Selección de cepas aisladas de rizobios, inoculadas en maíz (*Zea mays* L.), en condiciones de campo en ecosistemas ganaderos de Sancti Spíritus, Cuba

C. J. Bécquer, Beatriz Salas, U. Ávila, L. Palmero, J. A. Nápoles, Lisbet Ulloa, Yanet Suárez y Olga L. Colina

Estación Experimental de Pastos y Forrajes, Sancti Spíritus, Apartado Postal 2228, Sancti Spíritus, Cuba
Correo electrónico: pastossp@yayabo.inf.cu

Para seleccionar rizobios inoculados en maíz se realizó un experimento de campo en las condiciones ambientales de Sancti Spíritus, Cuba. Se aplicaron 10 cepas nativas, pertenecientes a *Bradyrhizobium sp*., y tres comerciales de *Sinorhizobium fredii*, *B. lupini* y *Bradyrhizobium sp*. Se evaluó la variedad híbrida de maíz T-66 (*Zea mays*, L). Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente aleatorizados, con 15 tratamientos y cuatro réplicas. Se aplicó el análisis de varianza y las diferencias entre medias, según LSD de Fisher ($P < 0.05$). En peso seco aéreo, todos los tratamientos inoculados presentaron valores estadísticamente superiores al control no inoculado. Los tratamientos inoculados con las cepas nativas JJ4, JJ2, SP6, HA1, HG2, SP20 y TE4, al igual que el inoculado, con las comerciales 25B6 y ATCC 10317, mostraron superíndices comunes con respecto al control fertilizado en peso seco aéreo. Para la longitud del tallo, los 10 tratamientos inoculados resultaron estadísticamente superiores al control absoluto. Excepto los tratamientos inoculados con la cepa nativa SP21 y la comercial 61B7, el resto de los inoculados con el peso de la mazorca fue estadísticamente superior al control absoluto. Se concluye que la inoculación con rizobios igualó los efectos de la fertilización química, aunque este resultado no fue igual en todas las variables, y tampoco para los dos géneros de rizobios aplicados. Se constató que la inoculación favoreció la producción de semillas con respecto a otras variables agroproductivas de la planta. Se recomiendan las cepas JJ4, JJ2, SP6, HA1 y SP20, así como la comercial 25B6 para cultivos de maíz, en condiciones edafoclimáticas similares a las de este experimento, con fertilización química de fondo de 80 kgN/ha.

Palabras clave: *Bradyrhizobium, Sinorhizobium, maíz, inoculación, semillas*.

Antoun *et al*. (1998) consideraron que los rizobios, rizobacterias conocidas comúnmente como organismos que fijan nitrógeno atmosférico en simbiosis con leguminosas, pueden colonizar e influir en el crecimiento de otras familias de plantas. La ciencia ha demostrado el efecto positivo de las bacterias rizosféricas, entre ellas los rizobios, en las gramíneas (Sahin *et al*. 2004, Antoun y Prévost 2005 y Anya *et al*. 2009). Se ha comprobado en trabajos previos (Prévost *et al*. 2000) que la inoculación de plantas de maíz con rizobios, en condiciones controladas, tiene efectos positivos en los indicadoresfisiológicos del vegetal. Chabot *et al*. (1996) plantearon que estas bacterias pueden colonizar también las raíces de plantas no leguminosas e influir, significativamente, en su crecimiento mediante la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal. Rosenblueth y Martínez-Romero (2004) refirieron que *Rhizobium etli* es un endófito natural del maíz, y que *R. tropici*, al ser inoculado, se puede convertir en un endófito competitivo en ese cultivo.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la inoculación de rizobios nativos de ecosistemas ganaderos cubanos y cepas comerciales de rizobios en una variedad cubana de maíz en condiciones de campo, en Sancti Spíritus, Cuba, con el propósito de seleccionar los mejores tratamientos para su aplicación adecuada en la práctica agronómica.

