

Efecto de la inoculación con rizobios procedentes de Alberta, Canadá, en sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), en condiciones de campo

Effect of the inoculation with rhizobia from Alberta, Canada, in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench), under field conditions

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

*Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, Estación Experimental Sancti Spíritus, Apdo 2228, Sancti Spíritus, Cuba
E-mail: pastosp@yayabo.inf.cu*

Resumen

Se realizó un experimento de campo con el objetivo de medir el efecto de cepas de rizobio en las variables agronómicas del sorgo, en las condiciones ambientales de Sancti Spíritus, Cuba. Se utilizaron 10 cepas de *Sinorhizobium meliloti*, procedentes de ecosistemas ganaderos de Alberta, Canadá; así como cuatro cepas de referencia pertenecientes a diferentes géneros y especies de rizobio, que procedían de la colección de *Agriculture and AgriFood Canada*. La confección de los inóculos y la inoculación de las semillas se realizaron por métodos estándar. El diseño experimental fue de bloques al azar, con 16 tratamientos y cuatro réplicas. Se evaluó el peso seco aéreo, la longitud del tallo y la longitud de la panoja; además, se calculó el incremento del peso seco aéreo en los tratamientos inoculados con relación al control absoluto. Los resultados demostraron la capacidad de las cepas estudiadas de influir en las variables agronómicas, ya que los tratamientos seleccionados igualaron sus valores a los del control fertilizado y presentaron un incremento de más del 100% del peso seco aéreo, comparado con el control absoluto.

Palabras clave: Ecosistema, inoculación, *Sinorhizobium*, *Sorghum*

Abstract

A field trial was conducted with the objective of measuring the effect of rhizobium strains on the agronomic variables of sorghum under the environmental conditions of Sancti Spiritus, Cuba. Ten *Sinorhizobium meliloti* strains, from livestock production ecosystems of Alberta, Canada, were used; as well as four reference strains belonging to different rhizobium genera and strains, which were from the collection of *Agriculture and AgriFood Canada*. The inoculi confection and seed inoculation were made by standard methods. The experimental design was randomized blocks, with 16 treatments and four replications. The dry aerial weight, stem length and ear length were evaluated; in addition, the increase of aerial dry weight was calculated in the inoculated treatments as compared to the absolute control. The results proved the capacity of the studied strains to influence the agronomic variables, because the selected treatments equaled their values to those of the fertilized control and showed an increase higher than 100% of the aerial dry weight, with regards to the absolute control.

Key words: Ecosystem, inoculation, *Sinorhizobium*, *Sorghum*

Introducción

Aunque existen investigaciones sobre la posibilidad de inducir nódulos radiculares con rizobios en plantas no pertenecientes a la familia de las leguminosas (Kalia y Gupta, 2002), el éxito de la biofertilización de cereales y otras plantas se basa principalmente en la estimulación del crecimiento vegetal por medio de la secreción de sustancias hormonales por bacterias rizosféricas (Chabot *et al.*, 1996; Antoun *et al.*, 1998; Prévost *et al.*, 2000).

Chi *et al.* (2005) plantearon que los rizobios pueden infectar las raíces de los cereales e influir positivamente en los indicadores fisiológicos de la planta. Hafeez *et al.* (2004) determinaron que al igual que el *Azotobacter*, los rizobios también incrementan la biomasa aérea, el contenido de nitrógeno y otras variables, en las plantas de algodón.

El sorgo (*Sorghum vulgare* o *Sorghum bicolor*) es una hierba (de la familia *Poaceae*) que se usa como forraje, y sus semillas para hacer harina. Es un cultivo alimenticio importante en África, América Central y Asia meridional (Nápoles, 2006). En Cuba se utiliza indistintamente, como fuente de grano para los monogástricos y de forraje para el ganado vacuno.

En el país existen problemas de salinidad (un millón de hectáreas), erosión (media a fuerte) y alta compactación, así como un incremento de los suelos no fértiles y la desarborización. El sorgo puede ser una opción favorable para la agricultura, ya que es capaz de soportar las condiciones de sequía debido a su sistema radical muy desarrollado y fibroso. Los antecedentes que existen en el país acerca de la fertilización del cultivo son limitados, aunque según Chaviano (2005) el cereal responde bien a la fertilización orgánica.

