

Inoculación de trigo (*Triticum aestivum*, L.) con rizobios adaptados a ecosistemas ganaderos de Sancti Spiritus, Cuba

Inoculation of wheat (*Triticum aestivum*, L.) with rhizobia adapted to livestock ecosystems from Sancti Spiritus, Cuba

C.J. Bécquer¹, Beatriz Salas¹, D. Archambault², J. Slaski² y A. Anyia²

¹ Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spiritus, Cuba

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

² Department Environmental Technologies, Alberta Research Council, Vegreville, AB, Canada

E-mail: slaski@arc.ab.ca

Resumen

Se efectuó un ensayo de invernadero con el objetivo de seleccionar cepas de rizobios inoculadas en trigo (*Triticum aestivum*, L., var. CDC Teal), así como determinar las interrelaciones de dependencia entre algunas variables. Se utilizaron 30 cepas procedentes de leguminosas naturalizadas de Sancti Spiritus, Cuba, pertenecientes al género *Bradyrhizobium* sp., así como 12 cepas comerciales. Los inóculos se confeccionaron en medio CLM y fueron agitados hasta alcanzar un título de 10^6 - 10^8 cél./mL. Se utilizaron métodos estándar para la inoculación de cereales. El diseño experimental fue de bloques al azar con 44 tratamientos y cuatro réplicas. Un tratamiento se fertilizó con NH_4NO_3 (150 ppm N/kg⁻¹). Se construyó un dendrograma mediante el método de Ward y se hallaron los coeficientes de regresión. Se constató un incremento significativo de los valores en todas las variables (excepto en el peso seco de las espigas) de los tratamientos inoculados, comparados con el testigo absoluto. Se seleccionaron 20 cepas como altamente promisorias sobre la base de los valores estadísticos alcanzados en las variables estudiadas. Los tratamientos seleccionados, cuyos valores fueron estadísticamente superiores a los del control absoluto, constituyeron el 47% en los inoculados con cepas nativas y el 50% en los inoculados con cepas comerciales; y existió una mayor dependencia estadística entre el PSR y las variables de mayor representatividad productiva en los tratamientos inoculados con cepas comerciales.

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

Abstract

A greenhouse essay was carried out with the objective of selecting rhizobia strains inoculated to wheat (*Triticum aestivum*, L., var. CDC Teal), as well as determining the dependence interrelations between some variables. Thirty strains from naturalized legumes of Sancti Spiritus, Cuba, belonging to the *Bradyrhizobium* sp. genus, as well as 12 commercial strains, were used. The inoculi were prepared in BYM medium and shaken until they reached a titer of 10^6 - 10^8 cel./mL. Standard methods were used for the inoculation of cereals. A randomized block experimental design with 44 treatments and four replications was used. A treatment was fertilized with NH_4NO_3 (150 ppm N/kg⁻¹). A dendrogram was built through the Ward method and the regression coefficients were found. A significant increase was observed in the values of all the variables (except in the dry weight of the ears) of the inoculated treatments. Twenty strains were selected as highly promising based on the statistical values reached by the variables studied. The treatments selected, which values were statistically higher than those of the absolute control, constituted 47% of the ones inoculated with native strains and 50% of the ones inoculated with commercial strains; and there was a higher statistical dependence between the RDW and the variables of higher productive representativeness in the treatments inoculated with commercial strains.

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

Introducción

El trigo (*Triticum aestivum*, L.) constituye un cereal importante desde el punto de vista alimenticio, tanto para el ser humano como para los animales. Este posee ventajas en su producción sobre otros cereales, como el arroz y el maíz. Es mucho más eficiente en el uso del agua (produce más grano por unidad de agua) y su rango geográfico sobrepasa grandemente al del arroz y el maíz, por lo que se adapta a los lugares fríos y también a los moderadamente calientes. En Cuba desde el año 1956 se obtuvo la primera variedad nacional y posteriormente, en el Instituto de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical (INIFAT), se han obtenido siete variedades resistentes a las condiciones edafoclimáticas del país (Gutiérrez, Pérez, Cabrera, Villasana, López-Cervantes, Uranga, Díaz-Esquivel y Marrero, 2005), por lo que el estudio de los factores biológicos con potencial suficiente para aumentar su productividad es una tarea de gran importancia para el desarrollo sostenible de la agricultura.

Por otra parte, se conoce el efecto beneficioso de los rizobios como bacterias fijadoras del nitrógeno atmosférico en las leguminosas a través de la simbiosis leguminosa-rizobio. Estas bacterias son utilizadas ampliamente en el mundo para el incremento de la producción de grano y forraje, con un ahorro sustancial de divisas y una contribución significativa al cuidado del medio ambiente. De acuerdo con investigaciones recientes, estas bacterias pueden colonizar también las raíces de las plantas no leguminosas. La infección rizobiana en dichas especies probablemente sea más común en la naturaleza que lo que se consideraba (Matiru y Dakora, 2004). Según Dakora (2003), los rizobios producen diversos metabolitos como auxinas, citoquininas, riboflavinas y vitaminas, los cuales pueden actuar como sustancias promotoras del crecimiento vegetal.

Al contar con cepas de rizobios que han sido aisladas y caracterizadas con técnicas de fisiología microbiana y biología molecular, y evaluadas en cuanto a su capacidad de fijación de nitróge-

Introduction

Wheat (*Triticum aestivum*, L.) constitutes an important cereal from the feeding point of view, for human beings as well as for animals. It has advantages in its production as compared to other cereals, such as rice and corn. It is much more efficient in the use of water (it produces more grain per water unit) and its geographical range highly exceeds that of rice and corn, for which it adapts well to cold and moderately hot places. In Cuba, the first national variety was obtained in 1956 and afterwards, at the Institute of Fundamental Research of Tropical Agriculture (INIFAT), seven varieties resistant to the edaphoclimatic conditions of the country have been obtained (Gutiérrez, Pérez, Cabrera, Villasana, López-Cervantes, Uranga, Díaz-Esquivel and Marrero, 2005), for which the study of the biological factors with enough potential to increase their productivity is a very important task for the sustainable development of agriculture.

On the other hand, the beneficial effect of rhizobia as bacteria fixing atmospheric nitrogen in legumes through the legume-rhizobium symbiosis is known. These bacteria are widely used in the world for increasing the production of grain and forage, substantially saving money and contributing significantly to the protection of the environment. According to recent studies, these bacteria can colonize also the roots of the non leguminous plants. The infection by rhizobia in such species is probably more common in nature than what had been previously considered (Matiru and Dakora, 2004). According to Dakora (2003), the rhizobia produce diverse metabolites such as auxins, cytokinins, riboflavins and vitamins, which can act as substances promoting plant growth.

Having rhizobia strains which have been isolated and characterized with techniques of microbial physiology and molecular biology, and evaluated regarding their capacity to fix atmospheric nitrogen in legumes (Bécquer, Prévost and Cloutier, 2001; Bécquer, Prévost, Cloutier and Laguerre, 2002; Bécquer, 2003), and

no atmosférico en leguminosas (Bécquer, Prévost y Cloutier, 2001; Bécquer, Prévost, Cloutier y Laguerre, 2002; Bécquer, 2003), y dada la importancia que tiene la introducción del trigo y otros cereales en la agricultura cubana, el objetivo del presente estudio fue la selección de cepas de rizobio sobre la base de su efecto positivo en diversos indicadores fisiológicos de la planta, así como determinar las posibles interrelaciones de dependencia estadística entre las variables de mayor representatividad productiva.