Materiales y Métodos

Para el experimento se utilizaron 10 cepas, confirmadas como rizobios en trabajos anteriores. Desde el punto de vista taxonómico, pertenecen al género *Bradyrhizobium sp*. Se utilizaron además, las comerciales, correspondientes a diferentes géneros y especies de rizobios (tabla 1), donadas por laboratorios de Agriculture and Agri-Food Canada (Québec, Canadá). Se utilizó la variedad híbrida de maíz T-66 (*Zea mays* L.), procedente de la Empresa de Semillas de Sancti Spíritus. Esta variedad respondió a las necesidades de la agricultura en la provincia Sancti Spíritus durante el período en que se realizó el estudio.

Las cepas crecieron en medio sólido levadura-manitol (Vincent 1970) y se suspendieron en medio líquido levadura-manitol hasta lograr concentración celular de 10^6–10^8 UFC/mL. La inoculación se realizó mediante la inmersión de las semillas durante 24 h en el inóculo a temperatura ambiente. Posteriormente se secaron a la sombra para su siembra inmediata. Para el control no inoculado y fertilizado, se utilizó solamente el medio líquido levadura-manitol. La reinoculación de los tratamientos se efectuó a los 20 d de sembrado con el objetivo de asegurar la presencia efectiva de las bacterias en la rizosfera para la colonización radicular. Se utilizó un inóculo bacteriano, que contenía 10^6–10^8 UFC/mL, aproximadamente 10 mL/planta. Se reinoculó con una mochila aspersora, dirigiéndose el surtidor a la base del tallo de la planta. Esta actividad se desarrolló en horas frescas de la mañana para evitar la desecación excesiva del inóculo.

El experimento se sembró en la época seca (enero-marzo de 2005). El área experimental fue la zona centro de la provincia Sancti Spíritus. Durante el experimento,

Tabla 1. Listado de cepas cubanas y de referencia utilizadas en el experimento

Cepas	Género y especie
Nativas	
JJ4	*Bradyrhizobium sp.*
JJ2	*Bradyrhizobium sp.*
SP21	*Bradyrhizobium sp.*
SP6	*Bradyrhizobium sp.*
HA1	*Bradyrhizobium sp.*
HG2	*Bradyrhizobium sp.*
SP20	*Bradyrhizobium sp.*
TE4	*Bradyrhizobium sp.*
SP12	*Bradyrhizobium sp.*
JK1	*Bradyrhizobium sp.*
Comerciales	
ATCC10317	*Bradyrhizobium lupini*
61B7	*Sinorhizobium fredii*
25B6	*Bradyrhizobium sp.*

los datos climáticos de la región mostraron temperaturas que oscilaron entre 20.8 y 23.8 ºC, y entre 27.4 y 30.4 ºC (temperatura máxima promedio). La precipitación acumulada fue de 29.3 mm para enero, febrero y marzo.

El suelo del área experimental correspondió al tipo aluvial (Anon 1979) (2.63 mg/100 g de P_2O_5; 10.00 mg/100 g de K_2O; 1.61 % de materia orgánica y pH de 5.4). Estos datos se corresponden con lo informado por Hernández *et al*. (1999) para este suelo. Se realizó una fertilización de fondo a todos los tratamientos (N: 9, P: 13, K: 17) a los 21 d, con dosis de 80 kg N/ha, donde se incluyó el control no inoculado y el fertilizado. Aunque Mantelin y Touraine (2003) indicaron que los rizobios pueden incrementar el acceso de nutrientes mediante la estimulación del sistema de captación de iones de la planta, se consideraron las características agroquímicas del suelo experimental para hacer la fertilización y estimular el crecimiento de las plantas en todos los tratamientos durante sus primeras fases fenológicas.

La dosis de siembra fue de 10 kg/ha. El marco de siembra fue de 70 cm entre surcos, sembrado a chorrillo espaciado. Cada parcela midió 3 m x 15 m. Se aplicaron cuatro riegos. A los 90 d de siembra se realizó la cosecha de forma manual. Se realizaron labores convencionales de cultivo: roturación, grada, cruce, recruce, grada y surcado.