Antes de la realización del presente trabajo, no existían antecedentes en Cuba sobre la utilización de rizobios en sorgo. No obstante, la necesidad de desarrollar este cultivo en suelos de escasa fertilidad, obliga necesariamente a un correcto manejo agronómico en la nutrición, que conduzca a una máxima precisión en las vías, fuentes, dosis y momento de aplicación de los

Introduction

Although there are studies about the possibility of inducing root nodules with rhizobia in plants which do not belong to the legume family (Kalia and Gupta, 2002), the success of the biofertilization of cereals and other plants is based mainly on the stimulation of plant growth through the secretion of hormonal substances by rhizosphere bacteria (Chabot *et al.*, 1996; Antoun *et al.*, 1998; Prévost *et al.*, 2000).

Chi *et al.* (2005) stated that rhizobia can infect cereal roots and positively influence the physiological indicators of the plant. Hafeez *et al.* (2004) determined that like *Azotobacter*, rhizobia also increase the aerial biomass, nitrogen content and other variables in cotton plants.

Sorghum (*Sorghum vulgare* or *Sorghum bicolor*) is a grass (from the family *Poaceae*) which is used as forage, and its seeds are used for meal. It is an important food crop in Africa, Central America and southern Asia (Nápoles, 2006). In Cuba it is indistinctly used, as a source of grain for monogastric animals and of forage for cattle.

In the country there are salinity (one million hectares), erosion (moderate to strong) and high compaction problems, as well as an increase of non fertile soils and deforestation. Sorghum can be a favorable option for agriculture, because it is capable of standing drought conditions due to its highly developed and fibrous root system. The antecedents existing in the country about the crop fertilization are limited, although according to Chaviano (2005) the cereal responds well to organic fertilization.

Before this work, there were no antecedents in Cuba of the utilization of rhizobia in sorghum. Nevertheless, the need to develop this crop on low fertility soils necessarily demands a correct agronomic management in nutrition, which leads to a maximum precision in the ways, sources, doses and moment of fertilizer application. The use of bacterial inoculants can be one of the best alternatives, from the economic and environmental points of view.

The rhizobium strains used in this experiment came from stressing soil and climate

fertilizantes. El empleo de inoculantes bacterianos puede ser una de las mejores alternativas, desde el punto de vista económico y medioambiental.

Las cepas de rizobio utilizadas en el presente experimento proceden de ambientes estresantes de suelo y clima de Alberta, Canadá, lo que las hace promisorias para su aplicación en ecosistemas extremos. Aunque las cepas procedentes de ecosistemas locales están adaptadas al ambiente y pueden ser más competitivas que las importadas (Bhattarai y Hess, 1993; Neves y Rumjanek, 1997), *Alberta Innovates-Technology Futures*, *Bioresource Technologies de Canadá* y el Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes de Cuba, tuvieron interés en comprobar la efectividad de estos microorganismos en diferentes zonas geográficas. De esta forma se ampliaría el rango de posibilidades para su aplicación práctica y comercial, así como del enriquecimiento de la biodiversidad, por lo que el objetivo del experimento fue medir el efecto de cepas de rizobio canadienses en variables agronómicas de sorgo, en las condiciones ambientales de Sancti Spiritus, Cuba

Materiales y Métodos

Para el experimento se utilizaron cuatro cepas de referencia, pertenecientes a diferentes géneros y especies de rizobio, y 10 cepas canadienses del género *Sinorhizobium*, que fueron aisladas de raíces de leguminosas naturalizadas (*Melilotus* y *Medicago*) en ecosistemas ganaderos de las praderas de Alberta, Canadá (tabla 1); estas se identificaron y se caracterizaron por los métodos de microbiología clásica y biología molecular (Bécquer, C.J. *et al.*, datos no publicados). Dichos ecosistemas se caracterizan por presentar un suelo loam arenoso, erosionado, y con escasas precipitaciones. Una de las cepas (CAS2) fue aislada de leguminosas adaptadas a suelos contaminados con hidrocarburos (Slaski, J., comunicación personal). Los trabajos de aislamiento e identificación se realizaron en la Unidad de Tecnologías Ambientales, Laboratorio de Microbiología del Alberta Research Council, Vegreville, Canadá.

environments in Alberta, Canada, which makes them promising for their application in extreme ecosystems. Although the strains from local ecosystems are adapted to the environment and can be more competitive than the imported ones (Bhattarai and Hess, 1993; Neves and Rumjanek, 1997), *Alberta Innovates-Technology Futures*, *Bioresource Technologies of Canada* and the *Cuban Research Institute of Pastures and Forages* were interested in testing the effectiveness of these microorganisms in different geographical zones. Thus, the range of possibilities for their practical and commercial application, as well as the enrichment of biodiversity, would be widened, for which the objective of the trial was to measure the effect of Canadian rhizobium strains on agronomic variables of sorghum, under the environmental conditions of Sancti Spiritus, Cuba.