Materiales y Métodos

- **Identificación de las cepas de rizobio.** Se utilizaron 30 cepas procedentes de leguminosas naturalizadas de Sancti Spiritus, Cuba (*Centrosema*, *Neonotonia* y *Stylosanthes*). Estas cepas fueron confirmadas en trabajos anteriores como rizobios y ubicadas taxonómicamente en el género *Bradyrhizobium* sp. (Bécquer et al., 2002). Se utilizaron también 12 cepas comerciales pertenecientes a diferentes géneros y especies de rizobio (tabla 1).
- **Preparación de inóculos.** Los inóculos se confeccionaron en medio CLM (caldo-levadura-manitol) (Somasegaran y Hoben, 1994) a partir de una asada de cultivos frescos en medio agarizado. Los inóculos se colocaron en agitación (120 rpm) durante siete días (para las especies de lento crecimiento) o de tres a cuatro días (especies de rápido crecimiento) en una zaranda orbital a 30°C, hasta alcanzar un título UFC (unidad formadora de colonias) de 10^6 - 10^8 cél./mL.
- **Ensayos de invernadero.** Se escogió una variedad de trigo (CDC Teal) donada por Alberta Research Council, Canadá. Las semillas fueron pregerminadas previamente. Se utilizaron métodos estándar para la inoculación de los cereales (Sabry, Saleh, Batchelor, Jones, Jotham, Webster, Kothari, Davey y Cocking, 1997; Biswas, Ladha y Dazzo, 2000), con cambios en la frecuencia y la cantidad de inóculo. Así, un inóculo bacteriano en cantidad de 3 mL/planta, que contenía 10^6 - 10^8 cél./mL, fue aplicado a los cinco días de la siem-

given the importance of the introduction of wheat and other cereals in Cuban agriculture, the objective of this work was the selection of rhizobia strains based on their positive effect on diverse physiological indicators of the plant, as well as to determine the possible interrelations of statistical dependence between the variables of higher productive representativeness.

Materials and Methods

- **Identification of the Rhizobium strains.** Thirty strains from naturalized legumes of Sancti Spiritus, Cuba (*Centrosema*, *Neonotonia* and *Stylosanthes*) were used. These strains were confirmed as rhizobia in previous works and taxonomically located in the *Bradyrhizobium* sp. genus (Bécquer et al., 2002). Twelve commercial strains belonging to different genera and species of rhizobium were used (table 1).
- **Preparation of inoculi.** The inoculi were prepared in BYM medium (broth-yeast-mannitol) (Somasegaran and Hoben, 1994) from a set of fresh cultures in agar medium. They were placed in shaking (120 rpm) during seven days (for the slow-growing species) or from three to four days (fast-growing species) in an orbital shaker at 30°C, until they reached a CFU (colony-forming unit) titer of 10^6 - 10^8 cel./mL.
- **Greenhouse essays.** A wheat variety (CDC Teal) donated by the Alberta Research Council, Canada, was chosen. The seeds were previously pre-germinated. Standard methods were used for the inoculation of the cereals (Sabry, Saleh, Batchelor, Jones, Jotham, Webster, Kothari, Davey and Cocking, 1997; Biswas, Ladha and Dazzo, 2000), with changes in the frequency and quantity of inoculum. Thus, a bacterial inoculum in quantity of 3 mL/plant, containing 10^6 - 10^8 cel./mL, was applied five days after seeding and, consecutively, other inoculations were performed (6 mL/plant and 12 mL/plant, respectively), 20 and 30 days after seeding.
- **Experimental design and statistical analysis.** A randomized block design with 44

Tabla 1. Relación de las cepas nativas cubanas y comerciales utilizadas en el experimento.
Table 1. Relation of the Cuban native and commercial strains used in the trial.

Cepas	Especie de rizobio	Leguminosa hospedera
Cepas nativas		
TD ₁	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Neonotonia wightii</i>
TE ₁	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Neonotonia wightii</i>
TE ₄	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Neonotonia wightii</i>
TD ₄	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Neonotonia wightii</i>
JH ₁	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema virginianum</i>
JL ₂	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema virginianum</i>
JK ₃	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema virginianum</i>
JJ ₆	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema virginianum</i>
JK ₆	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema virginianum</i>
JJ ₂	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema virginianum</i>
JK ₁	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema virginianum</i>
JH ₂	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema virginianum</i>
JJ ₄	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema virginianum</i>
HA ₃	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema plumieri</i>
HA ₁	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema plumieri</i>
HG ₂	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema plumieri</i>
SP ₁	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema</i> sp.
SP ₄	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema</i> sp.
SP ₆	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Stylosanthes viscosa</i>
SP ₇	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema virginianum</i>
SP ₈	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema virginianum</i>
SP ₉	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema virginianum</i>
SP ₁₂	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema pubescens</i>
SP ₁₅	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema pubescens</i>
SP ₁₆	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema pubescens</i>
SP ₁₈	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema pubescens</i>
SP ₂₀	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema pubescens</i>
SP ₂₁	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema pubescens</i>
SP ₂₂	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema pubescens</i>
SP ₂₃	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema pubescens</i>
Cepas comerciales		
61B7	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Glycine javanica</i>
25B6	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Centrosema pubescens</i>
NITRAGIN	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania</i> sp.
ORS 571	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
ATCC 10004	<i>R. leguminosarum</i> bv viciae	<i>Pisum sativum</i>
ATCC 10317	<i>Bradyrhizobium lupini</i>	<i>Lupinus</i> sp.
ATCC 14480	<i>R. leguminosarum</i> bv trifolii	<i>Trifolium pratense</i>
ATCC 9930	<i>Sinorhizobium meliloti</i> grupo A	<i>Medicago sativa</i>
MSDJ 865	<i>Rhizobium loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>
USDA 110	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
USDA 76	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max</i>
USDA 191	<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine max</i>

bra y, consecutivamente, se realizaron otras inoculaciones (6 mL/planta y 12 mL/planta, respectivamente), a los 20 y 30 días de la siembra.

treatments and four replications was used. An absolute control and a control with a nitrogen porter (NH_4NO_3 , 150 ppm N/kg^{-1}) were included. An ANOVA (SAS, 1999-2000, SAS

- **Diseño experimental y análisis estadístico.** Se empleó un diseño en bloque al azar con 44 tratamientos y cuatro réplicas. Se incluyó un control absoluto y uno con un portador nitrogenado (NH_4NO_3 , 150 ppm N/kg^{-1}). Se realizó un ANOVA (SAS, 1999-2000, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA); las diferencias entre medias se hallaron mediante la d6cima de comparaci6n de Duncan (1955) y se tom6 en consideraci6n la desviaci6n estandar (DE). Se construy6 un dendrograma mediante el m6todo de Ward (distancia euclidiana al cuadrado) (StatGraphics Plus, versi6n 2.0, 1994-1996, Statistical Graphics Corporation) y se hallaron los coeficientes de regresi6n (r^2) y correlaci6n mediante la aplicaci6n del paquete estadístico antes mencionado. Se evaluaron las variables: peso seco a6reo (PSA), peso seco raíz (PSR), longitud del tallo (LT), peso seco espigas (PSE), rendimiento de granos (REND.) y peso de 1 000 granos (P1000G).

