosecha.  
 Fig. 4. Performance of the grain yield of the plant at the time of harvest.



1: CA, 2: CAC2, 3: USDA 191, 4: CAC5, 5: ATCC 10004, 6: CAC8, 7: CAC9, 8: CAC14, 9: CAC16, 10: CAC17, 11: CAS2, 12: 25B6, 13: CAC7, 14: ATCC10317, 15: CAC4, 16: CF  
 a,b,c,d,e Letras diferentes difieren significativamente (P<0,05), DE= 73,32

Fig. 5. Comportamiento del peso de 1 000 granos de la planta en el momento de la cosecha.  
 Fig. 5. Performance of the weight of 1 000 grains of the plant at the time of harvest.



El rendimiento de nitrógeno fue estadísticamente superior en los tratamientos inoculados comparado con el control absoluto, excepto en CAC8 (461,2 mg/m<sup>2</sup>), CAC9 (442,3 mg/m<sup>2</sup>), CAC14 (492,8 mg/m<sup>2</sup>) y 25B6 (417,3 mg/m<sup>2</sup>) (fig. 6). Por otra parte, los inoculados con las cepas CAC5 (682,3 mg/m<sup>2</sup>), USDA 191 (655,1 mg/m<sup>2</sup>), CAC2 (629,6 mg/m<sup>2</sup>) y ATCC 10004 (637,6 mg/m<sup>2</sup>), resultaron significativamente superiores al control fertilizado (570,3 mg/m<sup>2</sup>).

En la figura 7 se muestra la agrupación sobre la base de las variables estudiadas. Se numeraron los grupos formados por tratamientos inoculados que se destacaron por sus valores estadísticamente superiores con respecto al tratamiento fertilizado (USDA 191, ATCC 10004, CAC5, CAC2, CAC16 y CAC17).

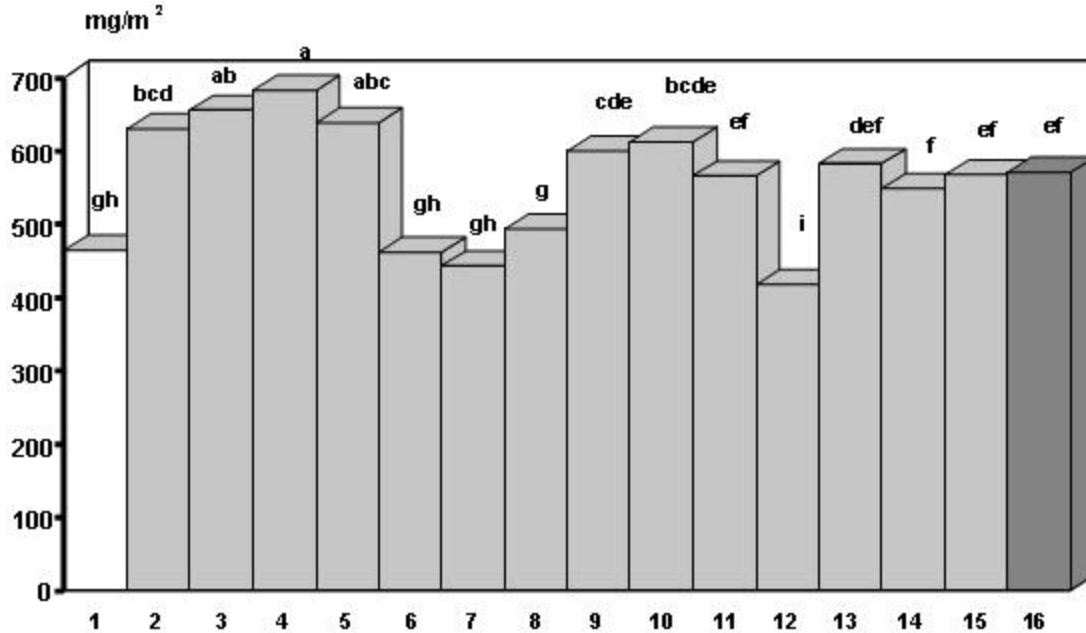
**Discusión**

En el presente experimento se constataron resultados superiores debido al efecto de la inoculación de trigo con cepas pertenecientes a diferentes géneros.

edaphoclimatic conditions, can be useful in agricultural practice, for developing physiological characteristics due to changes in the genome, that have positive influence on such results.

