

## Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara

### Isolation and characterization of rhizobia strains isolated from different legumes in the Cascajal region, Villa Clara

Guianeya Pérez<sup>1</sup>, Gretel Gómez<sup>2</sup>, María C. Nápoles<sup>2</sup> y Belkis Morales<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones de Pastos Forrajes (IIPF)  
Carretera Central, Loma de Tierra, Cotorro, Ciudad de La Habana

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)

E-mail: guianeya@inca.edu.cu

#### Resumen

Se aislaron 19 cepas de rizobio a partir de los nódulos de las leguminosas *Canavalia ensiformis*, *Stylosanthes guianensis*, *Centrosema molle*, *Pueraria phaseoloides* y *Macroptilium atropurpureum*, con el objetivo de obtener inoculantes efectivos para dichos cultivos en suelos ácidos. Para la caracterización de los aislados bacterianos se estudiaron sus características micromorfológicas, tintoriales y culturales, así como algunas respuestas fisiológico-bioquímicas, tales como la excreción de ácido o base al medio de cultivo y el ensayo de la cetolactasa. Se hizo un ensayo de nodulación *in vitro* con cada una de las leguminosas para determinar la efectividad de los aislados. De acuerdo con las características culturales, la tasa de crecimiento en medio LMA y la producción de ácido o base, los aislados obtenidos pudieran pertenecer a los géneros *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* y/o *Sinorhizobium*. La prueba de la cetolactasa permitió conocer que ninguno de los aislados en estudio pertenece al género *Agrobacterium*. El ensayo con plantas inoculadas mostró que todas las cepas aisladas fueron efectivas en la nodulación, ya que nodularon en las leguminosas probadas. Se concluye que de las cepas aisladas 11 pudieran pertenecer al género *Bradyrhizobium*, mientras que las ocho restantes comparten características similares con los géneros *Rhizobium* y/o *Sinorhizobium*; todos los aislados fueron efectivos en la nodulación y pueden considerarse cepas promisorias para la obtención de inoculantes para las leguminosas forrajeras en estudio.

Palabras clave: Leguminosas, *rhizobium*, nodulación

#### Abstract

Nineteen rhizobium strains were isolated from the nodules of the legumes *Canavalia ensiformis*, *Stylosanthes guianensis*, *Centrosema molle*, *Pueraria phaseoloides* and *Macroptilium atropurpureum*, with the objective of obtaining effective inoculants for such crops in acid soils. For the characterization of the bacterial isolates, their micromorphological, staining and cultural characteristics were studied, as well as some physiological-biochemical responses, such as the excretion of acid or base to the culture medium and the cetolactase assay. An *in vitro* nodulation essay was performed with each legume to determine the effectiveness of the isolates. According to the cultural characteristics, the growth rate in YMA method and the production of acid or base, the isolates obtained could belong to the genera *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* and/or *Sinorhizobium*. The cetolactase test allowed to learn that none of the studied isolates belongs to the *Agrobacterium* genus. The trial with inoculated plants showed that all the isolated strains were effective in nodulation, because they nodulated in the tested legumes. It is concluded that from the isolated strains, 11 could belong to the genus *Bradyrhizobium*, while the other eight share similar characteristics with the genera *Rhizobium* and/or *Sinorhizobium*; all the isolates were effective in nodulation and they can be considered promising strains for obtaining inoculants for the studied forage legumes.

Key words: Legumes, *rhizobium*, nodulation

## Introducción

En la actualidad el uso indiscriminado de productos químicos en la agricultura constituye un problema global. Aunque estos promovieron un incremento considerable de los rendimientos agrícolas durante varios años, ahora son la principal causa de la pérdida de la fertilidad de los suelos, la contaminación de las aguas subterráneas y, en muchos casos, de daños a la salud humana. Esta situación se agudiza con la creciente demanda de alimentos y el agotamiento progresivo de los recursos no renovables de la Tierra. Por ello se hace evidente la necesidad de buscar alternativas que permitan la sostenibilidad agrícola.

Es conocida, desde hace más de ciento veinte años, la capacidad de las leguminosas para utilizar el  $N_2$  del aire, a través de la eficiente relación simbiótica que se establece entre estas plantas y las bacterias fijadoras de nitrógeno (diazotrofas), según Olivares (2004). El proceso de colonización de estas bacterias, si bien ocurre de forma natural, en ocasiones no resulta del todo eficiente, lo cual se debe, entre otras causas, a que la carga microbiana en los suelos es muy baja, como producto de la erosión. En los últimos años se ha incrementado el uso de rizobios como biofertilizantes, ya que los beneficios para las plantas y el suelo son apreciables.