Resultados y Discusi6n

Selecci6n de cepas de rizobio

Es conocido que los rizobios producen fitohormonas que promueven el crecimiento vegetal y, posiblemente, incrementen los rendimientos, a pesar de no haber sido detectada alguna fijaci6n de N_2 en las especies no leguminosas (Matiru y Dakora, 2004). En el presente experimento se constataron resultados estadísticamente superiores cuando se inocul6 el trigo con cepas pertenecientes a diferentes g6neros (tabla 2). En la variable peso de 1 000 granos se determin6 que los tratamientos inoculados con las cepas nativas TE4, HA1, HA3, HG2, JH1, JH2, SP1, SP4, SP8, SP12, SP15, SP21, SP22 y SP23, pertenecientes a *Bradyrhizobium* sp., as6 como las cepas comerciales 25B6 y 61B7 (*Bradyrhizobium* sp.), ORS 571 (*Azorhizobium caulinodans*), USDA 191 (*Sinorhizobium fredii*) y ATCC 10317 (*Bradyrhizobium lupini*), mostraron los valores estadísticos superiores, con diferencias significativas ($P < 0,01$) respecto al testigo absoluto. Ocho de estos tratamientos

Institute Inc., Cary, NC, USA) was used; the differences between means were found by means of Duncan's comparison test (1955) and the standard deviation (SD) was taken into consideration. A dendrogram was built through the Ward method (square Euclidian distance) (StatGraphics Plus, version 2.0, 1994-1996, Statistical Graphics Corporation) and the regression (r^2) and correlation coefficients were found by means of the above-mentioned statistical pack. The variables evaluated were: aerial dry weight (ADW), root dry weight (RDW), stem length (SL), ear dry weight (EDW), grain yield (GY) and weight of 1000 grains (W1000G).

Results and Discussion

Selection of rhizobium strains

It is known that rhizobia produce phytohormones that promote plant growth and, possibly, increase yields, although no N_2 fixation has been detected in non leguminous species (Matiru and Dakora, 2004). In this study statistically higher results were observed when wheat was inoculated with strains belonging to different genera (table 2). In the variable weight of 1 000 grains the treatments inoculated with the native strains TE4, HA1, HA3, HG2, JH1, JH2, SP1, SP4, SP8, SP12, SP15, SP21, SP22 and SP23, belonging to *Bradyrhizobium* sp., as well as the commercial strains 25B6 and 61B7 (*Bradyrhizobium* sp.), ORS 571 (*Azorhizobium caulinodans*), USDA 191 (*Sinorhizobium fredii*) and ATCC 10317 (*Bradyrhizobium lupini*), were determined to show the highest statistical values, with significant differences ($P < 0,01$) as compared to the absolute control. Eight of these above-mentioned treatments had statistical superiority in relation to the absolute control in the variable stem length, although there were others in that variable which turned out to be superior to the absolute control, such as: HA1, HG2, JJ2, JJ4, JK1, JK3, JK6, SP9, SP20 and SP21 (*Bradyrhizobium* sp.), as well as ATCC 10004 and ATCC 14480 (*Rhizobium leguminosarum*).

Tabla 2. Resultados de la inoculación de trigo con rizobios nativos cubanos y comerciales.
Table 2. Results of the inoculation of wheat with Cuban native and commercial rhizobia.

