

Comportamiento de la simbiosis leguminosa-rizobio en *Centrosema plumieri* inoculada con *Bradyrhizobium* sp. Ensayo de campo

Performance of the legume-rhizobium symbiosis in *Centrosema plumieri* inoculated with *Bradyrhizobium* sp. Field essay

C. J. Bécquer, J. A. Nápoles, Orquidia Álvarez, Yamilka Ramos y L. A. Palmero
*Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, Estación Experimental Sancti Spíritus,
Apdo 2255, Sancti Spíritus, Cuba
E-mail: pastosp@yayabo.inf.cu*

Resumen

Se efectuó un experimento de campo, sin riego, en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spíritus, Cuba, durante el periodo de noviembre de 2001 a abril de 2002. El objetivo fue evaluar el comportamiento simbiótico de *Centrosema plumieri*, inoculada con cepas de *Bradyrhizobium* sp., previamente aisladas de leguminosas forrajeras procedentes de ecosistemas ganaderos de Cuba. El diseño experimental fue de bloques al azar; se utilizaron 11 tratamientos inoculados con cepas nativas, un testigo inoculado con la cepa de referencia 5030 (*Bradyrhizobium* sp.) y un control no inoculado, con tres réplicas. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), así como de correlación y regresión. Los valores de los tratamientos inoculados fueron estadísticamente iguales a los del control absoluto, en cuanto al peso seco aéreo (PSA) y el rendimiento de N (RN), excepto el inoculado con la cepa HA2 en RN. En general, se demostró una débil efectividad de la inoculación. No obstante, en el índice de nodulación (IN) sobresalieron JH2 y HA2, con valores estadísticamente superiores ($p < 0,05$) al resto. El grado de dependencia del RN y el PSA fue débil en los tratamientos inoculados con respecto al IN, aunque fuerte en el RN en relación con el PSA. Se concluye que las cepas nativas inoculadas en *C. plumieri*, con excepción de HA2 en el RN, así como JH2 y HA3 en el IN, no ejercieron un efecto altamente positivo en la planta. Estos resultados deben valorarse para la continuación de estudios relacionados con la simbiosis leguminosa-rizobio.

Palabras clave: *Bradyrhizobium* sp., *Centrosema plumieri*, inoculación

Abstract

A field trial, without irrigation, was conducted at the Sancti Spiritus Experimental Station of Pastures and Forages, Cuba, from November, 2001, to April, 2002. The objective was to evaluate the symbiotic performance of *Centrosema plumieri*, inoculated with *Bradyrhizobium* sp. strains, previously isolated from forage legumes of Cuban livestock production ecosystems. The experimental design consisted in randomized blocks; 11 treatments inoculated with native strains, a control inoculated with the reference strain 5030 (*Bradyrhizobium* sp.) and a non-inoculated control were used, with three replications. A variance analysis (ANOVA), as well as correlation and regression analyses, were applied. The values of the inoculated treatments were statistically equal to those of the absolute control, regarding aerial dry weight (ADW) and N yield (NY), except the one inoculated with the strain HA2 in NY. In general, a weak activity of inoculation was shown. Nevertheless, in the nodulation rate (NR) JH2 and HA2 stood out, with values statistically higher ($p < 0,05$) than the others. The degree of dependence of NY and ADW was weak in the inoculated treatments with regards to NR, although it was strong in NY with regards to ADW. It is concluded that the native strains inoculated in *C. plumieri*, with the exception of HA2 in NY, as well as JH2 and HA3 in NR, did not exert a highly positive effect on this plant. These results should be evaluated for the continuation of studies related to the legume-rhizobium symbiosis.

Key words: *Bradyrhizobium* sp., *Centrosema plumieri*, inoculation

Introducción

La simbiosis leguminosa-rizobio –relación recíproca entre las plantas y la bacteria– fue reconocida por primera vez hace más de 100 años, y su valor agrícola se ha demostrado a través de las investigaciones científicas realizadas en el mundo entero.

La importancia de la fijación biológica del nitrógeno para la seguridad de los alimentos en el mundo es realmente incuestionable, y el uso de cultivos capaces de efectuar una fijación simbiótica del N es el componente primario en una agricultura sostenible (Vance *et al.*, 2000).

Por otra parte, en Cuba existen trabajos que describen la eficiencia simbiótica de cepas nativas cubanas en leguminosas tropicales (Tang *et al.*, 1994; Tang, 1996; López *et al.*, 2002).

La provincia Sancti Spíritus se caracteriza por una amplia gama de géneros y especies de leguminosas nativas o naturalizadas, diseminadas en cuatro zonas edafoclimáticas (Hernández, 1989), y se pueden localizar en ecosistemas con características ambientales estresantes (acidez, alcalinidad o altas temperaturas, entre otras) tanto para las plantas como para los microorganismos.

Centrosema es un género neotropical que contiene especies muy importantes desde el punto de vista pratero y forrajero. Es nativo del sur de América tropical, abunda en los trópicos (Skerman *et al.*, 1991) y se afirma que puede fijar hasta 280 kg de N/ha/año en asociación con gramíneas (Sylvester-Bradley *et al.*, 1983). Es moderadamente específico en la nodulación, y el suelo puede carecer de cepas que lo infecten efectivamente, por lo que se recomienda su inoculación. En estudios realizados por Hernández *et al.* (1999), en leguminosas nativas o naturalizadas de la provincia Sancti Spíritus, se encontró que *Centrosema* fue uno de los géneros más adaptados a las condiciones edafoclimáticas de la provincia. Olivera *et al.* (2008) también hallaron este género ampliamente diseminado en tres provincias de Cuba. Dichos estudios posibilitan un trabajo más profundo sobre la utilización, en esas condiciones, de las especies naturales; se consideran como tales aquellas plantas que son originarias de un país

Introduction

The legume-rhizobium symbiosis –reciprocal relation between the plants and the bacterium– was first acknowledged more than 100 years ago, and its agricultural value has been proven by the scientific studies conducted throughout the world.