Materials and Methods

For the trial four reference strains were used, belonging to different rhizobium genera and species and 10 Canadian strains of the genus *Sinorhizobium*, which were isolated from naturalized legume roots (*Melilotus* and *Medicago*) in livestock production ecosystems of the Alberta prairies, Canada (table 1); they were identified and characterized by the methods of classical microbiology and molecular biology (Bécquer, C.J. *et al.*, unpublished data). Such ecosystems have a loam, sandy, eroded soil and little rainfall. One of the strains (CAS2) was isolated from legumes adapted to hydrocarbon-contaminated soils (Slaski, J., personal communication). The isolation and identification works were conducted at the Unit of Environmental Technologies, Laboratory of Microbiology of the Alberta Research Council, Vegreville, Canada.

The strains grew in yeast-manitol-agar medium (Vincent, 1970) and were suspended in yeast-manitol-broth (Vincent, 1970) until achieving a cell concentration of 10^6 - 10^8 CFU/mL. The inoculation was made by immersing the seeds for 24 hours in the inoculum, at room temperature, and they were later extracted from

Tabla 1. Cepas canadienses nativas y cepas de referencia utilizadas.

Table 1. Native Canadian strains and reference strains used.

Cepa	Género y especie
Nativas	
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.

Las cepas crecieron en medio levadura-manitol-agar (Vincent, 1970) y fueron resuspendidas en caldo-levadura-manitol (Vincent, 1970) hasta lograr una concentración celular de 10^6 - 10^8 UFC/mL. La inoculación se realizó mediante la inmersión de las semillas por 24 horas en el inóculo, a temperatura ambiente, y posteriormente se extrajeron del caldo para su secado a la sombra y su siembra inmediata (Sabry *et al.*, 1997). Para el control absoluto y el control fertilizado no inoculado se utilizó solamente el medio caldo-levadura-manitol. La reinoculación de los tratamientos se efectuó 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, con un inóculo bacteriano (10 mL/planta) que contenía 10^6 - 10^8 UFC/mL, para lo que se utilizó una mochila aspersora. El surtidor de la mochila se dirigió a la base del tallo de la planta. Esta actividad se hizo en horas frescas de la mañana, para evitar la desecación excesiva del producto.

Las condiciones climáticas del período experimental se muestran en la tabla 2. La dosis de siembra fue de 12 kg/ha; se sembró a chorrillo

the broth to be dried under shade and planted immediately (Sabry *et al.*, 1997). For the absolute control and the non inoculated fertilized control only the yeast-manitol broth was used. The reinoculation of the treatments took place 18 days after planting to ensure an effective presence of the bacteria in the rhizosphere for root colonization, with a bacterial inoculum (10 mL/plant) containing 10^6 - 10^8 CFU/mL, for which a backpack sprayer was used. The backpack spray was aimed at the plant stem base. This activity was carried out in fresh morning hours, to prevent the excessive desiccation of the product.

The climatic conditions of the experimental period are shown in table 2. The planting dose was 12 kg/ha; seeding was done by spaced drilling, with a 50-cm frame between rows. Each plot measured 3 m x 15 m. Four irrigations were applied. Ninety days after planting the harvest was manually performed.

The fertilized treatment consisted in an application of 150 kg N/ha (NH_4NO_3). On the other hand, due to the poor mineral content of the experimental soil (table 3) full fertilizer was applied (NPK: 9-13-17) to all treatments,

Tabla 2. Comportamiento de las variables climáticas durante el período experimental.
Table 2. Performance of climatic variables during the experimental period.

Mes	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima absoluta (°C)	Humedad relativa media (%)	Lluvia total mes (mm)	Lluvia máxima 24 horas (mm)
Enero	20,8	31,6	74	-	-
Febrero	20,9	32,3	73	-	-
Marzo	23,8	34,4	74	29,3	12,6

espaciado, con un marco de 50 cm entre surcos. Cada parcela medía 3 m x 15 m. Se aplicaron cuatro riegos. A los 90 días de la siembra se realizó la cosecha de forma manual.