Es por ello que la obtención de cepas de estos microorganismos para diferentes cultivos de leguminosas y que se encuentren adaptadas a diversas condiciones edafoclimáticas, constituye una alternativa económica y ecológicamente sustentable para la agricultura cubana en el mejoramiento de los cultivos, los suelos y los ecosistemas en general. Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue el aislamiento y la caracterización de cepas promisorias de rizobio para la producción de inoculantes.

## Materiales y Métodos

*Zona de muestreo.* La prospección de los nódulos se realizó en las áreas de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Cascajal,

## Introduction

Nowadays the indiscriminate use of chemicals in agriculture constitutes a global problem. Although they promoted a remarkable increase of agricultural yields for several years, they are now the main cause of soil fertility loss, contamination of underground waters and, in many cases, damage to human health. This situation is enhanced with the increasing demand for food and the progressive depletion of non renewable resources of the Earth. For such reason the need to find alternatives that allow agricultural sustainability becomes evident.

The capacity of legumes to use  $N_2$  from the air, through the efficient symbiotic relationship established between these plants and nitrogen fixing bacteria (diazotrophs) has been known for more than one hundred and twenty years, according to Olivares (2004). The colonization process of these bacteria, although occurring naturally, sometimes is not completely efficient, which is due, among other causes, to the fact that the microbial stock in the soils is very low, because of erosion. In recent years the use of rhizobia as biofertilizers has increased, because the benefits for the plants and soil are noticeable.

That is why obtaining strains of these microorganisms for different legume crops and which are adapted to different edaphoclimatic conditions, constitutes an economical and ecologically sustainable alternative for Cuban agriculture in the improvement of crops, soils and ecosystems in general. Taking into consideration the above-stated facts, the objective of this work was the isolation and characterization of promising rhizobium strains for the production of inoculants.

## Materials and Methods

*Sampling zone.* The prospecting of the nodules was carried out in the areas of the Experiment Station of Pastures and Forages of Cascajal, located in the Villa Clara province, on a Gley nodular ferruginous soil (Hernández *et al.*, 1999), pH 5.1.

ubicada en la provincia de Villa Clara, en un suelo Gley nodular ferruginoso (Hernández *et al.*, 1999) de pH 5,1.

*Prospección de nódulos.* Se muestrearon las leguminosas: *Canavalia ensiformis* (canavalia), *Stylosanthes guianensis* (stylo), *Centrosema molle* (centrosema), *Pueraria phaseoloides* (kudzú) y *Macroptilium atropurpureum* (siratro), según la metodología descrita por Beck, Materon y Afandi (1993). Se tomaron los nódulos de tamaño grande o mediano ubicados en la parte superior de la raíz principal. En todos los casos se escogieron plantas vigorosas en la etapa de la floración, sin indicios de ataque de plagas o enfermedades. Los nódulos fueron conservados adecuadamente para su posterior traslado hasta el laboratorio (Halliday y Date, 1976).

*Aislamiento y purificación de los rizobios.* La metodología utilizada para el aislamiento de las cepas a partir de los nódulos se ajustó a la descrita por Vincent (1970). Los cultivos se realizaron en medio levadura manitol agar (LMA) y fueron incubados a 28°C durante 10 días. Se seleccionaron aquellas colonias con características culturales semejantes a los rizobios, que no absorbieran el colorante rojo congo, y se realizaron pases sucesivos de ellas en LMA hasta obtener un cultivo puro. Posteriormente se conservaron en cuñas de este mismo medio a 4°C. La pureza de los cultivos, así como sus características tintoriales y la morfología de las células, se determinaron mediante la tinción de Gram (Sosa, Elías, García y Sarmiento, 2004).

El estudio de las características culturales de las cepas (forma y tamaño de las colonias, color y textura) y de la tasa de crecimiento, se realizó mediante la siembra de cada uno de los aislados en medio LMA a pH 6,8 y se incubaron 10 días a 28°C. Después se observó mediante un microscopio estereoscópico.

*Producción de ácido o base.* Se cultivó cada uno de los aislados en medio LMA (pH 6,8) con indicador azul de bromotimol (0,5% en NaOH 0,016N) y en LMA (pH 5,5) con púrpura de bromocresol a igual concentración, incubados a 28°C, durante diez días, según la tasa de crecimiento de cada una de las cepas. Una vez con-

*Nodule prospecting.* The legumes: *Canavalia ensiformis*, *Stylosanthes guianensis*, *Centrosema molle*, *Pueraria phaseoloides* and *Macroptilium atropurpureum* were sampled, according to the methodology described by Beck, Materon and Afandi (1993). The large or medium-size nodules located in the top part of the main root were taken. In all cases vigorous plants in the flowering stage were chosen, without signs of pest or disease attack. The nodules were adequately conserved for their later transference to the laboratory (Halliday and Date, 1976).