It was demonstrated, in spite of the low number of variables studied, that these strains can be a valuable biological resource for wheat fertilization under unfavorable soil and climate conditions of Cuba. In the aerial dry weight as well as stem length and grain yield, the treatments inoculated with the strains USDA 191 (*Sinorhizobium fredii*), ATCC 10004 (*Rhizobium leguminosarum*), CAC5, CAC2 and CAC7 (*Rhizobium leguminosarum*), which coincides with the results obtained by Slaski, Anyia, Archambault, Bécquer and Salas (2005), when inoculating plants of a Canadian wheat variety (CDC Teal) under greenhouse conditions.

The treatments inoculated with the strains CAC8, CAC9, CAC14, 25B6 and ATCC 10317 were the only ones that showed values statistically lower or equal to the absolute control in the aerial dry weight, which was also observed in a similar



1: CA, 2: CAC2, 3: USDA 191, 4: CAC5, 5: ATCC 10004, 6: CAC8, 7: CAC9, 8: CAC14, 9: CAC16, 10: CAC17, 11: CAS2, 12: 25B6, 13: CAC7, 14: ATCC10317, 15: CAC4, 16: CF  
 a,b,c,d,e,f,g,h,i Letras diferentes difieren significativamente (P<0,05), DE= 73,32

Fig. 6. Comportamiento del rendimiento de nitrógeno.  
 Fig. 6. Performance of the nitrogen yield.

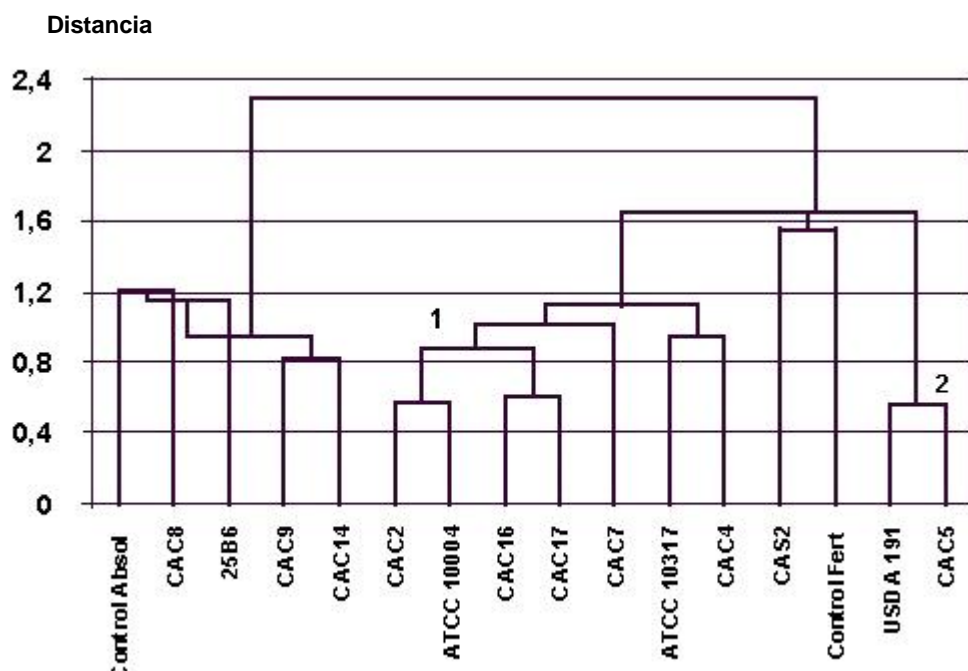


Fig. 7. Dendrograma

Fig. 7. Dendrogram.