El tratamiento fertilizado consistió en una aplicación de 150 kg de N/ha (NH_4NO_3). Por otra parte, debido al pobre contenido de minerales del suelo experimental (tabla 3) se aplicó fertilizante completo (NPK: 9-13-17) a todos los tratamientos, incluyendo el control absoluto y el control fertilizado, a los 21 días de la siembra, a razón de 80 kg N/ha.

Se utilizó un diseño experimental en bloques completamente al azar (Somasegaran y Hoben, 1994), con 16 tratamientos y cuatro réplicas. Los datos se analizaron a través de un análisis de varianza (ANOVA) (StatGraphics Plus, versión 2.0, 1994-1996, Statistical Graphics Corporation). Las diferencias entre medias se hallaron mediante la prueba LSD (*Least Significant Difference*) de Fisher ($p < 0,05$) (Lerch, 1977) y se determinó el coeficiente de correlación entre las variables (Ostle, 1984). Se evaluaron las variables agronómicas: peso seco aéreo (g/parcela), longitud del tallo (cm) y longitud de la panoja (cm). Se calculó el incremento en el peso seco aéreo de los tratamientos inoculados con respecto al control absoluto (%).

Resultados y Discusión

El suelo del área experimental (tabla 3) corresponde al tipo Aluvial (Anon, 1979), es deficitario en P_2O_5 y materia orgánica, lo cual se corresponde con lo reportado por Hernández *et al.* (1999) para este tipo de suelo. Estas características agroquímicas se tuvieron en cuenta para hacer una fertilización de fondo al experimento en todos los tratamientos, donde se incluyó el

including the absolute control and the fertilized control, 21 days after seeding, at a rate of 80 kg N/ha.

An experimental design in completely randomized blocks was used (Somasegaran and Hoben, 1994), with 16 treatments and four replications. The data were analyzed through a variance analysis (ANOVA) (StatGraphics Plus, Version 2.0, 1994-1996, Statistical Graphics Corporation). The differences among means were found through the LSD (Least Significant Difference) test of Fisher ($p < 0,05$) (Lerch, 1977) and the correlation coefficient among variables was determined (Ostle, 1984). The agronomic variables aerial dry weight (g/plot), stem length (cm) and ear length (cm) were evaluated. The increase in the aerial dry weight of the inoculated treatments was calculated with regards to the absolute control (%).

Results and Discussion

The soil of the experimental area (table 3) corresponds to the Alluvial type (Anon, 1979), it has deficit of P_2O_5 and organic matter, which is in correspondence with the report by Hernández *et al.* (1999) for this soil type. These agrochemical characteristics were taken into consideration to fertilize the experiment in all treatments, where the absolute and the fertilized control were included, and thus stimulate plant growth in their first phenological stages.

This remarkable nutrient deficit in the soil coincides, in general, with some of the stressing conditions that should be faced in sorghum cultivation in Sancti Spiritus, and also propitiate higher reliability on the experimental results, because there is no evidence of a significant interference due to a high availability of

Tabla 3. Composición agroquímica básica del área experimental.

Table 3. Basic agrochemical composition of the experimental area.

Tipo de suelo	P ₂ O ₅ (mg/100 g) (Oniani)	K ₂ O (mg/100 g) (Oniani)	Materia orgánica (%) (Walkley-Black)	pH (Potenciometría)
Aluvial (Anon, 1979)	2,63	10,00	1,61	5,4

control absoluto y el control fertilizado, y así estimular el crecimiento de las plantas en sus primeros estadios fenológicos.

Este déficit marcado de nutrientes en el suelo coincide, en general, con algunas de las condiciones estresantes que se deben enfrentar en el cultivo del sorgo en Sancti Spiritus, y además propician una mayor confiabilidad en los resultados experimentales, ya que no es evidente una interferencia significativa debido a una alta disponibilidad de macroelementos, que pudiera enmascarar el efecto positivo de las cepas, sobre la base de sus propiedades como organismos promotores del crecimiento vegetal.

El peso seco aéreo (tabla 4) en los tratamientos inoculados con las cepas ATCC 10004, CAC17, CAC8 y CAS2 mostró valores estadísticamente superiores ($p < 0,05$) al control absoluto. Al mismo tiempo, dichos tratamientos presentaron superíndices comunes con el control fertilizado (959,9 g/parcela). En este sentido, Mia y Shamsuddin (2010) afirmaron que la inoculación de determinados cultivares de arroz con rizobios, incrementó el peso seco de la planta, así como la longitud del tallo, entre otras variables agronómicas.