*Isolation and purification of the rhizobia.* The methodology used for the isolation of strains from the nodules was adjusted to the one described by Vincent (1970). The cultures were made in yeast mannitol agar medium (YMA) and were incubated at 28°C for 10 days. Those colonies with cultural characteristics similar to the rhizobia were selected, which would not absorb Congo red staining, and they were successively put in YMA until obtaining a pure culture. Afterwards, they were conserved in wedges of this same medium at 4°C. The purity of the cultures, as well as their staining characteristics and the morphology of the cells, were determined through Gram staining (Sosa, Elías, García and Sarmiento, 2004).

The study of the cultural characteristics of the strains (size and form of the colonies, color and texture) and of the growth rate, was carried out by sowing each isolate in YMA medium at pH 6,8 and incubating them for 10 days at 28°C. Afterwards, observation was made through a stereoscopic microscope.

*Acid or base production.* Each isolate was cultivated in YMA medium (pH 6,8) with bromothymol blue indicator (0,5% in NaOH 0,016N) and in YMA (pH 5,5) with bromocresol purple at the same concentration, incubated at 28°C, for ten days, according to the growth rate of each strain. Once the growth was concluded color change was observed in the medium (Sosa *et al.*, 2004).

*Cetolactase essay.* All the isolates were cultivated in yeast-lactose-agar (YLA) medium and were incubated at 28°C, for three and seven

cluido el crecimiento se observó cambio de coloración en el medio (Sosa *et al.*, 2004).

*Ensayo de la cetolactasa.* Todos los aislados fueron cultivados en medio levadura-lactosa-agar (LLA) y se incubaron a 28°C, durante tres y siete días de acuerdo con la cepa. Transcurrido este tiempo se añadieron 10 mL del reactivo de Benedict sobre el crecimiento y al cabo de 10 minutos se observó el cambio de coloración del medio.

*Ensayo de nodulación.* Las semillas se desinfectaron con etanol al 70% y posteriormente con hipoclorito de sodio al 25% (v/v), durante cinco minutos en cada caso; las de siratro se trataron durante 10 min con ácido sulfúrico concentrado. Después de la desinfección, se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril y se incubaron en la oscuridad durante 24 horas a 30°C para su germinación. Las semillas con raíces emergentes (de aproximadamente 1-2 cm) se colocaron en tubos de ensayo que contenían 30 mL del medio Norris y Date (Norris y Date, 1976) semisólido, a razón de una semilla por tubo.

Las semillas de canavalia se sembraron en cubitos que contenían suelo estéril. Las raíces de las plantas se inocularon cinco días después, descargando con micropipeta 1 mL de inóculo a una concentración de  $10^8$ UFC.mL<sup>-1</sup>, preparado en medio LMA líquido y en condiciones de agitación, durante 24 horas para las cepas de crecimiento rápido y tres días para las de crecimiento lento.

Cada cultivo se inoculó en la leguminosa de origen y en siratro, utilizada como control de la nodulación. En todos los casos las plantas se mantuvieron en condiciones controladas de luz/oscuridad de 16/8 horas, a una temperatura de 25°C y humedad relativa del 70%. Cuatro semanas después se determinó el número de nódulos en las raíces de las plantas y su coloración, como un método visual para conocer su efectividad (FAO, 1985).

### Resultados y Discusión

*Aislamiento y purificación.* Para la selección de las colonias típicas de este grupo de bacterias, un elemento esencial fue la falta de absor-

days according to the strain. After that time 10 mL of Benedict reagent were added on the growth and after 10 minutes the color change of the medium was observed.

*Nodulation essay.* The seeds were disinfected with ethanol at 70% and afterwards with sodium hypochlorite at 25% (v/v), for five minutes in each case. The seeds from *M. atropurpureum* were treated for ten minutes with concentrated sulfuric acid. After the disinfection, they were washed several times with sterile distilled water and were incubated in the dark for 24 hours at 30°C for their germination. The seeds with emerging roots (approximately 1-2 cm long) were placed in test tubes that contained 30 mL of the semisolid Norris and Date medium (Norris and Date, 1976), at a rate of one seed per test tube.