Se aplicó un diseño experimental de bloques completamente aleatorizados (Somasegaran y Hoben 1970), con 15 tratamientos (13 de ellos inoculados) y cuatro réplicas. Hubo un control no inoculado, y el fertilizado consistió en una aplicación de nitrógeno de 150 kg/ha (NH_4NO_3). Los datos se procesaron estadísticamente, según el análisis de varianza (ANOVA) (StatGraphics Plus, v. 5.1, 1994-2001, Statistical Graphics Corporation). Las diferencias entre medias se determinaron por la prueba LSD (Least Significant Difference) de Fisher ($P < 0.05$). Los datos de la variable con conteo de dígitos (número de mazorcas/planta) se transformaron por $\sqrt{x}$ (Lerch 1977). Se evaluaron las siguientes variables agroproductivas: peso seco aéreo (PSA, g/parcela), longitud del tallo (LT, cm), número de mazorcas/planta (NM) y peso de las mazorcas (PM, kg/mazorca), así como el incremento del PSA con respecto al control absoluto (%).

Resultados y Discusión

En la variable peso seco aéreo (tabla 2), los tratamientos inoculados presentaron valores estadísticamente superiores ($P < 0,05$) al control no inoculado. Esto representó en los tratamientos más sobresalientes incremento de 43.75 % (JJ4), 41.67 % (JJ2 y SP20, respectivamente) y 45.83 % (25B6) con respecto al control. Estos resultados superan los obtenidos por Bécquer *et al*. (2008) en experimentos de invernadero con maíz (variedad local Canadiense 2338 F15), donde se aplicaron tratamientos inoculados con cepas del mismo género que las de este experimento (Bradyrhizobium), aisladas de ecosistemas ganaderos de Cuba. Este dato indica que el genotipo vegetal puede influir en el aprovechamiento del potencial estimulador del crecimiento vegetal de los rizobios. Estos resultados también superaron los referidos por Antoun y Prévost (2000), con la cepa P31 de *Rhizobium leguminosarum*, al inocularse en maíz. Además, son comparables con los de Hafeez *et al*. (2004), al inocular plantas de algodón con cepas de *Rhizobium leguminosarum*, bv. trifolii. Aunque la familia vegetal es diferente, el *Zea mays*, al igual que el cultivo antes mencionado, no puede aprovechar las bondades de la fijación simbiótica del nitrógeno,

por no disponer de las bases genéticas-bioquímicas necesarias para la formación de nódulos radicales. Por tanto, los resultados se deben basar, principalmente, en el efecto promotor del crecimiento vegetal de las cepas aplicadas, que puede variar de acuerdo con el género de rizobio utilizado. Según Salantur *et al*. (2006) y Matiru y Dakora (2006), el aumento del rendimiento mediante la utilización de bacterias asociativas requiere de las combinaciones más correctas entre los genotipos vegetales y cepas específicas.

En el peso seco aéreo, los tratamientos inoculados con las cepas nativas JJ4 (0.69 kg/parcela), JJ2 (0.68 kg/parcela), SP6 (0.62 kg/parcela), HA1 y HG2 (0.64 kg/parcela, cada uno), SP20 (0.68 kg/parcela), TE4 (0.61 kg/parcela) y el tratamiento inoculado con las comerciales 25B6 (0.70 kg/parcela) y ATCC 10317 (0.62 kg/parcela) mostraron superíndices comunes con respecto al control fertilizado. Esto sugiere que la inoculación con rizobios puede igualar los efectos producidos por la fertilización química en este tipo de cultivo (tabla 2).