Tratamientos	Peso de 1 000 granos (g)	Rendimiento de granos (g/maceta)	Peso seco espigas (g/maceta)	Peso seco aéreo (g/maceta)	Peso seco raíz (g/maceta)	Longitud del tallo (cm)
Cepas nativas						
TD ₁	22,52 ^{cd}	2,20 ^{bcd}	2,99 ^{bcd}	2,71 ^{bcd}	2,21 ^{ab}	67,70 ^{abc}
TD ₄	23,23 ^{cd}	2,25 ^{bcd}	3,09 ^{bcd}	2,88 ^{bcd}	1,91 ^{abcd}	66,60 ^{abc}
TE ₁	23,25 ^{cd}	1,98 ^{bcd}	2,65 ^{bcd}	2,52 ^{bcd}	1,86 ^{abcde}	69,72 ^{abc}
TE ₄	25,66 ^{abc}	2,00 ^{bcd}	2,59 ^{bcd}	2,41 ^{cde}	1,36 ^{defgh}	69,88 ^{abc}
HA ₁	25,14 ^{abc}	2,38 ^{bc}	3,05 ^{bcd}	2,85 ^{bcd}	1,00 ^{fgh}	74,94 ^a
HA ₃	26,10 ^{abc}	2,35 ^{bc}	3,10 ^{bcd}	2,73 ^{bcd}	2,16 ^{abc}	70,37 ^{abc}
HG ₂	25,72 ^{abc}	2,13 ^{bcd}	2,77 ^{bcd}	2,76 ^{bcd}	1,17 ^{defgh}	74,09 ^{ab}
JH ₁	25,36 ^{abc}	2,25 ^{bcd}	2,99 ^{bcd}	2,73 ^{bcd}	1,72 ^{abcd}	69,46 ^{abc}
JH ₂	26,00 ^{abc}	2,33 ^{bc}	3,08 ^{bcd}	2,85 ^{bcd}	1,17 ^{defgh}	70,07 ^{abc}
JJ ₂	24,69 ^{abcd}	1,95 ^{bcd}	2,63 ^{bcd}	2,53 ^{bcd}	1,05 ^{efgh}	67,05 ^{abc}
JJ ₂	24,64 ^{abcd}	2,20 ^{bcd}	2,90 ^{bcd}	2,79 ^{bcd}	1,90 ^{abcd}	71,24 ^{ab}
JJ ₄	23,50 ^{cd}	2,30 ^{bcd}	2,69 ^{bcd}	2,77 ^{bcd}	1,34 ^{defgh}	74,05 ^{ab}
JJ ₆	22,85 ^{cd}	1,65 ^e	2,27 ^d	2,52 ^{bcd}	1,07 ^{efgh}	64,96 ^{abc}
JK ₁	22,49 ^{cd}	2,28 ^{bcd}	3,08 ^{bcd}	3,05 ^b	1,02 ^{fgh}	71,24 ^{ab}
JK ₃	24,25 ^{abcd}	2,30 ^{bcd}	3,06 ^{bcd}	2,85 ^{bcd}	1,38 ^{cdefgh}	70,82 ^{ab}
JK ₆	22,72 ^{cd}	1,95 ^{bcd}	2,62 ^{bcd}	2,71 ^{bcd}	1,15 ^{defgh}	72,57 ^{ab}
SP ₁	25,31 ^{abc}	2,25 ^{bcd}	2,98 ^{bcd}	2,61 ^{bcd}	1,27 ^{defgh}	63,12 ^{bc}
SP ₄	25,44 ^{abc}	2,52 ^b	3,32 ^{ab}	2,90 ^{bc}	1,57 ^{abcd}	69,63 ^{abc}
SP ₆	22,20 ^{cd}	1,93 ^{bcd}	2,58 ^{bcd}	2,58 ^{bcd}	1,58 ^{abcd}	65,47 ^{abc}
SP ₇	23,72 ^{cd}	2,15 ^{bcd}	2,88 ^{bcd}	2,63 ^{bcd}	1,48 ^{bcdefg}	69,60 ^{abc}
SP ₈	25,56 ^{abc}	2,38 ^{bc}	3,09 ^{bcd}	2,83 ^{bcd}	1,11 ^{defgh}	69,51 ^{abc}
SP ₉	23,85 ^{cd}	2,05 ^{bcd}	2,75 ^{bcd}	2,63 ^{bcd}	1,22 ^{defgh}	71,72 ^{ab}
SP ₁₂	24,90 ^{abc}	2,38 ^{bc}	3,11 ^{bcd}	2,95 ^{bc}	1,60 ^{abcd}	71,48 ^{ab}
SP ₁₅	24,87 ^{abc}	2,23 ^{bcd}	2,93 ^{bcd}	2,71 ^{bcd}	1,20 ^{defgh}	73,65 ^{ab}
SP ₁₆	24,46 ^{abcd}	2,33 ^{bc}	3,07 ^{bcd}	2,80 ^{bcd}	1,23 ^{defgh}	67,91 ^{abc}
SP ₁₈	24,01 ^{bcd}	2,23 ^{bcd}	2,98 ^{bcd}	2,88 ^{bcd}	1,21 ^{defgh}	67,97 ^{abc}
SP ₂₀	24,42 ^{abcd}	2,08 ^{bcd}	2,70 ^{bcd}	2,67 ^{bcd}	1,40 ^{cdefgh}	72,97 ^{ab}
SP ₂₁	24,80 ^{abc}	2,18 ^{bcd}	2,84 ^{bcd}	2,65 ^{bcd}	1,19 ^{defgh}	71,08 ^{ab}
SP ₂₂	25,23 ^{abc}	1,93 ^{bcd}	2,56 ^{bcd}	2,47 ^{bcd}	1,85 ^{abcde}	68,39 ^{abc}
SP ₂₃	28,63 ^a	2,50 ^b	3,28 ^{abc}	2,90 ^{bc}	1,49 ^{bcdefg}	66,21 ^{abc}
Cepas comerciales						
25B6	26,06 ^{abc}	2,08 ^{bcd}	2,76 ^{bcd}	2,63 ^{bcd}	1,09 ^{defgh}	70,09 ^{abc}
61B7	28,50 ^{ab}	2,43 ^{bc}	3,11 ^{bcd}	2,90 ^{bc}	2,33 ^a	73,29 ^{ab}
NITRAGIN	23,94 ^{cd}	1,93 ^{bcd}	2,43 ^{cd}	2,50 ^{bcd}	1,28 ^{defgh}	71,46 ^{ab}
ORS 571	25,71 ^{abc}	2,28 ^{bcd}	3,06 ^{bcd}	2,86 ^{bcd}	1,33 ^{defgh}	70,88 ^{ab}
MSDJ 865	24,18 ^{abcd}	2,28 ^{bcd}	3,01 ^{bcd}	2,82 ^{bcd}	1,43 ^{bcdefgh}	68,50 ^{abc}
USDA 110	22,91 ^{cd}	2,05 ^{bcd}	2,80 ^{bcd}	2,72 ^{bcd}	0,86 ^{gh}	68,45 ^{abc}
USDA 191	25,20 ^{abc}	2,20 ^{bcd}	2,71 ^{bcd}	2,78 ^{bcd}	1,40 ^{cdefgh}	71,68 ^{ab}
USDA 76	23,92 ^{cd}	2,13 ^{bcd}	2,81 ^{bcd}	2,75 ^{bcd}	0,92 ^{fgh}	68,75 ^{abc}
ATCC 10004	23,76 ^{cd}	2,23 ^{bcd}	3,01 ^{bcd}	2,83 ^{bcd}	1,61 ^{abcd}	72,17 ^{ab}
ATCC 10317	24,93 ^{abc}	2,23 ^{bcd}	3,00 ^{bcd}	2,96 ^{bc}	1,56 ^{abcd}	72,53 ^{ab}
ATCC 14480	23,87 ^{cd}	1,83 ^{cde}	2,48 ^{bcd}	2,27 ^{de}	1,06 ^{efgh}	73,25 ^{ab}
ATCC 9930	24,71 ^{abcd}	2,35 ^{bc}	3,03 ^{bcd}	2,77 ^{bcd}	1,10 ^{defgh}	66,69 ^{abc}
Control absoluto	20,24 ^d	1,67 ^{de}	2,32 ^d	2,16 ^e	0,61 ^h	59,67 ^c
Control fertilizado	25,19 ^{abc}	3,10 ^a	3,88 ^a	3,73 ^a	1,91 ^{abcd}	75,88 ^a
	P<0,01	P<0,01	P<0,01	P<0,01	P<0,01	P<0,01
	DE: 2,67	DE: 0,40	DE: 0,50	DE: 0,38	DE: 0,55	DE: 6,14

mencionados anteriormente tuvieron superioridad estadística en comparación con el control absoluto en la variable longitud del tallo, aunque existieron otros más en esa variable que resultaron superiores al testigo absoluto, tales como: HA1, HG2, JJ2, JJ4, JK1, JK3, JK6, SP9, SP20 y SP21 (*Bradyrhizobium* sp.), así como ATCC 10004 y ATCC 14480 (*Rhizobium leguminosarum*).

Otros tratamientos que fueron inoculados con las cepas de *Bradyrhizobium* sp.: TD1, TD4, TE1, JJ2, SP6 y SP7, *R. leguminosarum* ATCC 10004 (peso seco raíz y peso seco aéreo); *Bradyrhizobium* sp.: TD4, JJ2, JK1, JK3, SP16 y SP18; *R. loti* MSDJ 865, *Bradyrhizobium* sp.: SP4 (peso seco de las espigas) y JJ4 y SP16 (rendimiento de granos), así como *Sinorhizobium meliloti* ATCC 9930 (rendimiento de granos), también presentaron resultados estadísticamente superiores con respecto al testigo absoluto (tabla 2). Höflich, Wiehe y Köhn (1994) observaron que la inoculación con *R. leguminosarum* incrementó de forma significativa la materia seca aérea del maíz, del trigo de primavera y de la cebada de primavera. Así mismo, Hilali, Prévost, Broughton y Antoun (2001) determinaron que el incremento en el rendimiento de grano en trigo inoculado con *R. leguminosarum* fue de 23-25% en comparación con el testigo absoluto. Otros autores, como Biswas *et al.* (2000), obtuvieron valores estadísticos superiores en el rendimiento de grano al inocular arroz con cepas pertenecientes a *Rhizobium* sp., *R. leguminosarum* y *Bradyrhizobium* sp.