The seeds from *C. ensiformis* were sown in small buckets which contained sterile soil. The roots of the plants were inoculated five days later, discharging with micropipette 1 mL of inoculum at a concentration of  $10^8$ CFU.mL<sup>-1</sup>, prepared in liquid YMA medium and under shaking conditions, during 24 hours for the fast-growth strains and three days for the slow-growth strains.

Each culture was inoculated in the leguminous plant of origin and in *M. atropurpureum*, used as nodulation control. In all cases the plants were maintained under controlled conditions of light/darkness of 16/8 hours, at a temperature of 25°C and relative humidity of 70%. Four weeks later the number of nodules in the plant roots and their color were determined, as a visual method for knowing the effectiveness (FAO, 1985).

### Results and Discussion

*Isolation and purification.* For the selection of the typical colonies of this group of bacteria, an essential element was the lack of absorption of the Congo red dye. In general, the rhizobia colonies are observed white or slightly pink, because they do not absorb this dye (Sosa *et al.*, 2004). As a result of the selection, a total of 19 colonies were isolated: six from *C. ensiformis*, four from *S. guianensis* and three from *C. molle*, *P. phaseoloides* and *M. atropurpureum*, respectively.



ción del colorante rojo congo. Por lo general, las colonias de rizobios se observan blancas o ligeramente rosadas, debido a que no absorben este colorante (Sosa *et al.*, 2004). Como resultado de la selección, se aislaron 19 colonias en total: seis procedentes de canavalia, cuatro de stylosantes y tres de centrosema, kudzú y siratro, respectivamente.

*Ensayo de la cetolactasa.* Este ensayo resultó negativo en todos los casos, lo que indicó que ninguno de los aislados en estudio pertenecía al género *Agrobacterium*, muy similar fenotípicamente a las especies del género *Rhizobium* (Sosa *et al.*, 2004).

*Caracterización micromorfológica y cultural.* Dentro del grupo de los rizobios se agrupan bacterias que difieren en cuanto a sus características morfológicas, culturales y fisiológico-bioquímicas; de ahí que existan nueve géneros. Los más conocidos son: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, y los cuatro últimos son los de mayor número de especies descritas (Lloret y Martínez-Romero, 2005).

Para realizar el estudio fenotípico de las bacterias pertenecientes al grupo de los rizobios es necesario tener en cuenta las características de morfología celular y colonial, así como las bioquímicas y fisiológicas, entre otras. El cúmulo de estos datos se evalúa mediante un análisis de agrupamiento (taxonomía numérica) que permite ubicar estos microorganismos en los distintos géneros y especies reportados hasta ahora en la literatura (Wang, Martínez-Romero y López Lara, 2001).

En este trabajo se observó, mediante la tinción de Gram, que la morfología de las células y sus características tintoriales se correspondían con las descritas para este grupo de bacterias: las células eran bacilos Gram negativos, de pequeño tamaño, finos y no formaban esporas. De forma general, estas aparecen en los diferentes géneros de rizobios (Garrity y Holt, 2001). Sin embargo, el estudio de las características culturales y las fisiológicas, así como la producción y excreción de compuestos al medio de cultivo, no es común entre todos los géneros de rizobios.

*Cetolactase essay.* This essay turned out to be negative in all cases, which indicated that none of the isolates under study belonged to the *Agrobacterium* genus, very similar phenotypically to species of the *Rhizobium* genus (Sosa *et al.*, 2004).

*Micromorphological and cultural characterization.* Within the rhizobia group bacteria are included which differ regarding their morphological, cultural and physiological-biochemical characteristics; hence there are nine genera. The best known ones are: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium*, and the last four are those with higher number of described species (Lloret and Martínez-Romero, 2005).

In order to perform the phenotypical study of the bacteria belonging to the rhizobia group, it is necessary to take into consideration the characteristics of cellular and colonial morphology, as well as the biochemical and physiological characteristics, among others. The total of these data is evaluated by means of a grouping analysis (numerical taxonomy) which allows to place these microorganisms in the different genera and species reported until now in literature (Wang, Martínez-Romero and López Lara, 2001).

In this work it was observed, by means of Gram staining, that the morphology of the cells and their staining characteristics were in correspondence with those described for this group of bacteria: the cells were small, fine, Gram-negative bacilli, and did not form spores. In general, they appear in the different rhizobia genera (Garrity and Holt, 2001). Nevertheless, the study of the cultural and physiological characteristics, as well as the production and excretion of compounds to the culture medium, is not common among all the rhizobia genera.

The study of these characteristics showed that among the isolates under study there were morphological and physiological characteristics that allowed to form two groups (fig. 1).

