AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS NATIVAS DE *Rhizobium* AISLADAS DE LEGUMINOSAS PRATENSES EN SUELOS AFECTADOS POR LA SALINIDAD

**R.C. López, L.M. González, R. Ramírez, E. Cordoví,
I. Gómez y P. Castillo**

**Instituto de Investigaciones Agropecuarias “Jorge Dimitrov”
Gaveta Postal 2140, Bayamo 85100, Granma, Cuba**

Se realizaron prospecciones de nódulos de leguminosas nativas y/o naturalizadas y comerciales en suelos afectados por la salinidad y se procedió al conteo de los nódulos y a la evaluación de la nodulación según la abundancia, el tamaño predominante, el color interno y la nodulación en la raíz principal. Se aislaron 19 cepas de *Rhizobium* procedentes de ocho leguminosas, las cuales se caracterizaron de acuerdo con su velocidad de crecimiento y la apariencia, textura y forma de las colonias. Los resultados mostraron la diversidad de cepas de *Rhizobium* que nodulan las leguminosas pratenses en suelos afectados por la salinidad, así como que la nodulación no siempre fue efectiva; además, se encontró variabilidad en la velocidad de crecimiento y en las características de las colonias en las cepas de *Rhizobium* aisladas de las especies *Macroptilium atropurpureum* y *Sesbania sesban*.

Palabras claves: Leguminosas, *Rhizobium*, salinidad

Explorations of nodules of native and/or naturalized and commercial legumes were done in soils affected by salinity, and the counting of nodules and the evaluation of nodulation were carried out regarding abundance, predominant size, internal color and nodulation in the principal root. Nineteen strains of *Rhizobium*, proceeding from eight legumes, were isolated and characterized according to growth rate and appearance, texture and form of the colonies. The results showed the diversity of *Rhizobium* strains that form nodules in the legumes in soils affected by salinity; as well as that nodulation was not always effective. Furthermore, variability in the growth rate and in the characteristics of the colonies was found in *Rhizobium* strains isolated from the *Macroptilium atropurpureum* and *Sesbania sesban* species.

Additional index words: Legumes, *Rhizobium*, salinity

La salinidad de los suelos es un factor que reduce significativamente la productividad de las leguminosas (Elsheikh y Wood, 1995). En tales condiciones la asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* se encuentra seriamente afectada.

Al respecto diversos investigadores sostienen que la habilidad de estas plantas para adaptarse a los ambientes salinos depende de la nodulación y de la fijación de nitrógeno (Zahran, 1991), lo cual indica la importancia de aislar cepas de *Rhizobium* tolerantes a la salinidad.

La caracterización e identificación de cepas de *Rhizobium* es uno de los mayores problemas en la experimentación en campo, en aquellas que han sido seleccionadas bajo situaciones de estrés y puedan haberse diferenciado de la cepa original (Barboza, Correa y Rosas, 1996). El presente trabajo tuvo como objetivo el aislamiento y la caracterización de cepas nativas de *Rhizobium* provenientes de nódulos de leguminosas pratenses nativas y/o naturalizadas en suelos afectados por la salinidad, así como de un grupo de leguminosas pratenses comerciales cultivadas en suelos salinos.

MATERIALES Y METODOS

Ubicación geográfica del área de estudio y suelos predominantes

El área se encuentra localizada en la Granja San José de la Empresa Genética y Cría “Manuel Fajardo” del municipio Jiguaní, provincia Granma, a los 20°19' N y los 76°33' O en condiciones de ganadería semintensiva, sobre suelos de un rango de salinidad de débil a fuertemente salinos (1 300 a 5 100 ppm), clasificados según la

FAO/UNESCO en Cambisols y según la Soil Taxonomy en Mollisols (Labrada, Tóth, Catasús, Pérez, Castillo, Blayas, Noguerras y Vargas, 1995).