En la variable longitud del tallo (tabla 3), aunque 10 tratamientos inoculados fueron estadísticamente superiores ($P < 0.05$) al control no inoculado (1.75 cm), solo el inoculado con la cepa nativa SP20 (2.09 cm) resultó estadísticamente superior al control fertilizado. Según Dobbelaere *et al*. (2003), los rizobios, entre otros diazotrofos, producen vitaminas hidrosolubles del grupo B. Este es también un factor que estimula el crecimiento de las plantas, específicamente la longitud del tallo, la producción de materia seca y la capacidad de absorción de nutrientes. Casán *et al*. (2009) observaron que una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* produjo cantidades significativas de ácido giberélico, factor promotor del crecimiento del tallo en las plantas.

En el número de mazorcas (tabla 3) no hubo valores con diferencias significativas, quizás debido a la gran influencia de la variedad vegetal. Sin embargo, en el peso de las mazorcas, excepto en los tratamientos inoculados con la cepa nativa SP21 (1.06 kg/mazorca) y la comercial 61B7 (0.96 kg/mazorca), el resto de los tratamientos inoculados fue estadísticamente superior ($P < 0.05$) al control no inoculado. No hubo tratamientos superiores o con superíndices comunes al control fertilizado. En esta variable hubo algunos tratamientos que presentaron altos valores con la inoculación, pero no en el peso seco aéreo. Esto se puede deber a que los rizobios tienen la facultad de cambiar la estructura radicular de la planta, lo que provoca mejor absorción de nutrientes. Por tanto, se favorece directamente la producción de semillas con respecto a otros procesos fisiológicos (Biswas *et al*. 2000). Según Mia y Samsuddin (2010), la inoculación con rizobios produjo incremento de 16 % en el rendimiento de grano en las diferentes variedades de arroz.

El efecto de algunas cepas en estas variables agronómicas de la planta pudiera estar relacionado directamente con el tipo de suelo experimental. En trabajos de Hilali *et al*. (2001) se obtuvieron resultados positivos de cepas de *Rhizobium leguminosarum* en trigo, en un suelo aluvial de Marruecos. Estas mismas mostraron efectos desfavorables en las plantas, al ser aplicadas en un suelo arcilloso. En este estudio, en el suelo utilizado, deficitario en P_2O_5 y materia orgánica,

Tabla 2. Peso seco aéreo y su incremento con respecto al testigo en maíz inoculado con rizobios procedentes de ecosistemas ganaderos de Sancti Spíritus, Cuba y con cepas comerciales de rizobios

Tratamientos	PSA (kg/parcela)	Incremento en el PSA con respecto al testigo, %
JJ4	0.69^{ab}	143.75
JJ2	0.68^{ab}	141.67
SP21	0.51^{ef}	106.25
SP6	0.62^{abc}	129.17
HA1	0.64^{abc}	133.33
HG2	0.64^{abc}	133.33
25B6	0.70^{a}	145.83
SP20	0.68^{ab}	141.67
TE4	0.61^{abcd}	127.08
SP12	0.52^{def}	108.33
ATCC10317	0.62^{abc}	129.17
JK1	0.57^{cdef}	118.50
61B7	0.59^{bcde}	122.92
Control no inoculado	0.48^{f}	
Control Fertilizado	0.70^{a}	

DE. Desviación estándar. DE. 0.085 $P < 0.05$

Tabla 3. Longitud del tallo, número de mazorcas y peso de las mazorcas en maíz inoculado con rizobios procedentes de ecosistemas ganaderos de Sancti Spíritus, Cuba, y con cepas comerciales de rizobios