The first group of isolates was formed by fast-growth bacteria, which formed large and mucous colonies in YMA medium, and excreted acid substances. These particularities are common in

El estudio de estas características mostró que entre los aislados en estudio existían diferencias morfológicas y fisiológicas que permitían formar dos grupos (fig. 1).

El primer grupo de aislados se caracterizó por ser bacterias de crecimiento rápido, que formaban colonias grandes y mucosas en medio LMA, y excretaban sustancias ácidas. Estas particularidades son comunes en las especies de los géneros de crecimiento rápido *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, que forman la familia *Rhizobiaceae* y se caracterizan por presentar colonias grandes de 2-5 mm, circulares, blancas o de color beige, convexas, semitraslúcidas y mucilaginosas (Anon 1994; Wang et al., 2001). Mediante las características estudiadas en este trabajo no fue posible diferenciar estos dos géneros, ya que no existían diferencias fenotípicas entre ellos debido a su cercanía filogenética (Lloret y Martínez-Romero, 2005). Para identificar cada uno de ellos es necesario un estudio más profundo que incluya técnicas genéticas y moleculares.

Un segundo grupo de aislados se caracterizó por crecer muy lentamente a partir de los 5-7 días, formar colonias de muy pequeño tamaño, sin producción de mucus y con la excreción de sustancias básicas al medio. Este comportamiento coincide con el descrito para el género de crecimiento lento *Bradyrhizobium*, el cual forma colonias pequeñas que miden menos de 1 mm, son circulares, secas, rara vez traslúcidas, blan-

the species from fast-growth genera *Rhizobium* and *Sinorhizobium*, which form the family *Rhizobiaceae* and are characterized by presenting large 2-5 mm colonies, round, white or beige, convex, semi-translucent and mucilaginous (Anon, 1994; Wang et al., 2001). By means of the characteristics studied in this work it was not possible to differentiate these two genera, because there were no phenotypical differences between them due to their phylogenetic proximity (Lloret and Martínez-Romero, 2005). To identify each one of them a further study is necessary, including genetic and molecular techniques.

A second group of isolates was characterized by growing very slowly from 5-7 days, forming very small colonies, without mucus production and with the excretion of basic substances to the medium. This behavior coincides with the one described for the slow-growth genus *Bradyrhizobium*, which forms small colonies measuring less than 1 mm, that are round, dry, rarely translucent, white, convex and tend to be granulose (Sosa et al., 2004).

Although the rhizobia genera are defined based on the phylogeny of the genes 16S rRNA, some have phenotypical characteristics which distinguish them from the others. The morphological and physiological study that is commonly carried out for the characterization of these microorganisms, although not defining

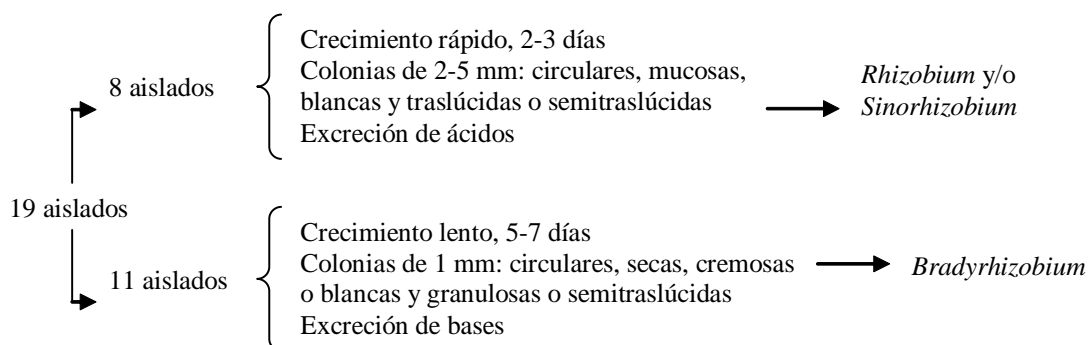


Fig. 1. Relación de las características culturales, la tasa de crecimiento y la producción de ácido o base de los diferentes aislados de rizobios.

Fig. 1. Relation of the cultural characteristics, growth rate and production of acid or base of the different rhizobia isolates.

cas, convexas y tienden a ser granuladas (Sosa *et al.*, 2004).