The importance of the biological nitrogen fixation for food security worldwide is really non-debatable, and the use of crops capable of doing a symbiotic N fixation is the primary component in sustainable agriculture (Vance *et al.*, 2000).

On the other hand, in Cuba there are works describing the symbiotic efficiency of Cuban native strains in tropical legumes (Tang *et al.*, 1994; Tang, 1996; López *et al.*, 2002).

The Sancti Spiritus province has a wide range of genera and species of native or naturalized legumes, disseminated in four edaphoclimatic zones (Hernández, 1989), and can be located in ecosystems with stressing environmental characteristics (acidity, alkalinity or high temperatures, among others) for the plants as well as the microorganisms.

Centrosema is a neotropical genus, which contains very important pasture and forage species. It is native from southern tropical America, abundant in the tropics (Skerman *et al.*, 1991) and it is said to be able to fix up to 280 kg N/ha/year in association with grasses (Sylvester-Bradley *et al.*, 1983). It is moderately specific in nodulation, and the soil can lack strains to infect it effectively, for which its inoculation is recommended. In studies conducted by Hernández *et al.* (1999), in native or naturalized legumes from the Sancti Spiritus province, *Centrosema* was found to be one of the most adapted genera to the edaphoclimatic conditions of the province. Olivera *et al.* (2008) also found this genus to be widely disseminated in three Cuban provinces. Such studies allow further work on the use, under those conditions, of natural species; the plants which have originated in a certain country, or have been introduced several years ago, and are completely adapted to the environment, are considered natural (Funes, 2007).

determinado, o introducidas desde hace varios años, y que se encuentran adaptadas totalmente al ambiente (Funes, 2007).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el comportamiento simbiótico de *Centrosema plumieri*, inoculada con cepas de *Bradyrhizobium* sp. en condiciones de campo, en Sancti Spiritus, Cuba.

Materiales y Métodos

El experimento se realizó en áreas de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spiritus, Cuba (21° 53' 00" latitud Norte, 79° 21' 25" longitud Oeste, y a 40 msnm) y tuvo una duración de seis meses (noviembre de 2001-abril de 2002).

El suelo del área experimental corresponde al tipo Pardo con Carbonatos típico (Anon, 1979), deficitario en P₂O₅ y K₂O, y con niveles medios de materia orgánica (tabla 1), lo cual es característico de este tipo de suelo (Hernández, A. *et al.*, 1999).

No se aplicó riego –a pesar de que en el periodo evaluativo predominó la escasa precipitación–, excepto en el mes de noviembre, fecha de siembra del experimento (tabla 2), lo cual propició la adecuada germinación de la semilla.

The objective of this work was to evaluate the symbiotic performance of *Centrosema plumieri*, inoculated with *Bradyrhizobium* sp. strains under field conditions, in Sancti Spiritus, Cuba.

Materials and Methods

The trial was conducted in areas of the Sancti Spiritus Experimental Station of Pastures and Forages, Cuba (21° 53' 00" latitude north, 79° 21' 25" longitude west, and at 40 masl) and lasted for six months (November, 2001-April, 2002).

The soil of the experimental area is typical Brown with Carbonates (Anon, 1979), with deficit of P₂O₅ and K₂O, and moderate organic matter levels (table 1), which is characteristic of this soil type (Hernández, A. *et al.*, 1999).

No irrigation was applied –although in the evaluative period there was scarce rainfall–, except in November, planting date of the experiment (table 2), which propitiated the adequate seed germination (this datum is not shown).

The seeds were from the Sancti Spiritus Experimental Station of Pastures and Forages. They were scarified in water at 90°C, during three minutes, before planting.

Tabla 1. Composición agroquímica básica del suelo experimental.

Table 1. Basic agrochemical composition of the experimental soil.

Tipo de suelo	P ₂ O ₅ (mg/100 g) (Oniani)	K ₂ O (mg/100 g) (Oniani)	Materia orgánica (%) (Walkley-Back)	pH (Potenciometría)
Pardo con Carbonatos típico	10,52	15,00	2,90	5,7

Tabla 2. Comportamiento de las variables climáticas durante el periodo experimental.

Table 2. Performance of climate variables during the experimental period.

Mes	Temperatura media (°C)	Temperatura máxima absoluta (°C)	Humedad relativa media (%)	Lluvia total mes (mm)	Lluvia máxima en 24 horas (mm)
Nov. 2001	22,0	29,5	82	100,0	75,9
Dic. 2001	22,8	30,4	82	34,8	21,1
Enero 2002	22,1	30,2	78	45,7	27,9
Febrero 2002	22,7	31,4	74	9,6	3,7
Marzo 2002	23,9	32,7	73	77,5	35,8
Abril 2002	24,8	33,9	68	24,6	23,2

Las semillas procedían de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spiritus. Se escarificaron en agua a 90°C, durante tres minutos, previamente a la siembra.

Las cepas nativas utilizadas en el experimento pertenecen a *Bradyrhizobium* sp. y fueron aisladas de *C. plumieri* y *Centrosema virginianum*, leguminosas procedentes de la zona centro de Sancti Spiritus, las que fueron caracterizadas taxonómicamente y evaluadas agrónomicamente en condiciones de invernadero (Bécquer, 2002). Se utilizó también la cepa de referencia 5030 (*Bradyrhizobium* sp.), donada por el Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes de Cuba (tabla 3).