Tratamientos	Longitud del tallo (m)	Número de mazorcas / planta[1]	Peso de las mazorcas (kg/mazorca)
JJ4	1.84[def]	2.6 (7)	1.32[cde]
JJ2	1.81[efg]	2.6 (7)	1.33[bcd]
SP21	1.91[bcd]	2.5 (6)	1.06[gh]
SP6	1.93[bc]	2.6 (7)	1.42[bc]
HA1	1.90[cd]	2.6 (7)	1.41[bc]
HG2	1.90[cd]	2.5 (6)	1.23[def]
25B6	1.96[bc]	2.6 (7)	1.38[bc]
SP20	2.09a	2.6 (7)	1.44[bc]
TE4	1.77[fg]	2.5 (6)	1.16[fg]
SP12	1.90[cd]	2.5 (6)	1.46[b]
ATCC10317	1.89[cde]	2.2 (5)	1.21[def]
JK1	1.78[fg]	2.5 (6)	1.19[efg]
61B7	1.92[bcd]	2.5 (6)	0.96[h]
Control no inoculado	1.75[g]	2.6 (7)	0.95[h]
Control Fertilizado	1.99[b]	2.5 (6)	1.62[a]

DE. Desviación estándar.
DE. 0.097 $P < 0.05$
[1] Datos transformados: √x. D.E. 0.065 $P \geq 0.10$
DE. 0.199 $P < 0.05$

se realizó fertilización de fondo con fórmula completa, donde se evitaron errores experimentales con dosis moderada de nitrógeno (80 kg N/ha), ya que la presencia de fertilizantes nitrogenados en cantidades excesivas puede afectar la supervivencia de determinadas bacterias rizosféricas en el suelo (Mehnaz *et al*. 2010). También existen informes de que en experimentos con leguminosas los tratamientos combinados de rizobios con fertilización química nitrogenada (60 kg N/ha) mostraron los mayores rendimientos (Provorov *et al*. 1998).

Se conoce que el proceso simbiótico es muy sensible a la aplicación de nitrógeno inorgánico, ya que se inhibe la nitrogenasa en la zona radical (Martínez-Viera 1986). Sin embargo, los procesos asimbióticos que se forman con la inoculación de maíz, planta perteneciente a la familia Gramineae, no tienen esta limitación, ya que el mayor efecto que se espera de los rizobios en la planta no depende de la enzima nitrogenasa, sino de la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal (Matiru y Dakora 2006).

Según Biswas *et al*. (2000), en experimentos con arroz inoculado con diferentes géneros de rizobios, los tratamientos inoculados y con una dosis alta de N mostraron valores más altos. Por tanto, estos autores sugieren interdependencia entre la inoculación y la fertilización nitrogenada, condicionada quizás por el mayor desarrollo radical provocado por los rizobios, independiente de la fijación de dinitrógeno. A partir de estos informes, los resultados de este experimento y los precedentes se pueden considerar similares. No obstante, este tema requiere mayor profundización en estudios futuros.

Se concluye que la inoculación con rizobios igualó los efectos producidos por la fertilización química, aunque este resultado no se comportó igual en todas las variables ni para los dos géneros de rizobios aplicados. En estos casos, *Sinorhizobium fredii* (cepa 61B7) no se destacó en ninguna de las variables estudiadas, pero sí el género Bradyrhizobium, especialmente las cepas nativas JJ4, JJ2, SP6, HA1, SP20 y la comercial 25B6. También se constató en el peso de las mazorcas. Generalmente, la inoculación favoreció la producción de semillas con respecto a otras variables agroproductivas de la planta.

Se recomienda aplicar las cepas nativas JJ4, JJ2, SP6, HA1 y SP20, además de la comercial 25B6, en cultivos de maíz en condiciones edafoclimáticas análogas a las de este experimento, con fertilización química de fondo de 80 kg N/ha. Además, se sugieren ensayos de campo en otras localidades, con diferentes tipos de suelo y variedades de maíz, para comprobar con mayor precisión la efectividad de las cepas seleccionadas.