Aunque los géneros de rizobios se definen sobre la base de la filogenia de los genes 16S rRNA, algunos tienen características fenotípicas que los distinguen de los demás. El estudio morfológico y fisiológico que comúnmente se lleva a cabo para la caracterización de estos microorganismos, si bien no es definitorio para la clasificación taxonómica de las cepas de rizobios, permite al menos diferenciar géneros muy diferentes fenotípicamente entre sí; tal es el caso de *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y la familia *Rhizobiaceae* (Wang *et al.*, 2001). Es por ello que en este trabajo se proponen, como posibles miembros de la familia *Rhizobiaceae* (géneros *Rhizobium* y/o *Sinorhizobium*), ocho de las 19 cepas de rizobios en estudio; mientras que los 11 restantes posiblemente pertenecen al género *Bradyrhizobium*.

De las ocho cepas de crecimiento rápido seis se lograron a partir de los nódulos de canavalia y las dos restantes de centrosema y kudzú, respectivamente. Sin embargo, los aislados de crecimiento lento se obtuvieron en todas las leguminosas muestreadas, excepto en canavalia, distribuidos de la siguiente manera: cuatro en stylo, tres en siratro y dos en kudzú y centrosema, respectivamente. Resulta interesante que en centrosema y kudzú se aislaron cepas de diferentes géneros de rizobios, lo cual evidencia la promiscuidad descrita para cierto tipo de leguminosa (Lloret y Martínez-Romero, 2005). Por otra parte, es de destacar que de los nódulos de stylo se aislaron cepas que, por sus características, pudieran pertenecer al género *Bradyrhizobium*; sin embargo, en la literatura se describe que esta leguminosa es comúnmente nodulada por el género de crecimiento rápido *Rhizobium*. Debe señalarse que el presente estudio carece de una profundización a nivel molecular, por lo que estos resultados no son definitivos.

*Ensayo de inoculación in vitro.* Uno de los pasos fundamentales en el aislamiento de células de rizobios es el bioensayo de inoculación *in vitro*. Este permite verificar si realmente el aislamiento corresponde con una cepa de rizobio y, además, si ésta es efectiva en la nodulación.

for the taxonomic classification of the rhizobia strains, allows at least to differentiate genera that are very different phenotypically from each other; such is the case of *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* and the *Rhizobiaceae* family (Wang *et al.*, 2001). That is why in this work eight of the rhizobia strains under study are proposed as possible members of the *Rhizobiaceae* family (genera *Rhizobium* and/or *Sinorhizobium*); while the other 11 possibly belong to the *Bradyrhizobium* genus.

Of the eight fast-growth strains, six were obtained from the nodules of *C. ensiformis* and the other two from *C. molle* and *P. phaseoloides*, respectively. However, the slow-growth isolates were obtained in all the legumes sampled, except in *C. ensiformis*, distributed as follows: four in *S. guianensis*, three in *M. atropurpureum* and two in *P. phaseoloides* and *C. molle*, respectively. It is interesting that in *C. molle* and *P. phaseoloides* strains of different rhizobia genera were isolated, which shows the promiscuity described for a certain type of legumes (Lloret and Martínez-Romero, 2005). On the other hand, it should be emphasized that from the *S. guianensis* nodules strains were isolated which, because of their characteristics could belong to the *Bradyrhizobium* genus; yet, in literature this legume is described as commonly nodulated by the fast-growth genus *Rhizobium*. It must be stated that this research lacks further studies at molecular level, for which these results are not definitive.

*In vitro inoculation assay.* One of the main steps in the isolation of rhizobia cells is the *in vitro* inoculation bioassay. It allows to verify if the isolation really corresponds to one rhizobium strain and, besides, if this strain is effective in nodulation.

All the strains evaluated were positive to nodulation, because they nodulated in *M. atropurpureum* and in the legume of origin in each case; several nodules were obtained per plant, relatively large and reddish in their interior. The presence of leghemoglobin, enzyme that causes the red color, indicates the efficiency of the biological fixation of nitrogen (Briones, 2001).

Todas las cepas evaluadas fueron positivas a la nodulación, ya que nodularon en siratro y en la leguminosa de origen en cada caso; se obtuvieron varios nódulos por planta, de tamaño relativamente grande y de coloración rojiza en su interior. La presencia de la leghemoglobina, enzima que provoca el color rojo, indica la eficiencia de la fijación biológica del nitrógeno (Briones, 2001).

Las cepas aisladas de canavalia fueron efectivas en siratro; sin embargo, no fueron capaces de nodular en condiciones de laboratorio a la leguminosa de origen. Este resultado pudiera deberse a factores abióticos, como la intensidad de la luz, la humedad relativa y otros que influyen en el proceso de fijación biológica. Para asegurar la ineffectividad de estas cepas en la nodulación tendrían que realizarse otros ensayos de inoculación *in vitro*, en condiciones ambientales diferentes.