Las variables longitud del tallo y peso de 1 000 granos se caracterizaron por presentar un mayor número de tratamientos de igual significación estadística (letras comunes) con respecto al testigo fertilizado (19 tratamientos en peso de 1 000 granos, 19 en longitud del tallo, cinco en peso seco raíz y dos en peso seco de las espigas), así como un mayor número de tratamientos superiores al control absoluto (tabla 2). Los valores en la primera variable indican claramente el efecto de la inoculación en el crecimiento de la planta, debido quizás a la acción directa de algunas de las fitohormonas responsables de dichos procesos, secretadas por los rizobios; mientras que

Other treatments that were inoculated with the *Bradyrhizobium* sp. strains: TD1, TD4, TE1, JJ2, SP6 and SP7, *R. leguminosarum* ATCC 10004 (root dry weight and aerial dry weight); *Bradyrhizobium* sp.: TD4, JJ2, JK1, JK3, SP16 and SP18; *R. loti* MSDJ 865, *Bradyrhizobium* sp.: SP4 (ear dry weight) and JJ4 and SP16 (grain yield), as well as *Sinorhizobium meliloti* ATCC 9930 (grain yield), also showed statistically higher results with regards to the absolute control (table 2). Höflich, Wiehe and Köhn (1994) observed that the inoculation with *R. leguminosarum* significantly increased the aerial dry matter of corn, spring wheat and spring barley. Likewise, Hilali, Prévost, Broughton and Antoun (2001) determined that the increase of grain yield in wheat inoculated with *R. leguminosarum* was 23-25% as compared to the absolute control. Other authors, such as Biswas *et al.* (2000), obtained higher statistical values in grain yield when inoculating rice with strains belonging to *Rhizobium* sp., *R. leguminosarum* and *Bradyrhizobium* sp.

The variables stem length and weight of 1 000 grains showed a higher number of treatments of equal statistical significance (common letters) with regards to the fertilized control (19 treatments in weight of 1 000 grains, 19 in stem length, five in root dry weight and two in ear dry weight), as well as a higher number of treatments superior to the absolute control (table 2). The values in the first variable clearly indicate the effect of the inoculation on plant growth, perhaps due to the direct action of some of the phytohormones responsible for such processes, secreted by rhizobia; while in the second variable they could indicate a direct consequence of a better absorption of nutrients, by improving the root morphology of the plants with inoculation.

When building a dendrogram (fig. 1) based on the variables studied, the formation of five conglomerates with the treatments that presented statistically higher values was observed, in which stood out the treatments inoculated with the strains: TD4, JH1, JJ2, HA1, JH2, SP8, SP4, SP12, ATCC 10317, HG2, 25B6, USDA 191, SP1, SP15, SP21, HA3, 61B7, SP23, ATCC 10004 and

en la segunda pudieran indicar una consecuencia directa de una mejor absorción de nutrientes, al mejorar la morfología radicular de las plantas con la inoculación.

Al construir un dendrograma (fig. 1) sobre la base de las variables estudiadas, se constató la formación de cinco conglomerados con los tratamientos que presentaron valores estadísticamente superiores, donde se destacaron los tratamientos inoculados con las cepas: TD4, JH1, JJ2, HA1, JH2, SP8, SP4, SP12, ATCC 10317, HG2, 25B6, USDA 191, SP1, SP15, SP21, HA3, 61B7, SP23, ATCC 10004 y ORS571, las cuales resultaron promisorias para su utilización en futuros ensayos de campo. Esta agrupación permitió determinar que de los tratamientos inoculados con las cepas nativas, el 47% se destacó por sus resultados estadísticamente superiores; mientras que en los inoculados con cepas comerciales la selección fue del 50%. No obstante, resulta obvio que la mayor parte de las cepas seleccionadas correspondieron a las nativas, lo cual representa un potencial importante de utilización de los recursos microbianos locales en la inoculación de trigo en futuras prácticas agronómicas.

ORS571, which turned out to be promising for their use in future field assays. This grouping allowed to determine that from the treatments inoculated with the native strains, 47% had statistically higher results; while in the treatments inoculated with commercial strains the selection was 50%. However, it is obvious that most of the strains selected corresponded to the native ones, which represents an important potential of use of the local microbial resources in the inoculation of wheat in future agronomic practices.

Regression analyses between variables

An interesting aspect are the regression analyses carried out when evaluating all the treatments inoculated indistinctly with native or commercial strains and the variables of higher representativeness from the productive point of view. These analyses showed that there was a weak regression ($r^2 = 0,046\%$) between the variables root dry matter and stem length (fig. 2), root dry matter and yield ($r^2 = 5,60\%$) (fig. 3), as well as between root dry matter and weight of 1 000 grains ($r^2 = 4,15\%$) (fig. 4).

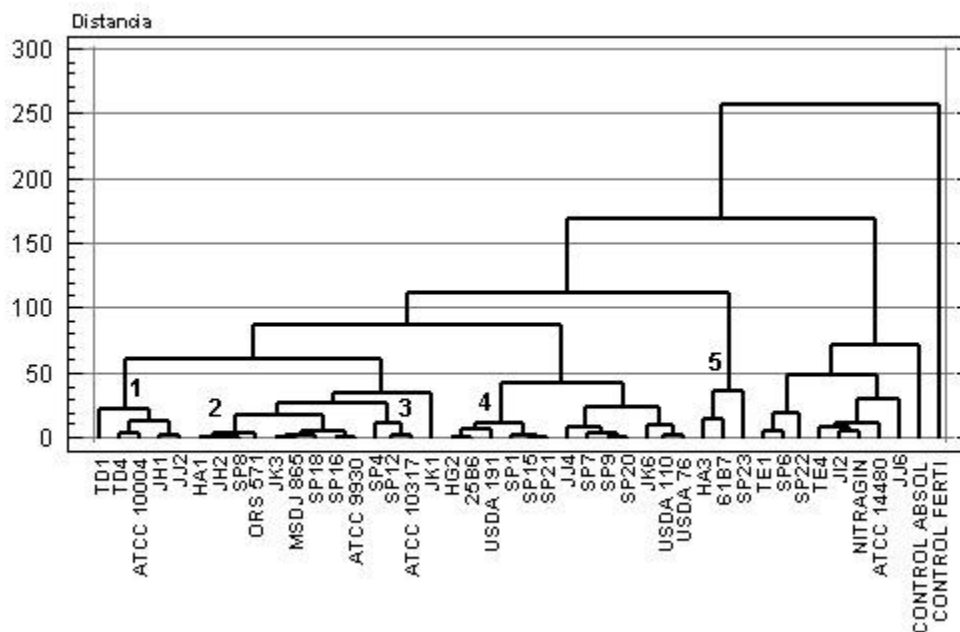


Fig. 1. Agrupación de los tratamientos.

Fig. 1. Grouping of the treatments.