Las cepas nativas de rizobios utilizadas proceden de zonas ganaderas de Alberta, Canadá, donde son escasas las precipitaciones y el suelo es arenoso y erosionado. Al aplicarlas en el presente ensayo, se tomó en cuenta que las condiciones edafoclimáticas correspondieran aproximadamente con las de la zona de origen. Se ha comprobado por otros autores (Prévost, 1987; Prévost, Bordeleau, Caudry-Reznich, Schulman y Antoun, 1987; Prévost, Drouin y Antoun, 1999) que los rizobios procedentes de zonas geográficas que se encuentran en condiciones edafoclimáticas estresantes, pueden ser útiles en la práctica agrícola, por desarrollarse características fisiológicas debido a cambios en el genoma, que influyen positivamente en dichos resultados.

Se demostró, a pesar del escaso número de variables estudiadas, que estas cepas pueden constituir un recurso biológico valioso para la fertilización del trigo en condiciones desfavorables de suelo y clima de Cuba. Tanto en el peso seco aéreo como en la longitud del tallo y el rendimiento de grano, sobresalieron los tratamientos inoculados con las cepas USDA 191 (*Sinorhi-*

experiment, but under greenhouse conditions, by Bécquer, Salas, Archambault, Slaski and Anyia (2005). This result may indicate a persistence of the physiological characteristics of the strains under different types of environment.

Other authors, such as Biswas, Ladha and Dazzo (2000), obtained statistical values higher in grain yield when inoculating rice with strains belonging to *Rhizobium* sp., *R. leguminosarum* and *Bradyrhizobium* sp. In the case of the treatments inoculated with the strains USDA 191 and CAC5 in the grain yield, when making the required extrapolation, both reached values of 1,91 t/ha and 1,89 t/ha, respectively, and although lower than the results obtained in Alquizar (Havana province), in the same variety (2,5 t/ha), with nitrogen fertilization and better soil and climate conditions (Villasana, Uranga and Pérez, 2005), these results show the productive potential of the cereal when inoculated with the adequate biological preparation.

In the weight of 1 000 grains the results may deviate from those obtained in the other variables. Only two treatments (CAC2 and CAC7),

*zobium fredii*), ATCC 10004 (*Rhizobium leguminosarum*), CAC5, CAC2 y CAC7 (*Rhizobium leguminosarum*), lo cual coincide con lo obtenido por Slaski, Anyia, Archambault, Bécquer y Salas (2005), al inocular plantas de una variedad canadiense de trigo (CDC Teal) en condiciones de invernadero.

Los tratamientos inoculados con las cepas CAC8, CAC9, CAC14, 25B6 y ATCC 10317 fueron los únicos que mostraron valores estadísticamente inferiores o iguales al control absoluto en el peso seco aéreo, lo cual fue observado también en un experimento similar, pero en condiciones de invernadero, por Bécquer, Salas, Archambault, Slaski y Anyia (2005). Este resultado pudiera indicar una persistencia de las características fisiológicas de las cepas en diferentes tipos de ambiente.

Otros autores, como Biswas, Ladha y Dazzo (2000), obtuvieron valores estadísticos superiores en el rendimiento de grano al inocular arroz con cepas pertenecientes a *Rhizobium* sp., *R. leguminosarum* y *Bradyrhizobium* sp. En el caso de los tratamientos inoculados con las cepas USDA 191 y CAC5 en el rendimiento de grano, al hacer la extrapolación requerida, ambos alcanzaron valores de 1,91 t/ha y 1,89 t/ha, respectivamente, y aunque inferiores a lo alcanzado en Alquízar (provincia La Habana), en la misma variedad (2,5 t/ha), con fertilización nitrogenada y mejores condiciones de suelo y clima (Villasana, Uranga y Pérez, 2005), estos resultados demuestran el potencial productivo que tiene el cereal al ser inoculado con el preparado biológico adecuado.

En el peso de 1 000 granos los resultados parecen desviarse de los obtenidos en las demás variables. Sólo dos tratamientos (CAC2 y CAC7), aunque sin diferir de otros (incluyendo el control absoluto), mostraron cierta superioridad en sus valores. El hecho de que el tratamiento no inoculado presentara valores similares al resto, pudiera indicar la influencia de las cepas nativas en la rizosfera de la planta. Por otra parte, al no evaluarse otras variables, como el número de hijos por macolla, quizás se haya perdido una parte de la explicación de ese resul-

although without differing from the rest (including the absolute control), showed certain superiority in their values. The fact that the non inoculated treatment showed values similar to the others may indicate the influence of the native strains on the rhizosphere of the plant. On the other hand, as no other variables were evaluated, such as the number of shoots per tiller, maybe part of the explanation of that result has been lost, because the effect of the strain may have had influenced this indicator, for which it is recommended to be taken into consideration for future essays.