Prospección de nódulos

Se emplearon redes de muestreo de 100 x 100 m y cada 10 m se realizó el censo de las leguminosas pratenses en la zona de estudio; para ello se utilizó un marco de 0,5 x 0,5 m², el cual fue distribuido regularmente en la superficie estudiada a lo largo de líneas paralelas equidistantes. Se extrajeron las plantas y se procedió al conteo de los nódulos y la evaluación de la nodulación según la abundancia, el tamaño predominante, el color interno y la nodulación en la raíz principal (CIAT, 1988). Posteriormente se preservaron los nódulos según la metodología descrita por Beck, Materon y Afandi (1993).

Aislamiento y caracterización de cepas de *Rhizobium*

En condiciones de laboratorio se llevó a cabo el aislamiento de las cepas de *Rhizobium* a partir de los nódulos, según la metodología propuesta por la FAO (1985). Los cultivos obtenidos fueron re infectados en plantas para verificar la autenticidad de los aislamientos. Posteriormente se replicaron las cepas sucesivamente en placas con medio levadura-manitol-agar (LMA) y fueron incubadas a 28°C por 7 días para la determinación de la velocidad de crecimiento y la evaluación de las características de las colonias según su apariencia, textura y forma (CIAT, 1988).

Para obtener un mayor número de cepas de *Rhizobium* se procedió a la extracción y traslado de suelo proveniente del área de estudio hasta la profundidad 0-30 cm, cuyas características se muestran en la tabla 1, y se sembraron en macetas en casa con techo de vidrio siete leguminosas (*Clitoria ternatea*, *Leucaena leucocephala*, *Centrosema pubescens*, *Macroptilium atropurpureum*, *Sesbania rostrata*, *Canavalia ensiformis* y *Crotalaria juncea*), a las cuales se les realizaron los mismos pasos planteados anteriormente a los 90 días de germinadas.

Tabla 1. Características agroquímicas del suelo en el área de estudio.

pH	MO (%)	P ₂ O ₅	K ₂ O	K	Na	Ca	Mg	Vs	Vt
7,5	3,7	0,49	4,6	1,22	8,5	19,7	7,94	26,59	30,59
Sales solubles totales									
SST (ppm)	Ca	Mg	Na	K	CO ₃	HCO ₃	Cl	SO ₄	
5 538	1,67	0,71	6,9	0,09	0	0,60	4,27	3,99	

RESULTADOS Y DISCUSION

Prospección de nódulos

En el área de estudio fueron censadas 5 especies de leguminosas (*Desmanthus virgatus* (L.) Willd, *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb., *Aeschynomene americana* (L.), *Neptunia plena* (L.f.) Druce y *Desmodium scorpiurus* (Sw.) Desv.) con un rango de dominancia bajo (López, Labrada, Cordoví, Gómez, Castillo y Pérez, 1998), lo cual indica la poca abundancia de especies de leguminosas en esta área.

Al caracterizar la nodulación (tabla 2) se pudo apreciar que *D. virgatus* y *M. lathyroides* presentaron una abundancia media, un tamaño medio y un predominio de la nodulación en la raíz principal; el color interno de los nódulos fue rojo. Ello demuestra la presencia de cepas de *Rhizobium* efectivas en el suelo para estas especies, lo cual repercute en una fijación de nitrógeno más efectiva. Por otra parte, estas se encuentran en el grupo de leguminosas que nodulan efectivamente con un amplio rango de cepas, por lo que su especificidad es baja (López y Sistachs, 1986). Esto podría favorecer la tolerancia a la salinidad, por lo que pudieran considerarse especies promisorias para suelos fuertemente salinos (López et al., 1998).

En *N. plena*, *A. americana* y *D. scorpiurus* (tabla 2) se apreciaron valores más bajos en los indicadores analizados, lo que demostró la ineffectividad de las cepas de *Rhizobium* presentes en estos suelos. Ello puede estar dado por la falta de especificidad de las cepas con dichas especies de leguminosas, independientemente que se encuentren dentro del grupo de esta familia que nodulan con un amplio rango de cepas pero que a menudo son ineffectivas (López y Sistachs, 1986). Este fenómeno impide el posterior aislamiento de cepas de *Rhizobium* a partir de los nódulos recolectados.