Análisis de regresión entre variables

Un aspecto de interés lo constituyen los análisis de regresión efectuados al evaluar todos los tratamientos inoculados indistintamente con cepas nativas o comerciales y las variables de mayor representatividad desde el punto de vista productivo. Estos análisis mostraron que existió una regresión débil ($r^2 = 0,046\%$) entre las variables peso seco raíz y longitud del tallo (fig. 2), peso seco raíz y rendimiento ($r^2 = 5,60\%$) (fig. 3), así como entre peso seco raíz y peso de 1 000 granos ($r^2 = 4,15\%$) (fig. 4).

When carrying out such analyses separately, it was observed that for the treatments inoculated with native strains the regression was weak too (root dry matter and stem length: $r^2 = 3,88\%$, root dry matter and yield: $r^2 = 0,72\%$ and root dry matter and weight of 1 000 grains: $r^2 = 0,059\%$, respectively) (figs. 5, 6 and 7). Nevertheless, in the treatments inoculated with commercial strains the regression was strong for those same variables ($r^2 = 34,50\%$, $r^2 = 37,39\%$ and $r^2 = 53,36\%$, respectively) (figs. 8, 9 and 10), which indicates a high dependence of these variables on the root development. This could point towards an

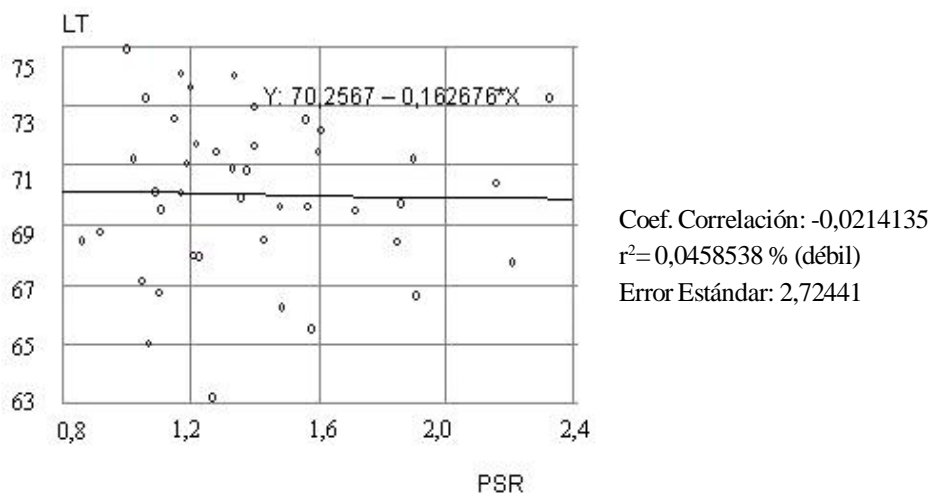


Fig. 2. Gráfico de dispersión de las variables PSR (independiente) y longitud del tallo (dependiente).
 Fig. 2. Dispersion graph of the variables RDW (independent) and stem length (dependent).

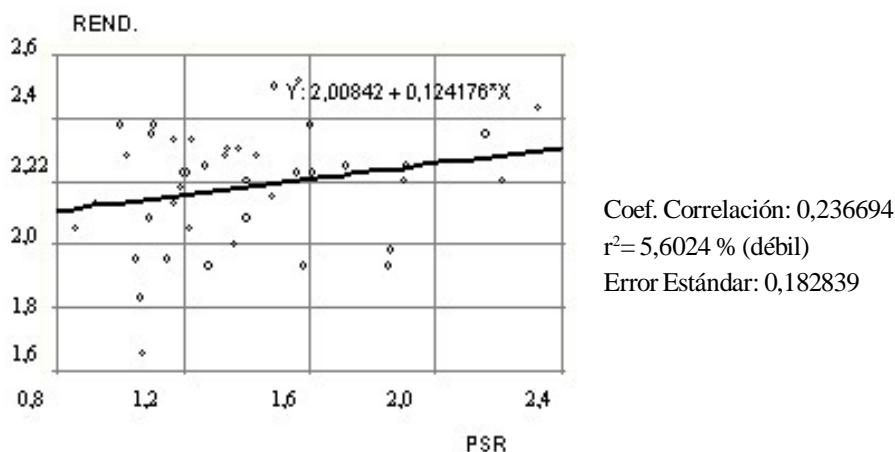


Fig. 3. Gráfico de dispersión de las variables PSR (independiente) y rendimiento (dependiente).
 Fig. 3. Dispersion graph of the variables RDW (independent) and yield (dependent).

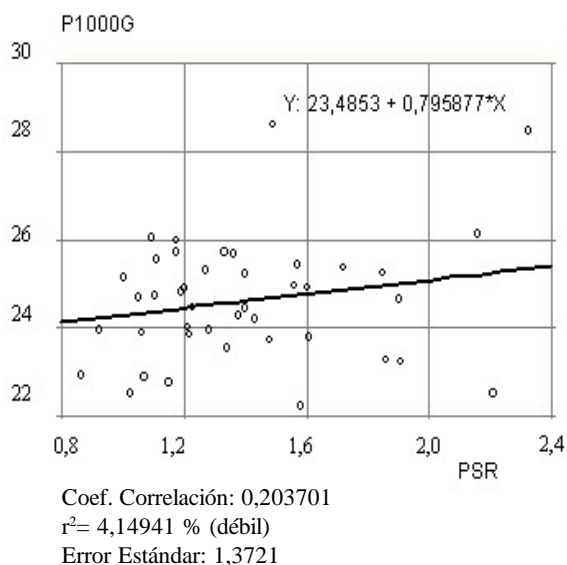


Fig. 4. Gráfico de dispersión de las variables PSR (independiente) y rendimiento de 1 000 granos (dependiente).

Fig. 4. Dispersion graph of the variables RDW (independent) and yield of 1 000 grains (dependent).

Al efectuar dichos análisis por separado, se constató que para los tratamientos inoculados con cepas nativas también la regresión fue débil (peso seco raíz y longitud del tallo: $r^2 = 3,88\%$, peso seco raíz y rendimiento: $r^2 = 0,72\%$ y peso seco raíz y peso de 1 000 granos: $r^2 = 0,059\%$, respectivamente) (figs. 5, 6 y 7). Sin embargo, en los tratamientos inoculados con cepas comerciales la regresión fue fuerte para esas mismas variables ($r^2 = 34,50\%$, $r^2 = 37,39\%$ y $r^2 = 53,36\%$, respectivamente) (figs. 8, 9 y 10), lo cual indica una alta dependencia de estas variables respecto al desarrollo radicular. Esto pudiera apuntar hacia un efecto inducido en la planta con la secreción de hormonas de diferente naturaleza química por los diferentes géneros de rizobio constituyentes de las cepas comerciales utilizadas. Según Biswas *et al.* (2000) los microorganismos diazotrofos pueden promover el crecimiento vegetal mediante la transferencia del N_2 fijado o el mejoramiento de la absorción de nutrientes a través de la modulación de actividades hormonales relacionadas en las plantas inoculadas. Lupwayi y Clayton (2004) plantearon que los rizobios pueden

induced effect in the plant with the secretion of hormones of different chemical nature by the different rhizobia genera constituting the commercial strains used. According to Biswas *et al.* (2000) the diazotrophic organisms can promote plant growth through the transference of the fixed N_2 or the improvement of nutrient absorption by means of the modulation of related hormonal activities in the inoculated plants. Lupwayi and Clayton (2004) stated that rhizobia can act as promoters of plant growth and change the physiology and morphology of the inoculated roots, which leads to a higher absorption of N and other nutrients.