In the nitrogen yield it was observed that although, in general, the results were similar to the ones obtained in the variable grain yield (which may have been influenced by the direct relationship of these variables), the treatments inoculated with the strains CAC5, USDA 191, CAC2 and ATCC 10004 stood out, which were higher than the fertilized control and that indicates a higher content of this macroelement in such treatments. As it was observed in this variable, there were four treatments (the last four) which did not stand out in grain yield; undoubtedly, the stimulating action of the corresponding strains must have favored the extraction of nitrogen in the rhizosphere, which was directly reflected on the mineral content of the grain, although some effect of nitrogen fixation by the rhizobia is not discarded, because evidence has been found of activity of the nitrogenase enzyme in wheat roots inoculated with rhizobia (Sabry *et al.*, 1997). It is convenient to observe that the strain CAS2 (*Sinorhizobium meliloti*) comes from root nodules of plants adapted to soils contaminated by hydrocarbons (Slaski, Bécquer, Salas, Anyia, Prévost, Cloutier and Archambault, 2005), for which the fact of having survived to such extreme conditions may have affected its capacity to produce plant-growth stimulating substances; hence its relatively lower results in the trial. Nevertheless, due to its provenance it potentially constitutes an option to be taken into consideration for crops under adverse environmental conditions.

In the dendrogram built based on the values of all the variables studied, different groups of statistically similar treatments were observed.

tado, ya que el efecto de la cepa podría haber influido en este indicador, por lo que se recomienda tenerlo en cuenta para futuros ensayos.

En el rendimiento de nitrógeno se observó que aunque, en sentido general, los resultados fueron similares a los obtenidos en la variable rendimiento de granos (lo cual pudo haber estado influido por la relación directa de estas variables), se destacaron los tratamientos inoculados con las cepas CAC5, USDA 191, CAC2 y ATCC 10004, los cuales fueron superiores al control fertilizado y ello indica un contenido superior de este macroelemento en dichos tratamientos. Como se observó en esta variable, hubo cuatro tratamientos (los cuatro últimos) que no se destacaron en el rendimiento de grano; indudablemente, la acción estimuladora de las cepas correspondientes debe haber favorecido la extracción de nitrógeno en la rizosfera, que se reflejó directamente en el contenido mineral del grano, aunque no se descarta algún efecto de la fijación de nitrógeno por los rizobios, ya que se han encontrado evidencias de actividad de la enzima nitrogenasa en raíces de trigo inoculadas con rizobios (Sabry *et al.*, 1997). Es conveniente notar que la cepa CAS2 (*Sinorhizobium meliloti*) proviene de nódulos radiculares de plantas adaptadas a suelos contaminados por hidrocarburos (Slaski, Bécquer, Salas, Anyia, Prévost, Cloutier y Archambault, 2005), por lo que el hecho de haber sobrevivido a dichas condiciones extremas pudo haber afectado su capacidad de producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal; de ahí sus resultados relativamente inferiores en el ensayo. No obstante, por su origen constituye potencialmente una opción a tener en cuenta para los cultivos en condiciones ambientales adversas.

Se observaron, en el dendrograma construido sobre la base de los valores de todas las variables estudiadas, diferentes grupos de tratamientos similares estadísticamente. Aquellos tratamientos que fueron seleccionados en más de una variable, resultaron agrupados en determinados conglomerados, enumerados para su identificación. De estas cepas, las nativas constituyeron el 40% del total de las que fueron evaluadas; mientras que las comerciales, el 50%.

Those treatments that were selected in more than one variable were grouped in certain conglomerates, numbered for their identification. From these strains, the native ones constituted 40% of the total evaluated; while the commercial ones were 50%.

It is concluded that the strains inoculated to the Cuban wheat variety Cuba C-204, may constitute a valuable resource for agricultural practice under stressing edaphoclimatic conditions. A group of strains selected based on their values statistically higher than the fertilized control, is recommended.