En cuanto a la longitud del tallo (tabla 4), los tratamientos inoculados con las cepas USDA 191 (101,3 cm), 25B6 (100,5 cm) y CAS2 (101,6 cm) presentaron valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) con respecto al control absoluto (92 cm), y en el caso de USDA 191 y CAS2 resultaron estadísticamente superiores al control fertilizado (93,5 cm). Los inoculados con las cepas ATCC 10004, CAC8, CAC9, CAC14, CAC16, CAC17, CAS2, 25B6, CAC7, ATCC 10317 y CAC4, CAC2 y CAC5 no mostraron diferencias significativas con relación al control fertilizado y también compartieron superíndices comunes con el control absoluto, con excepción

macroelementos, which could mask the positive effect of the strains, based on their properties as plant growth promoting organisms.

The aerial dry weight (table 4) in the treatments inoculated with the strains ATCC 10004, CAC17, CAC8 and CAS2 showed statistically higher values ($p < 0,05$) than the absolute control. At the same time, such treatments showed common letters with the fertilized control (959,9 g/plot). In this sense, Mia and Shamsuddin (2010) stated that the inoculation of certain rice cultivars with rhizobia increased the dry weight of the plant, as well as the stem length, among other agronomic variables.

Regarding stem length (table 4), the treatments inoculated with the strains USDA 191 (101,3 cm), 25B6 (100,5 cm) and CAS2 (101,6 cm) showed statistically significant values ($p < 0,05$) as compared to the absolute control (92 cm), and in the case of USDA 191 and CAS2, they turned out to be statistically higher than the fertilized control (93,5 cm). The treatments inoculated with the strains ATCC 10004, CAC8, CAC9, CAC14, CAC16, CAC17, CAS2, 25B6, CAC7, ATCC 10317 and CAC4, CAC2 and CAC5 did not show significant differences with regards to the fertilized control and shared common letters with the absolute control, with the exception of the strain 25B6. These treatments constituted most of the ones used in the experiment, and although the effect achieved by these strains in stem elongation was not remarkable, it was proven to be positive, in general, and the strains USDA 191, 25B6 and CAS2 stood out. There are evidences about the positive effect of rhizobia on sorghum and millet growth and yield. Matiru and Dakora (2004) stated that a correct selection of the rhizobial strains and plant varieties can lead to a better effect of biofertilization.

Tabla 4. Variables agronómicas en sorgo inoculado con los rizobios.
Table 4. Agronomic variables in sorghum inoculated with the rhizobia.

Tratamiento	Peso seco aéreo (g/parcela)	Longitud del tallo (cm)	Longitud de la panoja (cm)	Incremento del peso seco aéreo de los tratamientos inoculados con respecto al control absoluto (%)
CAC2	980,00 ^{abc}	96,6 ^{abc}	25,2 ^{abcd}	217,80
CAC5	720,00 ^{bc}	93,4 ^{bc}	23,5 ^{bcd}	160,00
CAC8	1081,30 ^{ab}	96,9 ^{abc}	27,7 ^a	240,29
CAC9	900,00 ^{abc}	98,4 ^{abc}	27,3 ^{ab}	200,00
CAC14	752,10 ^{cd}	94,8 ^{abc}	22,3 ^{cd}	167,13
CAC16	849,70 ^{abc}	95,9 ^{abc}	24,3 ^{abcd}	188,82
CAC17	1110,10 ^a	99,3 ^{abc}	25,5 ^{abcd}	246,69
CAS2	1119,80 ^a	101,6 ^a	23,0 ^{cd}	248,84
CAC4	711,00 ^{cd}	95,7 ^{abc}	24,7 ^{abcd}	158,00
CAC7	932,10 ^{abc}	99,5 ^{abc}	24,9 ^{abcd}	207,13
USDA 191	839,50 ^{abc}	101,3 ^a	27,7 ^a	186,56
ATCC 10004	1089,60 ^a	98,6 ^{abc}	25,7 ^{abc}	242,13
25B6	760,00 ^{bcd}	100,5 ^{ab}	24,7 ^{abcd}	168,89
ATCC 10317	850,00 ^{abc}	98,0 ^{abc}	24,7 ^{abcd}	188,89
Control absoluto	450,00 ^c	92,0 ^c	21,5 ^d	
Control fertilizado	959,90 ^{abc}	93,5 ^{bc}	24,5 ^{abcd}	
95% conf. LSD	EE: 111,19	EE: 2,79	EE: 1,41	