Este trabajo, basado en el estudio de las características culturales, tintoriales y fisiológicas, permitió ubicar once de las cepas en estudio dentro del género *Bradyrhizobium* y las ocho restantes en los géneros *Rhizobium* y/o *Sinorhizobium*. Se observó promiscuidad en centrosema y kudzú con relación a su simbiosis con los rizobios, ya que se aislaron cepas pertenecientes a diferentes géneros en un mismo tipo de cultivo. De acuerdo con los resultados del bioensayo, se pueden considerar los aislados de rizobios como microorganismos promisorios para la inoculación de las leguminosas forrajeras estudiadas.

Se recomienda continuar el estudio de selección de cepas eficientes para diferentes cultivos, así como la clasificación más precisa de los aislados con el empleo de otras técnicas de la taxonomía convencional y polifásica.

#### Referencias bibliográficas

- Anon. 1994. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9<sup>th</sup> edition. The William and Wilkins Co., Baltimore, USA. p. 78
- Beck, D.P.; Materon, L.A. & Afandi, F. 1993. Practical rhizobium-legume technology manual. ICARDA. Syria p. 55
- The strains isolated from *C. ensiformis* were effective in *M. atropurpureum*; however, they were not able to nodulate under laboratory conditions in the legume of origin. This result could be due to abiotic factors, such as light intensity, relative humidity and others that influence the process of biological fixation. To ensure the ineffectiveness of these strains in nodulation other *in vitro* inoculation assays should be developed, under different ambient conditions.
- This work, based on the study of the cultural, staining and physiological characteristics, allowed to place eleven of the strains under study within the *Bradyrhizobium* genus and the other eight in the genera *Rhizobium* and/or *Sinorhizobium*. Promiscuity was observed in *C. molle* and *P. phaseoloides* with regards to their symbiosis with the rhizobia, because strains belonging to different genera were isolated in the same crop type. According to the results of the bioassay, the rhizobia isolates can be considered promising microorganisms for the inoculation of the studied forage legumes.
- To continue the selection study of efficient strains for different crops is recommended, as well as the most precise classification of the isolates with the use of other techniques of conventional and multiphase taxonomy.
- End of the English version--
- Briones, G. 2001. Factores de virulencia en *Brucella abortus*: Caracterización bioquímica y genética de la biosíntesis del glucano 1-2 cíclico y estudio de su participación en la virulencia. Tesis para optar al Título de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Nacional de San Martín. Lima, Perú
- FAO. 1985. Les inoculums de légumineuses et leurs applications. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. Roma. 63 p.
- Garrity, G.M. & Holt, J.G. 2001. The road map to the manual. In: Bergey's Manual of systematic bacteriology. 2<sup>nd</sup> edition. Volume I. (Eds. Boone, D.R., Castenholz, R.W. & Garrity, G.M.). Springer-Verlag, New York, USA. p. 119
- Halliday, J. & Date, R.A. 1976. Manual para la colección, preservación y caracterización de recursos forrajeros tropicales. CIAT, Colombia. p. 28



- Hernández, A. et al. 1999. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. Ministerio de la Agricultura. La Habana, Cuba. 64 p.
- Lloret, L. & Martínez-Romero, E. 2005. Evolución y filogenia del *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47 (1-2):43
- Norris, D.O. & Date, R.A. 1976. Legume bacteriology. Tropical pasture research. Principles and methods. *CAB Bull.* 51:134
- Olivares, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. Estación Experimental del Zaidín-CSIC, Granada. <http://www.eez.csic.es/~olivares/ciencia/fijacion/> Consulta: [12 de noviembre del 2007]
- Sosa, A.; Elías, A.; García, O.A. & Sarmiento, M. 2004. Aislamiento y caracterización fenotípica parcial de cepas de rizobios que nodulan leguminosas rastreras. *Rev. cubana Cienc. agríc.* 38 (2):197
- Vincent, J.M. 1970. A Manual for the practical study of root nodules bacteria. Blackwell Sci. Publications. Oxford, England
- Wang, E.T.; Martínez Romero, J. & López Lara, I. 2001. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. En: Microbios. (Eds. E. Martínez Romero y J.C. Martínez Romero). Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México, México

Recibido el 22 de enero del 2008  
Aceptado el 22 de marzo del 2008

**V CONGRESO LATINOAMERICANO DE AGROFORESTERÍA  
PARA LA PRODUCCIÓN PECUARIA SOSTENIBLE  
1-5 de Diciembre de 2008, Maracay, Venezuela  
Red Latinoamericana de Agroforestería Pecuaria**