### Conclusions

- The treatments inoculated with the commercial strains USDA 191 and ATCC 10004, as well as the native Canadian CAC5, CAC2, CAC16, CAC17, were statistically higher than the fertilized control.
- The treatment inoculated with the strain CAS2 showed results relatively lower than the treatments selected; however, it was statistically higher than the absolute control in most of the variables.
- The application of rhizobia had remarkable influence on the integral development of the plant.
- It was demonstrated that the inoculated rhizobium strains may constitute a valuable biological resource for wheat fertilization in Cuba.

### Recommendations

- The strains that showed a statistically higher effect than the fertilized treatment are recommended for their application in agriculture. In addition, the strain CAS2 should be considered as an alternative to be applied in agricultural zones of stressing environments.
- The biofertilization with rhizobia in wheat is recommended as an alternative of high ecological and economic value for Cuban agriculture.

--End of the English version--

Se concluye que las cepas inoculadas a la variedad de trigo cubano Cuba C-204, pueden constituir un valioso recurso para la práctica agrí-

cola en condiciones edafoclimáticas estresantes. Se recomienda un grupo de cepas seleccionadas sobre la base de sus valores estadísticamente superiores al control fertilizado.

### Conclusiones

- Los tratamientos inoculados con las cepas comerciales USDA 191 y ATCC 10004, así como con las nativas canadienses CAC5, CAC2, CAC16 y CAC17, resultaron estadísticamente superiores al control fertilizado.
- El tratamiento inoculado con la cepa CAS2 mostró resultados relativamente inferiores a los tratamientos seleccionados; no obstante, fue superior estadísticamente al control absoluto en la mayoría de las variables.
- La aplicación de los rizobios influyó notablemente en el desarrollo integral de la planta.
- Se demostró que las cepas de rizobios inoculadas pueden constituir un recurso biológico valioso para la fertilización del trigo en Cuba.

### Recomendaciones

- Aplicar en la agricultura las cepas que mostraron un efecto estadísticamente superior al tratamiento fertilizado. Además, se debe considerar la cepa CAS2 como una alternativa para su aplicación en las zonas agrícolas de ambientes estresantes.
- Inocular el trigo con rizobios, como una alternativa de alto valor ecológico y económico para la agricultura cubana.

### Referencias bibliográficas

- Bécquer, C.J.; Salas, Beatriz; Archambault, D.; Slaski, J. & Anyia, A. 2005. Inoculación de trigo (*Triticum aestivum*, L.) con rizobios adaptados a ecosistemas ganaderos de Sancti Spiritus, Cuba. VI International Workshop on Plant Genetic Resources, FITOGEN'2005. Sancti Spiritus, Cuba. p. 146
- Biswas, J.C.; Ladha, J.K. & Dazzo, F.B. 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sc. Soc. of America J.* 64:1644
- Chabot, R.; Antoun, H.; Kloepper, J.W. & Beauchamp, Chantal. 1996. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2767
- Dakora, F.D. 2003. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phytol.* 158:39
- Okon, Y. & Kapulnik, Y. 1986. Development and functions of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant Soil.* 90:3
- Phillips, D.A. & Torrey, J.G. 1970. Cytokinin production by *Rhizobium japonicum*. *Physiol. Plant.* 23:1057
- Prévost, Danielle. 1987. Caractérisation des *Rhizobium* isolés de trois espèces de légumineuses arctiques: *Astragalus alpinus* L., *Oxytropis maydelliana* Trautv., et *Oxytropis arctobia* Bunge. (en francés). Thèse présentée à l'école des gradués de l'Université Laval pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.). Université Laval, Québec, Canada. 125 p.
- Prévost, Danielle; Bordeleau, L.M.; Caudry-Reznick, S.; Schulman, H.M. & Antoun, H. 1987. Characteristics of rhizobia isolated from three legumes indigenous to the Canadian high arctic: *Astragalus alpinus*, *Oxytropis maydelliana*, and *Oxytropis arctobia*. *Plant and Soil.* 98:313
- Prévost, Danielle; Drouin, P. & Antoun, H. 1999. The potential use of cold-adapted rhizobia to improve symbiotic nitrogen fixation in legumes cultivated in temperate regions. In: Biotechnical applications of cold-adapted organisms. (R. Margesin & F. Schinner, Eds.). Springer. p. 161
- Sabry, S.R.S.; Saleh, S.A.; Batchelor, Carolina A.; Jones, J.; Jotham, J.; Webster, G.; Kothari, S.L.; Davey, M.R. & Cocking, E.C. 1997. Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 264:341
- Saubidet, M.I.; Fatta, N. & Barneix, A.J. 2000. The effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant Soil.* 245:215
- Slaski, J.J.; Anyia, A.O.; Archambault, D.J.; Bécquer, C.J. & Salas, Beatriz. 2005. Diazotroph *Azorhizobium caulinodans* promotes growth of the Canadian wheat cultivars. Proceedings of the VI International Workshop on Collection and Evaluation of Plant Genetic Resources. Sancti Spiritus, Cuba. p. 150
- Slaski, J.J.; Bécquer, C.J.; Salas, Beatriz; Anyia, A.O.; Prévost, Danielle; Cloutier, J. & Archambault, D.J. 2005. Inoculation of wheat with native rhizobia isolated from plants adapted to livestock ecosystems of central Alberta, Canada. VI International Workshop on Plant Genetic Resources, FITOGEN'2005. Sancti Spiritus, Cuba. p. 144