Tabla 3. Cepas nativas.
Table 3. Native strains.

Cepas nativas	Género y especie
JH1	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
HA2	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
JH3	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
SP7	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
JH2	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
HA3	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
SP10	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
JH1	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
JK2	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
JK4	<i>Bradyrhizobium</i> sp.
JK3	<i>Bradyrhizobium</i> sp.

Las cepas se conservaron en cuñas agarizadas de medio sólido levadura-manitol, a 4°C (Vincent, 1970). Los inóculos se prepararon mediante el crecimiento de las cepas en erlenmeyers de 250 mL, que contenían 100 mL de medio líquido levadura-manitol, y estas fueron incubadas a 29-30°C, de cinco a ocho días, en un agitador rotatorio (160 rpm) hasta alcanzar una UFC de 10^6 - 10^8 cel/mL. Se confeccionaron los inóculos correspondientes en sustrato sólido (turba) y se inocularon las semillas de forma convencional, según la metodología de Somasegaran y Hoben (1994).

El tamaño de las parcelas fue de 3 m x 15 m. Se utilizó una dosis de siembra de 15 kg/ha y se sembró a chorrillo espaciado, con una distancia

The native strains used in the trial belong to *Bradyrhizobium* sp. and were isolated from *C. plumieri* and *Centrosema virginianum*, legumes from the central zone of Sancti Spiritus, which were taxonomically characterized and agronomically evaluated under greenhouse conditions (Bécquer, 2002). The reference strain 5030 (*Bradyrhizobium* sp.), donated by the Cuban Pasture and Forage Research Institute (table 3), was also used.

The strains were preserved in agarized containers with yeast-mannitol solid medium, at 4°C (Vincent, 1970). The inoculants were prepared by growing the strains in 259-mL Erlenmeyer flasks, which contained 100 mL of yeast-mannitol liquid medium, and they were incubated at 29-30°C, from five to eight days, in a rotary shaker (160 rpm) until reaching a CFU of 10^6 - 10^8 cells/mL. The corresponding inoculants were elaborated in solid substratum (peat) and the seeds were inoculated in the conventional way, according to the methodology proposed by Somasegaran and Hoben (1994).

The plot size was 3 m x 15 m. A planting dose of 15 kg/ha was used and seeding was done by spaced drilling, with a distance between rows of 0,75 m. The dry weight was determined with a framework of 1 m², in four samples within the plot.

The measurements were carried out in the second cutting, during the flowering stage and beginning of pod emergence, to guarantee the highest agronomic expression of the crop after establishment.

The experimental design was completely randomized blocks. Thirteen treatments were used: 11 of them inoculated with strains isolated from *Centrosema* spp., an inoculated control (with the reference strain 5030) and an absolute control (neither inoculated nor fertilized treatment), with four replications. A variance analysis (ANOVA) was applied for inoculation trials. The evaluated variables were: aerial dry weight, ADW (g/plot), nodulation rate (NR) and nitrogen yield, NY (mg/plot). The inoculation effectiveness rate, IER (Davies *et al.*, 2005), was calculated from the ADW value, for which the following formula was used:

entre surcos de 0,75 m. El peso seco se determinó con un marco de 1 m², en cuatro muestras dentro de la parcela.

Las mediciones se realizaron en el segundo corte, durante la fase de floración e inicio de la aparición de las vainas, para garantizar la máxima expresión agronómica del cultivo después del establecimiento.

El diseño experimental fue de bloques completamente aleatorizados. Se utilizaron 13 tratamientos: 11 de ellos inoculados con cepas aisladas de *Centrosema* spp., un testigo inoculado con la cepa de referencia 5030 y un control absoluto (tratamiento no inoculado ni fertilizado), con cuatro réplicas. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para experimentos de inoculación. Las variables evaluadas fueron: peso seco aéreo, PSA (g/parcela), índice de nodulación (IN) y rendimiento de nitrógeno, RN (mg/parcela). Se calculó el índice de efectividad de la inoculación, IEI (Davies *et al.*, 2005), a partir del valor del PSA, para lo cual se utilizó la fórmula:

IEI: [(tratamiento inoculado – control no inoculado) / control no inoculado] x 100

Se consideró un único factor (cepas) y su efecto sobre la leguminosa en comparación con el control no inoculado, sin la utilización del control fertilizado (Danielle Prévost, comunicación personal). Las diferencias entre medias se determinaron por la décima de comparación de Duncan (1955). Se utilizó el paquete estadístico SPSS 8.0 para Windows. Para determinar el carácter de dependencia de la variable RN con respecto a IN, así como de RN con IN y de PSA con RN, se usó un coeficiente de regresión lineal simple (Ostle, 1984).

El IN se calculó de acuerdo con los parámetros que se muestran en la tabla 4 (Danielle Prévost, comunicación personal) y los datos fueron transformados por \sqrt{x} (Ostle, 1984).

El nitrógeno total se calculó a partir de su digestión en ácido sulfúrico y la aplicación del método microanalítico de Kjeldahl. Con esos datos se calculó el rendimiento de nitrógeno (RN), mediante la multiplicación del porcentaje de N por el PSA de la planta.

IER: [(inoculated treatment – non inoculated treatment) / non inoculated treatment] x 100

An only factor (strains) was considered and its effect on the legume as compared to the non-inoculated control, without using the fertilized control (Danielle Prévost, personal communication). The differences among means were determined by Duncan's comparison test (1955). The statistical pack SPSS 8.0 for Windows was used. To determine the dependence character of the variable NY with regards to NR, as well as NY with NR and ADW with NY, a simple linear regression coefficient was used (Ostle, 1984).