Las especies de leguminosas que se sembraron en el suelo extraído de la zona de estudio presentaron un comportamiento variable en la nodulación (tabla 2). *C. ensiformis*, *C. juncea*, *S. sesban* y *M. atropurpureum* mostraron resultados favorables en su nodulación natural y se encuentran en el grupo de leguminosas que nodulan efectivamente con un rango amplio de cepas. *M. atropurpureum* es la única leguminosa capaz de nodular con todas las cepas aisladas de las demás especies de *Rhizobium* (Martínez, 1986). *L. leucocephala* presentó un comportamiento similar y si se tiene en cuenta que pertenece al grupo de las leguminosas que nodulan efectivamente solo con cepas específicas (López y Sistachs, 1986), ello constituye un indicador de la presencia de cepas nativas específicas para dicha especie en estos suelos (Martínez, 1986).

Tabla 2. Caracterización de la nodulación en las especies de leguminosas.

Leguminosas	Abundancia	Tamaño predominante	Color interno	Nodulación en la raíz principal
Leguminosas censadas				
<i>Desmanthus virgatus</i>	Mediana●	Mediano	Rojo	Predominante
<i>Macroptilium lathyroides</i>	Mediana●	Mediano	Rojo	Predominante
<i>Aeschynomene americana</i>	Poca*	Pequeño	Verde	Nula
<i>Neptunia plena</i>	Poca*	Pequeño	Verde	Nula
<i>Desmodium scorpiurus</i>	Poca*	Pequeño	Verde	Nula
Leguminosas estudiadas				
<i>Clitoria ternatea</i>	Poca*	Pequeño	Rojo	Regular
<i>Leucaena leucocephala</i>	Mediana●	Mediano	Rojo	Regular
<i>Centrosema pubescens</i>	No hay	-	-	-
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Mediana●	Pequeño	Rojo	Regular
<i>Sesbania sesban</i>	Mediana●	Mediano	Rojo	Predominante
<i>Canavalia ensiformis</i>	Mediana●	Mediano	Rojo	Regular
<i>Crotalaria juncea</i>	Mediana●	Grande	Rojo	Predominante

● 10-50

* 1-10

C. ternatea mostró poca abundancia y un tamaño pequeño de los nódulos, aunque fueron efectivos (coloración interna roja), lo que pudo deberse a una población baja de cepas de *Rhizobium* o a una disminución del potencial de las leguminosas en los procesos de colonización e infección de los pelos radiculares (Lakshmi-Kumari, Singh y Rao, 1974); estos se vuelven pequeños y deformados por encontrarse elevados tenores de NaCl en el medio (Tu, 1981) y por ser muy sensibles al estrés salino (Mackay y Barber, 1985), lo cual provoca una disminución en el crecimiento y el rendimiento de las leguminosas (López, González y García, 1999).

No se encontraron nódulos en la especie *C. pubescens*, lo que pudo ser causado por la ausencia en el suelo de cepas nativas efectivas para esta leguminosa, la poca tolerancia de esta especie a la salinidad o la combinación de ambos factores.

De manera general las leguminosas se consideran como sensibles o moderada-mente resistentes a la salinidad (Zahran, 1991) y muchas de ellas responden al estrés salino a través de disminución en el crecimiento, la nodulación y la fijación de nitrógeno (López, Ramírez y González, 1998). La presencia de especies de leguminosas en suelos fuertemente salinos, así como la adaptación de un grupo de especies comerciales a esas condiciones y su capacidad de fijar nitrógeno, constituyen en su conjunto una alternativa para el mejoramiento, la explotación y la conservación *in situ* del recurso suelo bajo condiciones de salinidad.

Aislamiento y caracterización de cepas de *Rhizobium*

Se logró aislar cepas de *Rhizobium* en ocho de las once leguminosas a las cuales se les recolectaron nódulos, debido a que las especies *N. plena*, *A. americana* y *D. scorpiurus* presentaron nódulos inefectivos y carentes de bacterias del género *Rhizobium*.