- Somasegaran, P. & Hoben, H.J. 1994. Handbook for rhizobia. Springer-Verlag, New York. 450 p.
- Van Berkum, P. & Bohlool, B.B. 1980. Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. *Microbiol. Rev.* 44:491
- Villasana, R.; Uranga, H. & Pérez, D. 2005. ¿Es posible producir trigo en Cuba?. *Revista ACPA.* 4:16
- Webster, G.; Gough, C.; Vasse, J.; Batchelor, C.A.; Callaghan, K.J.O.; Kothari, S.L.; Davey, M.R.; Dénarie, J. & Cocking, E.C. 1997. Interactions of rhizobia with rice and wheat. *Plant and Soil.* 194:115
- Zavalin, A.A.; Kandaurova, T.M. & Vinogradova, L.V. 1998. Influence of nitrogen fixing microorganisms on the nutrition and productivity of spring wheat and on the characteristics of photosynthesis of different varieties of spring wheat. In: Biological nitrogen fixation for the 21<sup>st</sup> century. (C. Elmerich, A. Kondorosi and W.E. Newton, Eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. p. 413

Recibido el 5 de diciembre del 2006

Aceptado el 12 de marzo del 2007

## Maestría en Pastos y Forrajes

### Líneas de investigación priorizadas

1. Evaluación del potencial forrajero de plantas arbóreas y arbustivas de interés.
2. Evaluación de colecciones de gramíneas y leguminosas para diferentes condiciones de estrés edáfico.
3. Evaluación de gramíneas y leguminosas bajo condiciones de arbolado.
4. Mejoramiento genético de *Panicum maximum* y *Leucaena leucocephala* para su adaptación a suelos ácidos y de baja fertilidad.
5. Desarrollo de tecnologías de micropropagación en pastos, forrajes y otras plantas de interés ganadero.
6. Estudio de materiales de origen orgánico como fertilizantes y mejoradores de suelo para la producción de semillas.
7. Investigación del momento de cosecha, almacenamiento, tratamiento de las semillas en herbáceas, árboles y arbustos forrajeros.
8. Uso del follaje de los árboles forrajeros como fuente de fertilizantes para los pastos.
9. Estudio sobre sistemas de podas estratégicas en árboles forrajeros.
10. Estudios de sistemas silvopastoriles para la producción animal.
11. Estudios de sistemas de asociaciones múltiples de gramíneas y leguminosas para la producción animal.
12. Desarrollo de alternativas de sistemas sostenibles para la producción de leche y carne.
13. La amonificación de subproductos agrícolas e industriales para los sistemas de alimentación animal.
14. Estudios del valor nutritivo de árboles y arbustos forrajeros y otras fuentes de alimentos no convencionales.
15. Investigaciones de manejo y alimentación en ganado ovino y caprino en sistemas sostenibles de producción.