The NR was calculated according to the parameters that are shown in table 4 (Danielle Prévost, personal communication) and the data were transformed by \sqrt{x} (Ostle, 1984).

The total nitrogen was calculated from its digestion in sulfuric acid and the application of the Kjeldahl microanalytical method. With those data the nitrogen yield (NY) was calculated, through the multiplication of the N percentage by the plant ADW.

Results and Discussion

The remarkable nutrient deficit propitiated higher reliability of the experimental results, because a significant interference was not to be expected due to the high availability of macroelements which could mask the positive effect of the strains, based on their properties as atmospheric nitrogen fixing organisms.

In the variable ADW (table 5) no effective response of the inoculation on the plant was observed. None of the values of the inoculated treatments was statistically higher ($p < 0,05$) than the non-inoculated control (259,73 g/plot). The one inoculated with the native strain JK4 (181,30 g/plot) was statistically lower with regards to the non-inoculated control. There were no differences between the treatments inoculated with the native strains and the one inoculated with the commercial strain 5030 (243,53 g/plot). Similar results were found by Date (1991) when inoculating *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro with previously selected *Bradyrhizobium*

Tabla 4. Parámetros utilizados para la determinación del índice de nodulación.

Table 4. Parameters used for the determination of the nodulation value.

Características del nódulo	Valor
Grosor (A)	
Grande	3
Mediano	2
Pequeño	1
Color (B)	
Rojo	3
Rosado	2
Blanco	1
Cantidad (C)	
Mucha	3
Poca	2
Ninguna	0

$$\text{Índice de nodulación} = A \times B \times C \leq 27$$

Resultados y Discusión

El marcado déficit de nutrientes en el suelo propició una mayor confiabilidad de los resultados experimentales, ya que no era de esperar una interferencia significativa por alta disponibilidad de macroelementos que pudiera enmascarar el efecto positivo de las cepas, sobre la base de sus propiedades como organismos fijadores del nitrógeno atmosférico.

En la variable PSA (tabla 5) no se observó una respuesta efectiva de la inoculación en la planta. Ninguno de los valores de los tratamientos inoculados superó estadísticamente ($p < 0,05$) el control no inoculado (259,73 g/parcela). El inoculado con la cepa nativa JK4 (181,30 g/parcela) fue estadísticamente inferior con respecto al control no inoculado. No hubo diferencias entre los tratamientos inoculados con las cepas nativas y el inoculado con la cepa comercial 5030 (243,53 g/parcela). Similares resultados encontró Date (1991) al inocular *Macropodium atropurpureum* cv Siratro con cepas de *Bradyrhizobium* spp., seleccionadas previamente. Relacionado con esta variable, los índices de efectividad simbiótica (tabla 5) tuvieron valores muy bajos; el tratamiento inoculado con la cepa SP7 mostró el mayor valor (19,15%), y J11, el menor (4,58%); así mismo,

spp. strains. Related to this variable, the symbiotic effectiveness rates (table 5) had very low values; the treatment inoculated with the strain SP7 showed the highest value (19,15%), and J11, the lowest (4,58%); likewise, there were treatments with negative values (JH1, JH3, SP10, JK2, JK4, JK3, 5030). This formula corroborated the weak symbiotic effectiveness of the inoculated strains as compared to the non-inoculated control, previously explained in the ADW values.

On the other hand, in the variable NY (table 5) only the treatment inoculated with the native strain HA2 (505,90 mg/plot) was statistically higher than the non-inoculated control (360 mg/plot), as well as those inoculated with the native strains SP10 (376,13 mg/plot), JK2 (283,90 mg/plot) and JK4 (307,07 mg/plot). As in the variable ADW, from these results it could be inferred that the natural population of rhizobia in the rhizosphere of the non-inoculated control exerted a higher effect on the plant regarding the atmospheric dinitrogen fixation, although this did not imply, necessarily, a higher root infection capacity in such strains. The possibility is not discarded either of the plant having utilized more efficiently the mineral N in the non-inoculated control due to the absence of effective autochthonous rhizobia; as it was observed in the variable NR, such control showed the worst root infection values.

In this sense, Collins *et al.* (2009) and Arresé-Igor *et al.* (2009) stated that climate stress after planting affects the process of biological nitrogen fixation, with the inactivation of nitrogenase as first response to the increasing water deficit and, thus, the nodular activity is affected before photosynthesis. As it is shown in table 2, in the months after the legume planting there was a noticeable depression of rainfall in the experimental area (December: 34,8 mm; January: 45,7 mm); thus, it is not discarded that this was the reason for which the inoculated strains could not express their highest atmospheric dinitrogen fixation potential. On the other hand, according to Nápoles *et al.* (2008), symbiotic efficiency can be based not only on edaphoclimatic factors, but also on nodulation (Nod) factors, which may differ among strains.

Tabla 5. Comportamiento de las variables estudiadas en *C. plumieri*, inoculada con cepas de *Bradyrhizobium* sp.Table 5. Performance of the studied variables in *C. plumieri*, inoculated with *Bradyrhizobium* sp. strains.