En *M. lathyroides* se aislaron tres cepas, las cuales presentaron uniformidad en su velocidad de crecimiento (tabla 3); además, las colonias formadas en el medio de cultivo mostraron una apariencia gelatinosa y una textura cremosa, con predominio de las formas redondeada y plana.

El dimorfismo de las cepas de *Rhizobium* es característico y muy frecuente en este género, lo cual no es un indicativo de que sean especies de diferentes géneros (CIAT, 1988).

Las cuatro cepas de *Rhizobium* aisladas de *D. virgatus* se caracterizaron por un crecimiento rápido en medio LMA y sus colonias fueron muy semejantes entre sí. Similar comportamiento se puso de manifiesto en los aislamientos obtenidos a partir de nódulos de *L. leucocephala* (2) y *C. ensiformis* (2).

Solamente se pudo aislar una cepa de los nódulos provenientes de *C. ternatea*, la cual se caracterizó por ser de crecimiento rápido; sus colonias mostraron una apariencia gelatinosa, una textura cremosa y eran redondeadas.

Las cepas aisladas de nódulos de *M. atropurpureum* y *S. sesban* presentaron variabilidad en la velocidad de crecimiento en medio LMA; se detectaron cepas de crecimiento rápido y lento y una marcada diferencia en las características de las colonias.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sicardi-Mallorca, Bedmer, Vinuesa e Izaguirre (1998) en la especie *S. sesban*, los cuales reportan cepas de crecimiento rápido, intermedio y lento, con producción de ácido y/o álcali. Esta es una especie muy promiscua, por lo que su habilidad para formar nódulos con diferentes especies de *Rhizobium* es un aspecto a tener en cuenta cuando se trabaja en programas de aislamiento y selección de cepas. *M. atropurpureum* es tolerante al estrés salino, debido fundamentalmente a las características propias del género y a su habilidad para nodular bajo estas condiciones con un amplio rango de cepas de *Rhizobium* (Martínez, 1986).

De forma general se encontró nodulación natural, aunque no siempre efectiva, en todas las leguminosas, excepto en la especie *C. pubescens*; por otra parte, se presentó un grado de variabilidad genética considerable en las cepas de *Rhizobium* en los indicadores morfofisiológicos analizados. Se recomienda realizar estudios de tolerancia a la salinidad *in vitro*.

Tabla 3. Caracterización de los aislamientos de *Rhizobium*.

Aislamiento	Planta hospedante	Velocidad de crecimiento	Colonias		
			Apariencia	Textura	Forma
Jd1	<i>M. lathyroides</i>	Rápido	Gelatinosa	Creмоса	Redondeada
Jd2	<i>M. lathyroides</i>	Rápido	Gelatinosa	Creмоса	Plana
Jd3	<i>M. lathyroides</i>	Rápido	Gelatinosa	Creмоса	Plana
Jd4	<i>D. virgatus</i>	Rápido	Gelatinosa	Creмоса	Redondeada
Jd5	<i>D. virgatus</i>	Rápido	Acuosa	Elástica	Plana
Jd6	<i>D. virgatus</i>	Rápido	Acuosa	Elástica	Plana
Jd7	<i>D. virgatus</i>	Rápido	Acuosa	Elástica	Plana
Jd8	<i>C. juncea</i>	Rápido	Gelatinosa	Creмоса	Redondeada
Jd9	<i>C. juncea</i>	Rápido	Gelatinosa	Creмоса	Redondeada
Jd10	<i>M. atropurpurem</i>	Lento	Acuosa	Elástica	Plana
Jd11	<i>M. atropurpurem</i>	Rápido	Gelatinosa	Creмоса	Redondeada
Jd12	<i>S. sesban</i>	Lento	Acuosa	Elástica	Plana
Jd13	<i>S. sesban</i>	Rápido	Gelatinosa	Creмоса	Redondeada
Jd14	<i>S. sesban</i>	Rápido	Gelatinosa	Creмоса	Redondeada
Jd15	<i>L. leucocephala</i>	Rápido	Acuosa	Elástica	Plana
Jd16	<i>L. leucocephala</i>	Rápido	Gelatinosa	Elástica	Plana
Jd17	<i>C. ensiformis</i>	Rápido	Gelatinosa	Creмоса	Redondeada
Jd18	<i>C. ensiformis</i>	Rápido	Gelatinosa	Creмоса	Redondeada
Jd19	<i>C. ternatea</i>	Rápido	Gelatinosa	Creмоса	Redondeada