^{abcd} Medias con letras diferentes dentro de cada fila difieren entre sí a $p < 0,05$

de la cepa 25B6. Estos tratamientos constituyeron la mayoría de los utilizados en el experimento, y a pesar que el efecto logrado por estas cepas en la elongación del tallo no fue notorio, se comprobó que fue positivo, en general, y sobresalieron las cepas USDA 191, 25B6 y CAS2. Existen evidencias acerca del efecto positivo de los rizobios en el crecimiento y el rendimiento del sorgo y el millo. Matiru y Dakora (2004) plantearon que una correcta selección de las cepas rizobianas y de las variedades vegetales, puede conllevar un mejor efecto de la biofertilización.

Los tratamientos inoculados con las cepas CAC8, CAC9, USDA 191 y ATCC 10004 presentaron valores estadísticamente superiores ($p < 0,05$) al control absoluto en la longitud de la panoja (tabla 4). Por otra parte, los inoculados con las cepas CAC2, CAC5, CAC14, ATCC 10004, CAC16, CAC17, CAS2, 25B6, CAC7, ATCC 10317 y CAC4, además de las mencionadas anteriormente, mostraron valores con superíndices iguales a los del control fertilizado.

The treatments inoculated with the strains CAC8, CAC9, USDA 191 and ATCC 10004 showed statistically higher values ($p < 0,05$) than the absolute control in ear length (table 4). On the other hand, the ones inoculated with the strains CAC2, CAC5, CAC14, ATCC 10004, CAC16, CAC17, CAS2, 25B6, CAC7, ATCC 10317 and CAC4, in addition to the above-mentioned, showed values with equal letters as the fertilized control. The positive influence of the inoculated strains on the first treatments is obvious. This coincides with the reports by different authors, such as Saubidet *et al.* (2001) regarding the fact that hormone production by rhizobacteria favors a higher nutrient extraction in the soil, which is shown in the different agronomic variables of the plant. Likewise, if the agrochemical characteristics of the experimental area (table 3) are taken into consideration, which showed the low phosphorus and organic matter availability, it could be inferred that the higher influence of these bacteria could have occurred in the solubilization of phosphates,

Es obvia la influencia positiva de las cepas inoculadas en los primeros tratamientos. Esto coincide con lo expresado por diferentes autores, como Saubidet *et al.* (2002), acerca de que la producción de hormonas por las rizobacterias favorece una mayor extracción de nutrientes en el suelo, lo que se manifiesta en las diferentes variables agronómicas de la planta. Así mismo, si se tiene en cuenta las características agroquímicas del área experimental (tabla 3), donde se evidenció la baja disponibilidad de fósforo y de materia orgánica, se podría inferir que la mayor influencia de estas bacterias pudo haber ocurrido en la solubilización de los fosfatos, propiedad que según Richardson (2001), es la forma de acción más común implicada en la promoción del crecimiento vegetal por las rizobacterias, que incrementa el aprovechamiento de los nutrientes por la planta hospedera.

Se debe señalar que el tratamiento inoculado con la cepa CAS2, que no difirió del control fertilizado en las variables peso seco aéreo y longitud del tallo (tabla 4), procedía de nódulos radiculares de plantas de *Medicago sativa* que crecieron en suelos contaminados con hidrocarburos (Slaski, J. comunicación personal), lo cual pudiera indicar, además de su capacidad de supervivencia en ambientes extremos, su alta capacidad de producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal. Esta característica convierte a dicha cepa en promisorias, para su utilización en ecosistemas que se encuentren bajo factores físico-químicos estresantes.

El incremento en el peso seco aéreo de los tratamientos inoculados, con respecto al control absoluto, se muestra en la tabla 4. Todos los tratamientos presentaron valores que superaron al control absoluto, pero sobresalieron (con 100% o más de incremento) los inoculados con las cepas nativas: CAC2, CAC8, CAC9, CAC17, CAS2 y CAC7; mientras que sólo el tratamiento inoculado con la cepa comercial ATCC 10004 sobrepasó este valor; ello expresa un efecto superior de las cepas nativas sobre esta variable agronómica de la planta.

Al relacionar la longitud de la panoja con la longitud del tallo en los tratamientos inoculados

property which, according to Richardson (2001), is the most common form of action implied in plant growth promotion by rhizobacteria, which increases the utilization of nutrients by the host plant.