Tratamiento	PSA (g/parcela)	Índice de efectividad simbiótica (%)	RN (mg/parcela)	IN (datos transformados por \sqrt{x})
JH1	227,27 ^c	(-)	467,77 ^{ab}	3,31 ^c (11)
HA2	279,63 ^{ab}	7,66	505,90 ^a	2,83 ^{bc} (8)
JH3	243,13 ^{abc}	(-)	438,07 ^{ab}	3,31 ^c (11)
SP7	309,47 ^a	19,15	425,23 ^{abc}	3,46 ^{bc} (12)
JH2	279,47 ^{ab}	7,60	391,30 ^{abcd}	4,24 ^a (18)
HA3	261,50 ^{ab}	0,68	471,70 ^{ab}	4,24 ^a (18)
SP10	240,67 ^{abc}	(-)	376,13 ^{bcd}	3,46 ^{bc} (12)
J11	271,63 ^{ab}	4,58	387,37 ^{abcd}	2,83 ^{bc} (8)
JK2	209,83 ^{bc}	(-)	283,90 ^d	2,83 ^{bc} (8)
JK4	181,30 ^c	(-)	307,07 ^{cd}	3,74 ^b (14)
JK3	224,87 ^{bc}	(-)	400,10 ^{abcd}	2,45 ^d (6)
5030	243,53 ^{abc}	(-)	399,37 ^{abcd}	3,46 ^{bc} (12)
Control no inoculado	259,73 ^{ab}	-	360,40 ^{bcd}	2,00 ^e (4)
95% conf., Duncan (1955)	EE:±7,32	-	EE:±79,58	EE:±0,11

hubo tratamientos con valores negativos (JH1, JH3, SP10, JK2, JK4, JK3, 5030). Esta fórmula corroboró la débil efectividad simbiótica de las cepas inoculadas con respecto al control no inoculado, explicada anteriormente en los valores del PSA.

Por otra parte, en la variable RN (tabla 5) solo el tratamiento inoculado con la cepa nativa HA2 (505,90 mg/parcela) resultó estadísticamente superior al control no inoculado (360 mg/parcela), así como a los inoculados con las cepas nativas SP10 (376,13 mg/parcela), JK2 (283,90 mg/parcela) y JK4 (307,07 mg/parcela). Al igual que en la variable PSA, de estos resultados se podría inferir que la población natural de rizobios en la rizosfera del control no inoculado ejerció un efecto superior en la planta en cuanto a la fijación del dinitrógeno atmosférico, aunque ello no implicara, necesariamente, una mayor capacidad de infección radicular de dichas cepas. Tampoco se descarta que la planta haya utilizado de forma más eficiente el N mineral en el control no inoculado por la ausencia de rizobios autóctonos efectivos; como se observó en la variable IN, dicho control mostró los peores índices de infección radical.

However, it was not observed that the low nodulation value forcibly implied low nitrogen yield in the treatment inoculated with the strain HA2 (table 5). Gómez *et al.* (2009) observed, in plants of *Cicer arietinum* and *Vigna unguiculata*, under controlled conditions, that the P deficiency significantly decreased nodulation; while the specific nodular activity and root production increased in some treatments.

The variable NR (table 5) showed that all the inoculated treatments were statistically higher ($p < 0,05$) than the non-inoculated control (2,00), which constitutes an evidence of the fact that the root infection capacity of the inoculated strains was higher than that of the natural rhizobia population of the experimental soil.

The treatments inoculated with the native strains JH2 (4,24) and HA3 (4,24) were statistically higher than the others. The results point, undoubtedly, towards nodule formation statistically higher ($p < 0,05$) in the plants inoculated with the strains used in the trial; this could have occurred due to the fact that the soil showed slight acidity values, and most of the strains applied to *C. plumieri* combine the characteristics of being

En este sentido, Collins *et al.* (2009) y Arresé-Igor *et al.* (2009) aseguraron que el estrés climático posterior a la siembra afecta el proceso de fijación biológica del nitrógeno, con la inactivación de la nitrogenasa como primera respuesta al déficit hídrico creciente y, por lo tanto, se afecta la actividad nodular de forma previa a la fotosíntesis. Como se muestra en la tabla 2, en los meses posteriores a la siembra de la leguminosa hubo una depresión notable de las precipitaciones en el área experimental (diciembre: 34,8 mm; enero: 45,7 mm), por lo que no se descarta que este fuera el motivo por el cual las cepas que se inocularon no pudieran expresar al máximo su potencial de fijación del dinitrógeno atmosférico. Por otra parte, según Nápoles *et al.* (2008) la eficiencia simbiótica puede estar basada no solo en los factores edafoclimáticos, sino también en los factores de nodulación *nod*, los cuales pueden diferir entre las cepas.

No se observó, sin embargo, que el bajo índice de nodulación implicara obligatoriamente el bajo rendimiento de nitrógeno en el tratamiento inoculado con la cepa HA2 (tabla 5). Gómez *et al.* (2009) observaron, en plantas de *Cicer arietinum* y de *Vigna unguiculata*, en condiciones controladas, que la deficiencia de P disminuyó significativamente la nodulación; mientras que la actividad nodular específica y la producción de raíces se incrementó en algunos tratamientos.