REFERENCIAS

- BARBOZA, F.; CORREA, N. & ROSAS, S. 1996. Estudios metabólicos de cepas de *Bradyrhizobium* sp. tolerantes a estrés salino. Memorias XVIII RELAR. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. p. 197
- BECK, D.P.; MATERON, L.A. & AFANDI, F. 1993. Practical *Rhizobium*-Legume. Technology manual. ICARDA. 389 p.
- CIAT. 1988. Simbiosis leguminosa-rizobio. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Proyecto CIAT-UNDP. Cali, Colombia. 178 p.
- ELSHEIKH, E.A.E. & WOOD, M. 1995. Nodulation and N₂ fixation by soybean inoculated with salt-tolerant rhizobia or salt sensitive Bradyrhizobia in saline soil. *Rev. Biol. Biochem.* 27 (4/5):657
- FAO. 1985. Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno. Leguminosa/*Rhizobium*. Roma. 75 p.

- LABRADA, J.; TOTH, T.; CATASUS, L.; PEREZ, B.; CASTILLO, P.; BLAYAS, R.; NOGUERAS, R. & VARGAS, B. 1995. Estudio de la variabilidad espacial de la salinidad en suelos afectados por sales del Valle del Cauto. Informe final de tema. Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov". Granma, Cuba. 15 p. (Mimeo)
- LAKSHMI-KUMARI, M.; SINGH, C.S. & RAO, N.S.S. 1974. Root hair infection and nodulation in lucerne (*Medicago sativa L.*) as influenced by salinity and alkalinity. **Plant and Soil**. 40:261
- LOPEZ, M. & SISTACHS, E. 1986. Bacteriología de las leguminosas tropicales. En: Los pastos en Cuba. Tomo 1. Producción. EDICA. La Habana, Cuba. p. 229
- LOPEZ, R.; GONZALEZ, L.M. & GARCIA, D. 1999. Tolerancia a diferentes tenores de NaCl en cepas de *Rhizobium* aisladas de leguminosas pratenses. **Pastos y Forrajes**. 22:43
- LOPEZ, R.; LABRADA, J.; CORDOVI, E.; GOMEZ, I.; CASTILLO, P. & PEREZ, B. 1998. Comportamiento de algunas variables climatológicas, el estado actual de la salinidad y la vegetación predominante en un área bajo impacto ecológico del Valle del Cauto. Informe de resultado. Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov". Granma, Cuba. 22 p. (Mimeo)
- LOPEZ, R.C.; RAMIREZ, R. & GONZALEZ, L.M. 1998. Efecto de la salinidad sobre la fijación de nitrógeno en *Teramnus labialis*. **Pastos y Forrajes**. 21:351
- MACKAY, A.D. & BARBER, S.A. 1985. Effect of soil moisture and phosphate level on root hair growth of corn roots. **Plant and Soil**. 86:321
- MARTINEZ, R. 1986. Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo. Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 166p.
- SICARDI-MALLORCA, M.; BEDMER, E.J.; VINUESA, P. & IZAGUIRRE, M. 1998. Diversidad de rizobios nativos aislados de especies de *Sesbania* en diferentes zonas de Venezuela. Memorias XIX RELAR. Venezuela. p. 180
- TU, J.C. 1981. Effect of salinity in *Rhizobium* root hair interaction, nodulation and growth of soybean. **Can. J. Plant Sci.** 61:231
- ZAHARAN, H. 1991. Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. **Biol. Fertil. Soils**. 12:73

Recibido el 30 de junio de 1999
Aceptado el 30 de marzo del 2000