It must be stated that the treatment inoculated with the strain CAS2, which did not differ from the fertilized control in the variables aerial dry weight and stem length (table 4), was from root nodules of *Medicago sativa* plants that grew on hydrocarbon-contaminated soils (Slaski, J. personal communication), which could indicate, in addition to its survival capacity in extreme environments, its high ability to produce plant growth promoting substances. This characteristic turns such strain into promising, for its use in ecosystems which are under stressing physical-chemical factors.

The increase in the aerial dry weight of the inoculated treatments, as compared to the absolute control, is shown in table 4. All the treatments showed values that exceeded the absolute control, but the ones inoculated with the native strains CAC2, CAC8, CAC9, CAC17, CAS2 and CAC7 stood out (with 100% increase or more); while only the treatment inoculated with the commercial strain ATCC 10004 surpassed this value; it expresses a higher effect of the native strains on this agronomic variable of the plant.

When relating ear length to stem length in the treatments inoculated with the native strains and in the ones inoculated with the reference strains, correlation coefficients of 0,19 were found for the ear length-native strains, which indicates that the variable stem length was not directly interrelated to the former, perhaps due to the intervention of external factors, such as the edaphoclimatic conditions, or internal factors, such as the insufficient production of certain hormones for these strains. However, for this variable, but in the treatments inoculated with the reference strains, a correlation coefficient of 0,62 was observed, which indicated a moderately strong interrelation of stem length to ear length in such treatments.

The aerial dry weight as compared to stem length, in the treatments inoculated with the native

con las cepas nativas y en los inoculados con las cepas de referencia, se hallaron coeficientes de correlación de 0,19 para la longitud de la panoja-cepas nativas, lo cual indica que la variable longitud del tallo no se interrelacionó directamente con la primera, debido quizás a la intervención de factores de carácter externo, como las condiciones edafoclimáticas, o de carácter interno, como la producción insuficiente de determinadas hormonas por estas cepas. Sin embargo, para esa misma variable, pero en los tratamientos inoculados con las cepas de referencia, se observó un coeficiente de correlación de 0,62, lo cual indicó una interrelación moderadamente fuerte de la longitud del tallo con la longitud de la panoja en dichos tratamientos.

Se observó que el peso seco aéreo con respecto a la longitud del tallo, en los tratamientos inoculados con las cepas nativas, presentó un coeficiente de correlación de 0,79 ($p < 0,01$), lo que mostró una fuerte interrelación de la longitud del tallo con el peso seco aéreo; mientras que en los tratamientos inoculados con las cepas de referencia el coeficiente de correlación fue de -0,51 ($p < 0,01$), por lo que se halló una interrelación negativa entre estas dos variables. Por lo contrario, las variables longitud de la panoja y longitud del tallo, en los tratamientos inoculados con las cepas nativas, presentaron una correlación débil ($r = 0,19$); mientras que para los tratamientos inoculados con las cepas de referencia, la correlación fue moderadamente fuerte ($r = 0,62$).

Los resultados referidos a la longitud de la panoja con respecto a la longitud del tallo, al igual que los del peso seco aéreo con relación a la longitud del tallo, parecen guardar estrecha relación con la secreción específica de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal por los rizobios de diferentes géneros y especies. Este mecanismo propio de la interacción rizobacteria-planta y el efecto en las diferentes partes vegetales, no se ha determinado exactamente (Saubidet *et al.*, 2002), aunque según Sahin *et al.* (2004), algunos autores tienen evidencias al respecto. Por otra parte, Vessey (2003) aseguró que el ácido indol acético producido por las rizobacterias, puede provocar iniciación radicular

strains, was observed to show a correlation coefficient of 0,79 ($p < 0,01$), which showed a strong interrelation of stem length with aerial dry weight; while in the treatments inoculated with the reference strains the correlation coefficient was -0,51 ($p < 0,01$), for which a negative interrelation was found between these two variables. On the contrary, the variables ear length and stem length, in the treatments inoculated with the native strains, showed a weak correlation ($r = 0,19$), while for the treatments inoculated with the reference strains, the correlation was moderately strong ($r = 0,62$).