La variable IN (tabla 5) mostró que todos los tratamientos inoculados fueron estadísticamente superiores ($p < 0,05$) al control no inoculado (2,00), lo cual constituye una evidencia de que la capacidad de infección radicular de las cepas inoculadas fue mayor que la de la población natural de rizobios del suelo experimental. Los inoculados con las cepas nativas JH2 (4,24) y HA3 (4,24) resultaron estadísticamente superiores al resto. Estos resultados apuntan, indudablemente, hacia una formación de nódulos estadísticamente superior ($p < 0,05$) en las plantas inoculadas con las cepas que se utilizaron en el experimento; ello pudo deberse a que el suelo presentó tenores ligeros de acidez, y la mayor parte de las cepas aplicadas a *C. plumieri* com-

tolerant to acid pH and having a high symbiotic fixation potential (Bécquer, 2002). Nevertheless, in legume prospections conducted in the Cauto Valley, Cuba, Gómez *et al.* (2010) found that *C. plumieri* as well as the other collected legumes showed high values of natural nodulation. This contradicts, somehow, the report by Howieson *et al.* (2008) about the fact that the main cause of the non-optimal use of the dinitrogen symbiotic fixation is the competition of the introduced strains with the autochthonous ones, because the latter tend to have very high infective capacity, but low fixation capacity. On the other hand, the high nodulation rates shown by the strains from the central region did not always imply higher values in ADW and NY, possibly due to an imbalance of the nutrient exchange between the symbionts. In this regard, Martínez-Romero and Palacios (1990) considered that the root infection capacity of rhizobia, expressed by the common *nod* genes, does not always imply high symbiotic capacity, which in turn constitutes the expression of other genes, such as *nif* and *fix*.

These results were corroborated with the correlation and regression analyses. In the inoculated treatments, the dependence degree and the correlation of the variable NY with regards to NR (table 6) were weak ($R^2 = 0,04$; $r = 0,06$), as well as the correlation of ADW with regards to NR ($R^2 = 0,26$; $r = 0,16$). It is obvious that there was not a close relation among these variables in the host plants, for which it is assumed that the biochemical-biological relation between the root infection and the atmospheric nitrogen fixation capacities could vary in the studied strains, perhaps due to external factors –such as the edaphoclimatic ones- or internal –such as those related to genetics (Martínez-Romero *et al.*, 1990). Fesenko *et al.* (1995) obtained similar results in the correlation of these variables by inoculating *Pisum sativum* with *Rhizobium leguminosarum*.

However, a higher regression and correlation degree ($R^2 = 0,34$; $r = 0,59$) was found between NY and ADW (table 7). These results, especially those of regression, should not be considered high from the statistical point of view (Antonio

binan las características de ser tolerantes a pH ácido y poseer un alto potencial de fijación simbiótica (Bécquer, 2002). Sin embargo, en prospecciones de leguminosas realizadas en el Valle del Cauto, Cuba, Gómez *et al.* (2010) encontraron que tanto *C. plumieri* como el resto de las leguminosas colectadas presentaron altos índices de nodulación natural. Ello contradice, de cierta forma, lo expresado por Howieson *et al.* (2008) acerca de que la mayor causa del uso no óptimo de la fijación simbiótica del dinitrógeno en la agricultura es la competencia de las cepas introducidas con las autóctonas, ya que estas últimas tienden a tener muy alta capacidad infectiva, pero baja capacidad de fijación. Por otra parte, los altos índices de nodulación presentados por las cepas de la zona central no siempre implicaron mayores valores en PSA y RN, debido posiblemente a un desbalance del intercambio de nutrientes entre los simbioses. Al respecto, Martínez-Romero y Palacios (1990) consideraron que la capacidad de infección radicular de los rizobios, expresada por los genes comunes *nod*, no siempre implica una alta capacidad simbiótica, que a su vez constituye la expresión de otros genes, como los *nif* y los *fix*.

Estos resultados se corroboraron con los análisis de correlación y de regresión. En los tratamientos inoculados, el grado de dependencia y la correlación de la variable RN con respecto al IN (tabla 6) fueron débiles ($R^2 = 0,04$; $r = 0,06$), así como del PSA con respecto al IN ($R^2 = 0,26$; $r = 0,16$). Es obvio que no existió una relación estrecha entre estas variables en las plantas hospederas, por lo que se asume que la relación bioquímico-fisiológica entre la capacidad de infección radicular y la de fijación del nitrógeno atmosférico pudo variar en las cepas estudiadas,

Sigarroa, personal communication), but according to the opinion of the authors of this work, they tend to corroborate the observations made by Bordeleau *et al.* (1977) in *Medicago sativa*; in this species there was a high correlation between nitrogen yield and aerial dry weight, for which they consider, as best strain selection criterion, the results in dry weight. Other authors, such as Hume *et al.* (1985) and Prévost (1987), reported that the nitrogen yield in *Onobrychis viciifolia* was highly correlated to plant growth. This phenomenon was also evaluated by Provorov and Tikhonovich (2003), who stated that the intensity of dinitrogen fixation is correlated to the energetic process of the plant, as is the photosynthetic activity, which provides not only the necessary energy for the nitrogenase reaction, but also the carbon structures for the assimilation of its products.

From the results, it is concluded that the native strains inoculated in *C. plumieri* did not show, in general, high symbiotic efficiency as compared to the non-inoculated control. These strains, with the exception of HA2 in NY, as well as JH2 and HA3 in NR, did not exert a highly positive effect on the plant, maybe because of the intervention of adverse climate factors, such as post-planting water stress. However, such strains have good infective potential, which is highly evaluated as competitiveness factor in the rhizosphere. A weak interrelation was observed between the variables NY and ADW with regards to NR, as well as a higher interrelation between the variable NY with regards to ADW.

These results should be taken into consideration for further studies related to the legume-rhizobium symbiosis.

--End of the English version--

Tabla 6. Ecuación de regresión lineal y correlación de RN (mg/parcela) y PSA (g/parcela) con respecto a los valores de IN.

Table 6. Linear regression and correlation equation of NY (mg/plot) and ADW (g/plot) with regards to NR values.