**Temáticas propuestas**

1. Impacto de los sistemas ganaderos tradicionales en la degradación de la tierra y la desertificación.
2. Cambio climático y su impacto en los sistemas ganaderos.
3. Efectos de las heladas y el papel de los sistemas silvopastoriles como adaptación de la ganadería a este fenómeno.
4. Estrategias para la adaptación de los sistemas ganaderos al cambio climático.
5. Avances en el uso de árboles y arbustos forrajeros para la alimentación animal
6. Valoración de servicios ambientales de los sistemas silvopastoriles: secuestro de carbono, biodiversidad y agua, balance de gases de efecto invernadero. Mercados para estos servicios.
7. Avances en los sistemas silvopastoriles para la certificación de productos pecuarios "verdes" y generación de servicios ambientales en paisajes agrícolas dominados por la ganadería tropical. Cadenas del valor.
8. Evaluación socioeconómica de sistemas agroforestales y silvopastoriles.
9. Políticas para la difusión de sistemas silvopastoriles.

**Contactos**

Vicepresidente: Dr. Alfredo Baldizan, IDESSA-UNERG [baldizanalfredo@yahoo.com](mailto:baldizanalfredo@yahoo.com)

Secretario Ejecutivo: M.Sc. Freddy Espinoza, CENIAP-INIA [f\\_espinoza@inia.gov.ve](mailto:f_espinoza@inia.gov.ve);  
[fmespinoza@cantv.net](mailto:fmespinoza@cantv.net)

Presidente del Comité Científico: Dr. Carlos Domínguez, Director IDESSA - UNERG  
[cdomig@cantv.net](mailto:cdomig@cantv.net)

Organizador Profesional del Congreso: Dr. Jesús Suárez Hernández, EEPF "Indio Hatuey"  
(Cuba) [jesus.suarez@indio.atenas.inf.cu](mailto:jesus.suarez@indio.atenas.inf.cu)

**Mayor información:** <http://www.ganaderiayagroforesteria.org>

## Reseñas de Publicaciones



### Cría de conejos

**Autor:** José Luis Barbado

Editorial Albatros. Buenos Aires, Argentina  
2006

El libro consta de un total de 190 páginas y está subdividido en 12 capítulos; consta además de un prólogo, una introducción, un panorama mundial y un panorama argentino acerca de la producción cunícula y la necesidad de su incremento en ese país.

El primer acápite del texto aborda el origen y las características de las razas de conejos más conocidas y distribuidas en el mundo; el segundo trata acerca de las características de la conejera y las condiciones básicas de las jaulas, así como algunas formas artesanales de construcción y los materiales que se pueden utilizar. Los tres siguientes acápites brindan una información pormenorizada de la fisiología del sistema digestivo de los conejos, las necesidades de nutrientes para cada una de las categorías productivas y las implicaciones que trae para la salud de los animales la deficiencia o el exceso de determinado nutrimento; además, describe los principales grupos de alimentos más comúnmente usados en la alimentación de los conejos.

El sexto acápite describe la anatomía de los órganos genitales masculino y femenino, y la fisiología de la gestación y la lactación; también el autor brinda algunas lecciones para lograr el éxito en la reproducción y la cría de estos animales. En el siguiente acápite se ofrecen conceptos de genética, como el cruzamiento consanguíneo y la hibridación; y de igual forma se dan recomendaciones prácticas para seleccionar las razas a utilizar y para lograr un manejo adecuado del conejar en cada una de las categorías productivas. A continuación se dan algunos consejos para aquellos productores que se inician en la crianza de conejos y en particular los cuidados especiales que necesita la raza Angora.

Después se brinda una sección dedicada a los principales productos obtenidos a partir de los conejos como son: la carne, la piel, el pelo y la lana, y se indica su importancia como animal de laboratorio para investigaciones hematológicas y toxicológicas. Por último, están los acápites dedicados a las enfermedades de esta especie y las principales recetas de cocina para preparar la carne, así como una guía de microemprendimiento con los elementos básicos sobre gestión de negocios a escala familiar y la comercialización de los productos.

Como se puede apreciar, estamos ante un libro que en apretada síntesis nos brinda los principios del manejo y la explotación del conejo y la forma para lograr la rentabilidad del proceso productivo. No obstante, los acápites 4 y 5 (referidos a la alimentación) deben leerse teniendo el cuidado de obviar determinadas sugerencias como la de alimentar a los conejos con cereales y algunos otros productos que pueden competir con la alimentación humana.

*M.Sc. Onel López Vigoa*