Referencias

Anon 1979. Clasificación genética de los suelos de Cuba. Academia de Ciencias de Cuba. Instituto de Suelos. La Habana, Cuba

Antoun, H., Beauchamp, C.J., Goussard, N., Chabot, R. & Lalande, R. 1998. Potential of Rhizobium and

*Bradyrhizobium sp*ecies as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Rhaphanus sativus* L.) Plant and Soil. 204:57

Antoun, H. & Prévost, D. 2000. PGPR activity of Rhizobium with nonleguminous plants. Proc. 5th International PGPR. Workshop, Villa Carlos Paz, Cordoba, Argentina. Pp. 62-69

Antoun, H. & Prévost, D. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. En: PGPR biocontrol and biofertilization. Ed. Siddiqui, Z. A. Pp. 1-34

Anya, A.O., Archambault, D.J., Bécquer, C.J. & Slaski, J.J. 2009. Plant growth-promoting diazotrophs and productivity of wheat on the Canadian prairies. En: Microbial strategies for crop improvement. Eds. M. S. Khan. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Chapter 4. Pp. 287-300

Bécquer, C.J., Salas, B., Archambault, D., Slaski, J. & Anya, A. 2008. Selección de cepas de rizobios aislados de ecosistemas ganaderos de Sancti Spíritus, Cuba, inoculados en maíz (*Zea mays*, L.). Fase I. Ensayo de invernadero. Pastos y Forrajes. 31: 229

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

Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C. & Luna, V. 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). European J. of Soil Biol. 45: 28

Chabot, R., Antoun, H., Kloepper, J. W. & Beauchamp, C. 1996. Root colonization of maize and lettuce by bioluminoscent *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. Appl. Environ. Microbiol. 62:2767

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. & Okon, Y. 2003. Plant Growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Critical Rev. Plant Sci. 22: 107

Hafeez, F., Safdar, Y.M.E., Chaudhry, A.U. & Malik, K.A. 2004. Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. Australian J. Experimental Agric. 44:617

Hernández, A., Jiménez, J.M., Bosch, D. & Rivero, L. 1999. Nueva revisión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. 23 pp.

Hilali, A., Prévost, D., Broughton, W.J. & Antoun, H. 2001. Effets 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

Lerch, G. 1977. La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Ed. Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 452 pp.

Mantelin, S. & Touraine, B. 2003. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: Impacts on root development and nitrate uptake. J. Experimental Botany. 55:27

Martínez-Viera, R. 1986. Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo. Ed. Científico-Técnica. 167 pp.

Matiru, V. & Dakora, F. 2006. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. African J. Biotecnol. 3:17.

Mehnaz, S., Kowalik, T., Reynolds, B. & Lazarovits, G. 2010. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. Soil Biol. & Biochem. 42: 148

Mia, M.A.B. & Shamsuddin, Z.H. 2010. Rhizobium as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production. African J. Biotechnol. 37: 6001

Prévost, D., Saddiki, S. & Antoun, H. 2000. Growth and mineral nutrition of corn inoculated with effective strains of *Bradyrhizobium japonicum*. Proc. 5th International PGPR Workshop. Villa Carlos Paz, Córdoba. Argentina

Provorov, N. A., Saimnazarov, U.B., Bahromov, I.U., Pulatova, D.Z., Kozhemyakov, A.P. & Kurbanov, G.A. 1998. Effect of rhizobia inoculation on the seed (herbage) production of mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) grown at Uzbekistan. J. Arid Enviromments 39: 569

Rosenblueth, M. & Martínez-Romero, E. 2004. *Rhizobium etli* maize populations and theircompetitiveness for root colonization. J. Arch. Microbiol. 181: 337.

Salantur, A., Ozturk, A. & Akten, S. 2006. Growth and yield response of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to inoculation with rhizobacteria. Plant. Soil Environ. 52: 111

Sahin, F., Cakmakci, R. & Kantar, F. 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N2-fixing and phosphate solubilizing bacteria. Plant and Soil. 265:123

Somasegaran, P. & Hoben, H.J. 1994. Handbook for rhizobia. Springer-Verlag, New York. 450 pp.

Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodules bacteria. Blackwell Sci. Publications Oxford and Edinburgh. 164 pp.

Recibido: 2 de julio de 2011