Indicador	Ecuación de regresión lineal	R^2	r
RN	$Y = 380,61 + 7,02929 * x$	0,04*	0,06
PSA	$Y = 212,775 + 10,2772 * x$	0,26*	0,16

* $P \geq 0,1$

debido quizás a factores externos –como los edafoclimáticos– o internos –como los genéticos (Martínez-Romero *et al.*, 1990). Fesenko *et al.* (1995) obtuvieron resultados similares en la correlación de estas variables al inocular *Pisum sativum* con *Rhizobium leguminosarum*.

Sin embargo, se halló un mayor grado de regresión y de correlación ($R^2 = 0,34$; $r = 0,59$) entre el RN y el PSA (tabla 7). Estos resultados, sobre todo los de la regresión, no se deben considerar altos desde el punto de vista estadístico (Antonio Sigarroa, comunicación personal), pero según la opinión de los autores del presente trabajo tienden a corroborar lo observado por Bordeleau *et al.* (1977) en *Medicago sativa*; en esta especie existió una alta correlación entre el rendimiento de nitrógeno y el peso seco de la planta, por lo que ellos consideran, como mejor criterio de selección de las cepas, los resultados en el peso seco. Otros autores, como Hume *et al.* (1985) y Prévost (1987), informaron que el rendimiento de nitrógeno en *Onobrychis viciifolia* estuvo altamente correlacionado con el crecimiento de la planta. Este fenómeno fue valorado, además, por Provorov y Tikhonovich (2003), quienes afirmaron que la intensidad de la fijación del dinitrógeno está correlacionada con el proceso energético de la planta, como lo es la actividad fotosintética, la cual provee no solo la energía necesaria para la reacción de la nitrogenasa, sino también las estructuras de carbono para la asimilación de sus productos.

A partir de los resultados, se concluye que las cepas nativas inoculadas en *C. plumieri* no presentaron, en general, una alta eficiencia simbiótica en comparación con el control no inoculado. Estas cepas, con la excepción de HA2 en el RN, así como JH2 y HA3 en el IN, no

ejercieron un efecto altamente positivo en la planta, debido quizás a la intervención de factores climáticos adversos, como el estrés hídrico postsiembra. No obstante, dichas cepas poseen un buen potencial infectivo, lo cual es altamente valorado como factor de competitividad en la rizosfera. Se observó una interrelación débil entre las variables RN y PSA con respecto a IN, así como una interrelación más alta entre la variable RN con respecto a PSA.

Estos resultados se deben tener en cuenta para la continuación de estudios relacionados con la simbiosis leguminosa-rizobio.

Referencias bibliográficas

- Anon. 1979. Clasificación genética de los suelos de Cuba. Academia de Ciencias de Cuba. Instituto de Suelos. La Habana, Cuba.
- Arresé-Igor, C. *et al.* 2009. Aspectos fisiológicos de la respuesta a sequía en leguminosas. Resúmenes XXIV RELAR. La Habana, Cuba. p. 38.
- Bécquer, C.J. 2002. Caracterización y selección de rizobios, aislados de leguminosas nativas de Sancti Spiritus, Cuba. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de La Habana, Cuba. 140 p.
- Bordeleau, L.M. *et al.* 1977. Effects des souches de *Rhizobium meliloti* et des coupes sucesives de la Luzerne (*Medicago sativa*) sur la fixation symbiotique d'azote. *Can. J. Plant Sci.* 57:433
- Collins, D. *et al.* 2009. Importancia de la FBN en cultivos y principales factores ambientales que la condicionan. Resúmenes XXIV RELAR. La Habana, Cuba. p. 36
- Date, R.A. 1991. Nodulation success and persistence of recommended inoculum strains for subtropical and tropical forage legumes in northern Australia. *Soil Biol. Biochem.* 23:533
- Davies, F.T. *et al.* 2005. Influence of arbuscular mycorrhizae indigenous to Peru and a flavonoid

Tabla 7. Ecuación de regresión lineal y correlación de RN (mg/parcela) con respecto a los valores de PSA (g/parcela).

Table 7. Linear regression and correlation equation of NR (mg/plot) with regards to ADW values (g/plot).

Indicador	Ecuación de regresión lineal	R^2	r
RN	$Y = 137,482 + 1,078*x$	0,34**	0,59