It can not be ruled out that the genera and species of rhizobia present in the commercial strains used can be differentiated from the native strains of *Bradyrhizobium* sp. regarding the way of having incidence on the morphology and physiology of the roots and, thus, influence positively the values of the variables of productive importance, as the ones that have been shown in this work.

However, these observations do not invalidate the selection of the above-related strains (fig. 1), but show the existence of biochemical processes in the plant-microorganism interaction which is necessary to study in future essays.

According to the results, a significant increase of the values in all the variables was observed, except in the ear dry weight in the inoculated treatments when compared to the absolute control. Twenty rhizobium strains were selected as highly promising, based on the statistical values reached in the variables studied. The treatments selected, which values were statistically higher than those of the absolute control, constituted 47% in the ones inoculated with native strains and 50% in the ones inoculated with commercial strains; and there was a higher statistical dependence between the RDW and the variables of higher productive representativeness in the treatments inoculated with commercial strains.

With the objective of furthering and continuing these studies, it is recommended to carry out field essays with the strains selected in the cereals of economic interest for Cuba, perform essays in which different cereal genotypes are inoculated

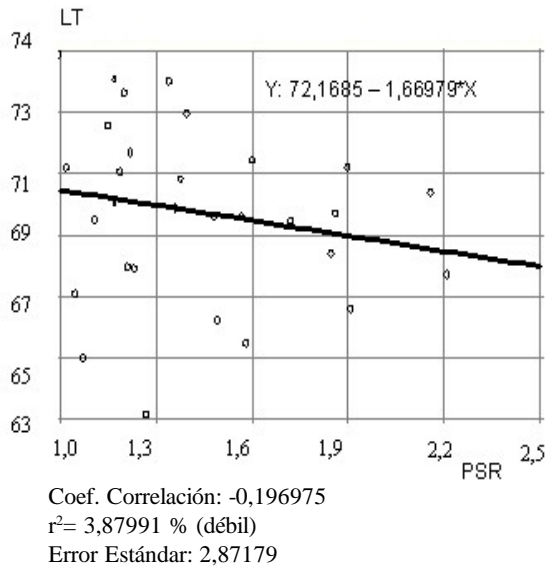


Fig. 5. Gráfico de dispersión de las variables PSR (independiente) y longitud del tallo (dependiente) de los tratamientos inoculados con las cepas nativas.

Fig. 5. Dispersion graph of the variables RDW (independent) and stem length (dependent) of the treatments inoculated with the native strains.

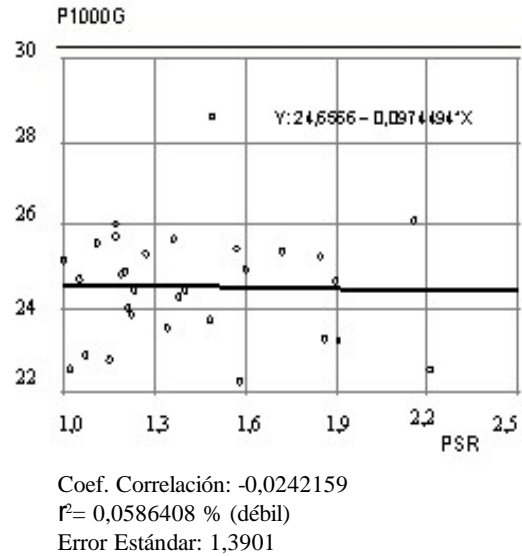


Fig. 7. Gráfico de dispersión de las variables PSR (independiente) y peso 1 000 granos (dependiente) de los tratamientos inoculados con las cepas nativas.

Fig. 7. Dispersion graph of the variables RDW (independent) and weight of 1 000 grains (dependent) of the treatments inoculated with the native strains.

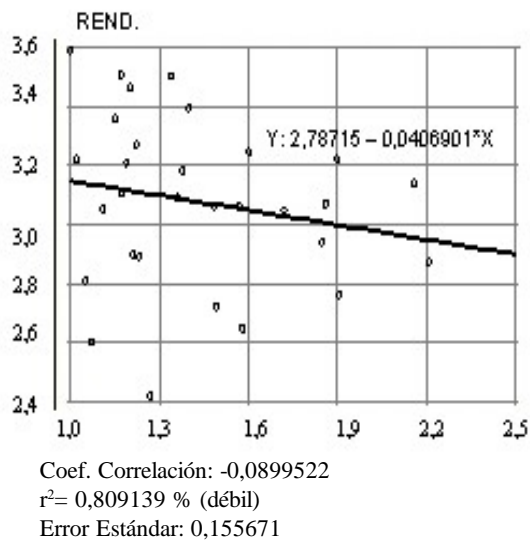


Fig. 6. Gráfico de dispersión de las variables PSR (independiente) y rendimiento (dependiente) de los tratamientos inoculados con las cepas nativas.

Fig. 6. Dispersion graph of the variables RDW (independent) and yield (dependent) of the treatments inoculated with the native strains.

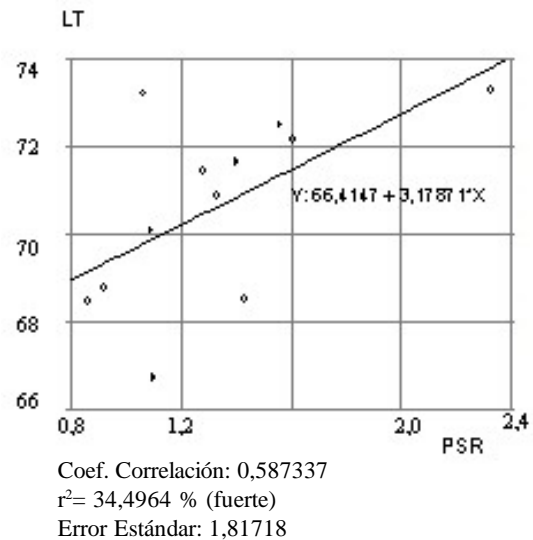
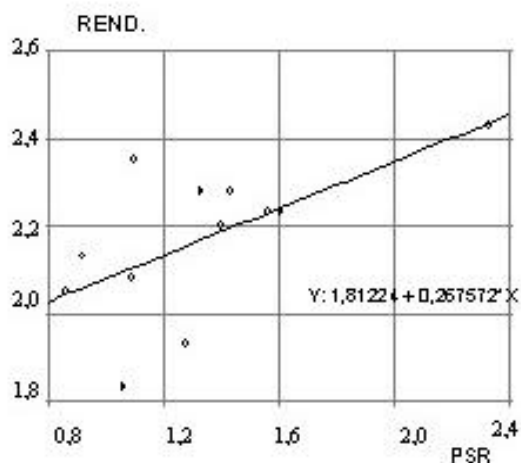


Fig. 8. Gráfico de dispersión de las variables PSR (independiente) y longitud del tallo (dependiente) de los tratamientos inoculados con las cepas comerciales.