The results referred to ear length with regards to stem length, like those of aerial dry weight as compared to stem length, seem to have a close relation to the specific secretion of plant growth stimulating substances by the rhizobia of different genera and species. This mechanism of the rhizobacteria-plant interaction and its effect on the different plant parts has not been exactly determined (Saubidet *et al.*, 2002), although according to Sahin *et al.* (2004), some authors have evidence in this regard. On the other hand, Vessey (2003) stated that the indoleacetic acid produced by rhizobacteria can cause root initiation and cell elongation; the production of cytokinins can favor cell division and tissue expansion, as well as gibberellins influence stem elongation. The authors of this work do not know the exact way in which these substances could have influenced the above-mentioned results, but evidently these processes must depend, in one way or the other, on the type and quantity of metabolites segregated by the different rhizobium genera and species which are used in biofertilization. Further research is recommended in this field of study.

In general, the capacity of the studied strains to positively influence growth and other agronomic variables of the plants was proven. In case the effect of these strains on grain production as feedstuff or seed source is to be tested, other evaluations aimed at determining the valuables in that variable type are recommended.

--End of the English version--

y elongación celular; la producción de citoquininas puede favorecer la división celular y la expansión de los tejidos, así como las giberelinas influyen en la elongación del tallo. De la forma exacta en que estas sustancias pudieron haber influido en los resultados expuestos es desconocida para los autores de este trabajo, pero evidentemente estos procesos deben depender, de una u otra forma, del tipo y la cantidad de metabolitos segregados por los diferentes géneros y especies de rizobios que se usan en la biofertilización. Se impone una profundización adecuada en este campo de estudio.

Se demostró, en general, la capacidad de las cepas estudiadas de influir positivamente en el crecimiento y en otras variables agronómicas de las plantas. En el caso que se desee comprobar el efecto de estas cepas en la producción de granos como alimento o fuente de semillas, se recomiendan otras evaluaciones dirigidas a determinar los valores en ese tipo de variable.

Referencias bibliográficas

- Anon. 1979. Clasificación genética de los suelos de Cuba. Academia de Ciencias de Cuba. Instituto de Suelos. La Habana, Cuba
- Antoun, H. *et al.* 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Rhaphanus sativus* L.). *Plant and Soil*. 204:57
- Bhattacharai, T. & Hess, D. 1993. Yield responses of Nepalese spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. *Plant and Soil*. 151:67
- Chabot, R. *et al.* 1996. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2767
- Chaviano, Mariela. 2005. El sorgo: contribución al desarrollo sostenible y ecológico de la producción popular de arroz. *Agricultura Orgánica*. 1:8
- Chi, F. *et al.* 2005. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl Environ Microbiol.* 71:7271
- Hafeez, F.Y. *et al.* 2004. Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. *Aust. J. of Exp. Agric.* 44 (6):617
- Hernández, A. *et al.* 1999. Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. La Habana, Cuba. 23 p.
- Kalia, Anu & Gupta, R.P. 2002. Nodule induction in non-legumes by rhizobia. *Indian Journal of Microbiology*. 42:183
- Lerch, G. 1977. La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 452 p.
- Matiru, Vivienne & Dakora, F. 2004. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African J. Biotechnol.* 3:1
- Mia, M.A.B. & Shamsuddin, Z.H. 2010. *Rhizobium* as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production. *African J. Biotechnol.* 37:6001
- Nápoles, J.A. 2006. Estudio de alternativas de fertilización orgánica y biológica en *Sorghum bicolor* L. Moench. Tesis en opción al grado de Maestro en Ciencias Agrícolas. Universidad Agrícola de Ciego de Ávila, Cuba. 66 p.
- Neves, Ma. Cristina & Rumjanek, Norma. 1997. Diversity and adaptability of Soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. *Soil Biol. Biochem.* 29 (5/6):889
- Ostle, B. 1984. Estadística aplicada. Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 629 p.
- Prévost, D. *et al.* 2000. Growth and mineral nutrition of corn inoculated with effective strains of *Bradyrhizobium japonicum*. Proceedings of the 5th International PGPR Workshop. Villa Carlos Paz. Córdoba, Argentina. 7 p.
- Richardson, A.E. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 28:897
- Sabry, S.R.S. *et al.* 1997. Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 264:341
- Sahin, F. *et al.* 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and Soil*. 265:123
- Saubidet, M.I. *et al.* 2002. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. *Plant and Soil*. 245:215
- Somasegaran, P. & Hoben, H.J. 1994. Handbook for rhizobia. Springer-Verlag, New York. 450 p.
- Vessey, K.J. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255:571
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biological Program Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications. Oxford, England. 164 p.

Recibido el 31 de mayo del 2011

Aceptado el 8 de julio del 2011