**P<0,05

- on growth, yield and leaf elemental of "Yungay" potatoes. *Hort. Science*. 40 (2):381
- Fesenko, A.N. *et al.* 1995. Selection of *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae strains for inoculation of *Pisum sativum* L. cultivars: Analysis of symbiotic efficiency and nodulation competitiveness. *Plant and Soil*. 172: 189
- Funes, F. 2007. Los recursos fitogenéticos y la agroecología en Cuba. Memorias VII Taller Internacional sobre Recursos Fitogenéticos-FITOGEN. Sancti Spíritus, Cuba. p. 13
- Gómez, I. *et al.* 2010. Leguminosas naturalizadas en el Valle del Cauto, Cuba. *Pastos y Forrajes*. 33:393
- Gómez, L.A. *et al.* 2009. Variabilidad genotípica en la fijación simbiótica del nitrógeno en garbanzo y caupi: tolerancia a la deficiencia de fósforo y la salinidad. Resúmenes XXIV RELAR. La Habana, Cuba. p. 63.
- Hernández, A. *et al.* 1999. Nueva revisión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos, La Habana. 23 p.
- Hernández, Neice. 1989. Contribución al estudio de la regionalización de gramíneas en la provincia Sancti Spíritus. Tesis presentada en opción al grado científico de Dr. en Ciencias Agrícolas. Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spíritus, Cuba. 134 p.
- Hernández, Neice *et al.* 1999. Leguminosas naturalizadas en las regiones ganaderas de Sancti-Spíritus. *Pastos y Forrajes*. 22:205
- Howieson, J.G. *et al.* 2008. Prospects for the future use of legumes. In: Nitrogen-fixing leguminous symbioses. (Eds. M.J. Dilworth *et al.*). Springer, The Netherlands. p. 363
- Hume, L.J. *et al.* 1985. Nitrogen fixation in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). Effectiveness of the nitrogen-fixing system. *N. Z. J. Agric. Res.* 28: 337
- López, R. *et al.* 2002. Efectividad de cepas nativas de *Rhizobium* de un suelo Vertisol en la nodulación de leguminosas pratenses tropicales. *Pastos y Forrajes*. 25: 93
- Martínez-Romero, Esperanza & Palacios, R. 1990. The *Rhizobium* genome. *Cri. Rev. Plant Sci.* 9:59
- Nápoles, María Caridad *et al.* 2008. Influencia de algunos factores edáficos sobre la eficiencia de inoculantes en soya. Resúmenes Biotecnología'2008. La Habana. p. 368
- Olivera, Yuseika *et al.* 2008. Colecta de leguminosas forrajeras en tres provincias orientales de Cuba. *Pastos y Forrajes*. 31:25
- Ostle, B. 1984. Estadística aplicada. Editorial Científico Técnica, La Habana., Cuba. 629 p.
- 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.
- Provorov, N.A. & Tikhonovich, I.A. 2003. Genetic resources for improving nitrogen fixation in legume-rhizobia symbiosis. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 50:89
- Skerman, P. *et al.* 1991. Leguminosas forrajeras tropicales. FAO. Roma. 326 p.
- Somasegaran, P. & Hoben, H.J. 1994. Handbook for Rhizobia. Springer-Verlag, New York, USA. 450 p.
- Sylvester-Bradley, R. *et al.* 1983. Use of undisturbed soil cores for evaluation of *Rhizobium* strains and methods for inoculation of tropical forage legumes in a Colombia Oxisol. *Plant Soil*. 2: 237
- Tang, M. 1996. Efecto de la nodulación natural en ocho leguminosas. *Pastos y Forrajes*. 19: 131
- Tang, M. *et al.* 1994. Efecto de las cepas nativas de rizobios sobre varias leguminosas tropicales. *Pastos y Forrajes*. 17:45
- Vance, C.P. *et al.* 2000. Biological nitrogen fixation: phosphorus-a critical need?. In: Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation. Foz do Iguacu, Paraná, Brazil. p. 509
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodules bacteria. IBP Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 164 p.

Recibido el 7 de noviembre del 2011

Aceptado el 30 de mayo del 2012

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE PASTOS Y FORRAJES “INDIO HATUEY”**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN PASTOS Y FORRAJES****Resumen de Tesis**

Título: Evaluación del potencial productivo y nutricional del *Lablab purpureus* cv. Rongai

Autor: Ing. Héctor Santana Armas

Con el objetivo de determinar la influencia de la época, el momento de siembra, la edad de cosecha y el estado fenológico, en el rendimiento, el porcentaje de hojas, la composición bromatológica y la calidad nutricional de *Lablab purpureus* cv. Rongai, se realizaron experimentos en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey” durante cuatro años. La siembra se efectuó por semilla (20 kg de semilla pura germinable por hectárea) y se usó una fertilización básica de superfosfato triple de sodio y cloruro de potasio (50:50 kg/ha). A los 15 días de emergidas las plantas, se aplicó una fertilización nitrogenada con urea (60 kg/ha). En la época poco lluviosa, se aplicó riego (200-250 m³/ha) cada 15-20 días. El forraje se obtuvo de parcelas con dimensiones variables (1 500-2 500 m²), acorde con los requerimientos de masa verde necesaria para la evaluación con los animales. Para la determinación del valor nutritivo, se utilizaron seis carneros adultos castrados, con un peso vivo de 37 a 40 kg, alojados en jaulas individuales de metabolismo. Se realizó la colección total de heces fecales, con pesaje diario del forraje ofrecido y de los residuos. El forraje (antes de ser ofrecido) se troceó a 2 o 3 cm, se suministró a voluntad y se garantizó un 10% adicional en relación con el consumo del día anterior. Se tomaron muestras representativas de 300 g del forraje y los residuos, y un 10% –en peso– de las heces fecales de cada animal. El potencial productivo de *L. purpureus* cv. Rongai estuvo influido por el momento de siembra y la época del año. Los mejores momentos de siembra fueron en el periodo lluvioso, en mayo-junio, y en el poco lluvioso, durante noviembre-diciembre, en los que fue posible aprovechar todas las fenofases del cultivo. Esta leguminosa puede ser empleada durante todo el año, ya que mantiene adecuados y estables valores bromatológicos y de digestibilidad. En el periodo lluvioso, cuando la planta estaba en estado vegetativo, la digestibilidad de la proteína bruta ascendió hasta los 77 días, y en el poco lluvioso, los mayores valores en la digestibilidad de la materia orgánica se presentaron en la planta en estado lechoso. El consumo de materia seca fue afectado por la época del año, el momento de siembra, el estado fenológico y el contenido en hojas, y los mayores valores se obtuvieron cuando la planta estaba en la fenofase de grano lechoso. El consumo del resto de los nutrientes, por su vinculación con la ingestión de MS, siguió el mismo comportamiento. Se recomienda promover el fomento de la producción de semilla y su empleo como leguminosa de corte y acarreo para suplementar a los rumiantes; también, realizar estudios para su introducción en las tecnologías de fabricación de ensilajes mixtos y heno, su utilización en banco de proteína (sola o como leguminosa acompañante de plantas forrajeras), como cultivo intercalado en especies de ciclo corto y como mejorador de suelo.