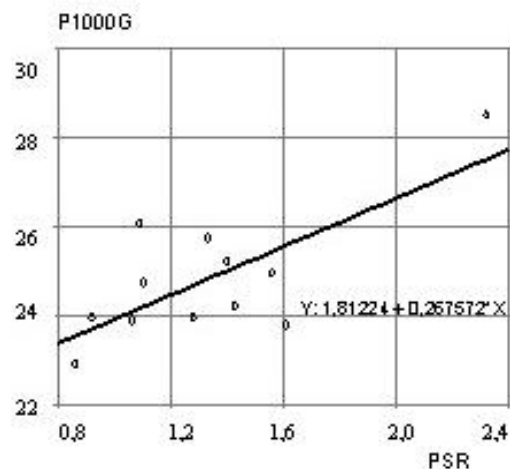
Fig. 8. Dispersion graphic of the variables RDW (independent) and stem length (dependent) of the treatments inoculated with the commercial strains.



Coef. Correlación: 0,611465,
 $r^2 = 37,389\%$ (fuerte)
 Error Estándar: 0,143647

Fig. 9. Gráfico de dispersión de las variables PSR (independiente) y rendimiento (dependiente) de los tratamientos inoculados con las cepas comerciales.

Fig. 9. Dispersion graph of the variables RDW (independent) and yield (dependent) of the treatments inoculated with the commercial strains.



Coef. Correlación: 0,730493
 $r^2 = 53,3619\%$ (fuerte)
 Error Estándar: 1,0515

Fig. 10. Gráfico de dispersión de las variables PSR (independiente) y peso 1 000 granos (dependiente) de los tratamientos inoculados con las cepas comerciales.

Fig. 10. Dispersion graph of the variables RDW (independent) and weight of 1 000 grains (dependent) of the treatments inoculated with the commercial strains.

actuar como promotores del crecimiento vegetal y cambiar la fisiología y morfología de las raíces inoculadas, lo que resulta en una mayor absorción de N y otros nutrientes.

No debe descartarse que los géneros y especies de rizobios presentes en las cepas comerciales utilizadas pueden diferenciarse de las cepas nativas de *Bradyrhizobium* sp. en cuanto al modo de incidir en la morfología y fisiología de las raíces y, por ende, influir positivamente en los valores de las variables de importancia productiva, como las que se han presentado en este trabajo.

No obstante, estas observaciones no invalidan la selección de las cepas relacionadas anteriormente (fig. 1), sino que muestran la existencia de procesos bioquímicos en la interacción planta-microorganismo que es necesario estudiar en futuros ensayos.

De acuerdo con los resultados, se constató un incremento significativo de los valores en todas las variables, excepto en peso seco espigas en los tratamientos inoculados al compararlos con

in order to select the treatments with the best plant genotype-rhizobium strain interactions and study the biochemical-physiological bases of the effect of rhizobia on cereals.

Acknowledgements

The financing, as well as the facilities, equipment and materials used for this work, were provided by the Alberta Research Council (Vegreville, Alberta, Canada), through a collaboration project with the Experimental Station of Pastures and Forages Sancti Spiritus, Cuba. The authors would like to thank deeply all the officials of the above-mentioned Canadian institution, especially Dr. Daniel Archambault and Dr. Jan Slaski, who did their best to make this project come true.

--End of the English version--

el testigo absoluto. Se seleccionaron 20 cepas de rizobio como altamente promisorias, sobre la base de los valores estadísticos alcanzados en

las variables estudiadas. Los tratamientos seleccionados, cuyos valores fueron estadísticamente superiores a los del control absoluto, constituyeron el 47% en los inoculados con cepas nativas y el 50% en los inoculados con cepas comerciales; y existió una mayor dependencia estadística entre el PSR y las variables de mayor representatividad productiva en los tratamientos inoculados con cepas comerciales.

Con el fin de profundizar y darle continuidad a estos estudios, se recomienda: efectuar ensayos de campo con las cepas seleccionadas en los cereales de interés económico para Cuba; realizar ensayos donde se inoculen diferentes genotipos de cereales para seleccionar los tratamientos de mejor interacción genotipo vegetal-cepa de rizobio; y estudiar las bases bioquímico-fisiológicas del efecto de los rizobios en los cereales.

Agradecimientos

El financiamiento, así como las instalaciones, equipos y materiales utilizados para este trabajo, fueron provistos por Alberta Research Council (Vegreville, Alberta, Canadá), a través de un proyecto de colaboración con la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spiritus, Cuba. Los autores agradecen profundamente a todos los funcionarios de la institución canadiense anteriormente mencionada, especialmente al Dr. Daniel Archambault y al Dr. Jan Slaski, quienes se esforzaron en hacer realidad este proyecto.

Referencias bibliográficas

- Bécquer, C.J. 2003. Avances en los estudios de la fijación biológica del nitrógeno en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spiritus. Memorias V Taller Internacional sobre Recursos Fitogenéticos. EEPF Sancti Spiritus. Sancti Spiritus, Cuba. p. 34
- Bécquer, C.J.; Prévost, Danielle & Cloutier, J. 2001. Aspectos fisiológicos y genotípicos en rizobios aislados de leguminosas forrajeras. *Pastos y Forrajes*. 24:123
- Bécquer, C.J.; Prévost, Danielle; Cloutier, J. & Laguerre, Gisele. 2002. Enfoque taxonómico de rizobios aislados en las leguminosas forrajeras *Centrosema plumieri*, *C. virginianum* y *Neonotonia wightii*, colectadas en Sancti Spiritus, Cuba. *Biología*. 16:137
- Biswas, J.C.; Ladha, J.K. & Dazzo, F.B. 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sc. Soc. of America J.* 64:1644
- Dakora, F.D. 2003. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phytol.* 158:39
- Gutiérrez, Lisset; Pérez, Susana; Cabrera, Melba; Villasana, R.; López-Cervantes, M.; Uranga, H.; Díaz-Esquivel, M. & Marrero, Sonia. 2005. Algunas experiencias en la producción de trigo cubano. Memorias. VI Taller Internacional de Recursos Fitogenéticos. EEPF Sancti Spiritus. Sancti Spiritus, Cuba. p. 180
- Hilali, A.; Prévost, Danielle; Broughton, W.J. & Antoun, H. 2001. Effects de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc. *Can. J. Microbiol.* 47:590
- Höflich, G.; Wiehe, W. & Köhn, G. 1994. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere microorganisms. *Experientia*. 50:897
- Lupwayi, N.Z. & Clayton, G.W. 2004. Endophytic rhizobia and other diazotrophic bacteria in nonlegume crops. *Recent Res. Devel. Crop Sci.* 1:227
- 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
- Sabry, S.R.S.; Saleh, S.A.; Batchelor, Caroline; Jones, J.; Jotham, J.; Webster, G.; Kothari, S.L.; Davey, M. & Cocking, E.C. 1997. Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. *Proc. R. Soc. Lond.* 264:341
- Somasegaran, P. & Hoben, H.J. 1994. Handbook for rhizobia. Springer-Verlag, New York. 450 p.

Recibido el 6 de Julio del 2006
Aceptado el 25 de julio del 2006