Comunicación corta

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE RIZOBIOS PROCEDENTES DE ESPECIES DE *VIGNAS.*

Marisel Ortega García, Tomás Shagarodsky Scull, Yoania Rios Rocafull y Bernardo Dibut Álvarez.

RESUMEN

El nitrógeno tiene gran importancia para el adecuado desarrollo de los cultivos, por lo que aislar y seleccionar rizobios con potencialidades de asociarse con plantas leguminosas, que induzcan la nodulación y sean capaces de fijar el nitrógeno, constituye un beneficio para el sector agrícola. De la interacción con estas especies de leguminosas se aislaron microorganismos distribuidos de la siguiente forma, de *V. unguiculata (L*.) Walp. 59 aislados de ellos solo 24 se correspondieron con las características de rizobios, de *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi y Ohashi 10 aislados, de ellos cuatro son rizobios, de *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek 12 aislados, de ellos siete de rizobios y de *Vigna umbellata* (Thunb) Ohwi y Ohashi 20 aislados, seis de rizobios, de (*Vigna mungo* (L.) Hepper, cinco aislados y dos de ellos rizobios. El mayor porcentaje de aislados se correspondió con los cultivares de *V. unguiculata* (L.) Walp.), de la que se obtuvieron 24 nuevos aislados para su estudio. De todas las especies de *Vignas* se logró purificar un número de 106 bacterias simbióticas procedentes de los nódulos de los cultivares anteriormente mencionados para ser identificadas, de ellas solamente 43 coinciden con las características descritas para los rizobios. Las mismas serán incorporadas a la Colección de Bacterias del INIFAT para su posterior estudio, ya que pudieran ser inoculantes potenciales para favorecer el desarrollo de estos cultivares.

Palabras clave: nodulación, leguminosas, cultivares

Isolation and selection of rizobios from diverse species of Vignas.

ABSTRACT

Nitrogen is of great importance for the proper development of crops, so isolating and selecting rhizobia with the potential to associate with leguminous plants that induce nodulation and be able to fix nitrogen is a benefit for the agricultural sector. From the interaction with these legume species, microorganisms distributed as follows were isolated. of *V. unguiculata* (L.) Walp.) 59 isolated of them only 24 corresponded with the characteristics of rhizobia, of *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi 10 isolates, of which four are rhizobia, of *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek 12 isolates, of them seven of rhizobia and of *Vigna umbellata* (Thunb) Ohwi & Ohashi 20 isolates, six of rhizobia, of (*Vigna mungo* (L.) Hepper, five isolated and two of them rhizobia. The highest percentage of isolates corresponded to cultivars of *V. unguiculata* (L.) Walp. From which 24 new isolates were obtained for their study. From all the *Vignas* species, a number of 106 symbiotic bacteria originating from the nodules of the

---

Ing. Marisel Ortega García, especialista en Biofertilizantes del Departamento Recursos Genéticos Microbianos y Productos Bioactivos del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT). Calle 188 No. 38754 e/ 397 y Linderos, Santiago de la Vegas, Boyeros, Cuba. E-mail: subdircientifica@inifat.co.cu

before mentioned cultivars were purified to be identified, of which only 43 coincide with the characteristics described for the rhizobia. These will be incorporated into the INIFAT Bacteria Collection for further study and could be potential inoculants to favor the development of these cultivars.

Key words: nodulation, leguminous, cultivars

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza el proceso de fijación biológica de nitrógeno resulta esencial para el adecuado desarrollo de los ecosistemas, donde los microorganismos son los encargados, mediante la enzima nitrogenasa de transformar el nitrógeno gaseoso en combinado (Bhattacharyya *et al*., 2016). Los rizobios son responsables del 80 % de la fijación biológica del nitrógeno, lo que posibilita la disminución del uso de fertilizantes sintéticos como la urea (Bashan *et al.,* 2014).

Por esta razón, el desarrollo de nuevas biotecnologías que incluyan el estudio de microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico, de vida libre o simbiótica como los pertenecientes a Rhizobium, que se asocian con leguminosas y contribuyen a fijar entre el 33 y el 50 % del nitrógeno basado en el intercambio de carbono por este elemento entre ambos simbiontes, constituye una alternativa factible para la agricultura (Bruning y Rozema, 2013).

En sentido general, este grupo de microorganismos se caracterizan por promover en las plantas leguminosas la formación de nódulos, algunos con un mayor rango de plantas huéspedes que otros, aunque con diversos problemas de aproximación. Este y otros factores que influyen en este proceso, son el hecho de que existen aproximadamente 18 000 especies leguminosas e indeterminados tipos de rizobios. La especificidad entre bacterias y plantas es un fenómeno que hoy día casi ha desaparecido, lo que se expresa claramente en los rizobios aislados de diversos cultivares de *Vignas*, ya que son capaces de nodular a otras especies de plantas leguminosas (Granda *et al*., 2014).

Para garantizar que se produzca la simbiosis entre el microorganismo y la planta se requiere de garantizar un ambiente adecuado, en el cual sería una práctica a implementar la selección de cepas nativas con alta capacidad de competencia, en lugar de incorporar otras aisladas de otros ecosistemas, ya que no tendrían necesidad de competir entre ellas y estarían mucho más adaptadas a las condiciones del ecosistema (Korir *et al*., 2017).

El objetivo principal de este estudio consistió en evaluar la diversidad de las cepas de rizobios aisladas de diferentes cultivares de *Vigna*s, entre las que se utilizaron cultivares promisorios de la colección de especies del género, a saber: (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi y Ohashi, *Vigna mungo* (L.) Hepper, *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek, *Vigna umbellata* (Thunb) Ohwi y Ohashi y *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron diferentes leguminosas pertenecientes a las colecciones del INIFAT correspondientes a cultivares de Frijol Adzuki (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi, Frijol diablito o mambí (*Vigna umbellata* (Thunb) Ohwi & Ohashi, de frijol urd (*Vigna mungo* (L.) Hepper, de frijol caupí (Vigna *unguiculata*), *Vigna umbellata* y de Frijol chino (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. De las mismas se recolectaron de forma aleatoria las raíces con nódulos, los cuales se lavaron y se les verificó macroscópicamente la

actividad de la nitrogenasa, se consideraron positivas al presentar en su interior una coloración rojiza, lo que indica la producción de leghemoglobina.

Posteriormente los nódulos que resultaron positivos se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5 % y se lavaron dos veces con agua destilada estéril, se maceraron en un tubo de ensayo que contenía agua destilada estéril con la ayuda de una varilla de vidrio.

Posteriormente, se sembraron en placas Petri con medio de cultivo LMA (Levadura-Manitol-Agar) con la adición de rojo congo (LMA-RC), a razón de 10,0 mL/L de medio (pH 7). Se agregó además 1,5 $g.L^{-1}$ de extracto de levadura, 10,0 $g.L^{-1}$ de manitol, 0,20 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4$, 0,50 $g.L^{-1}$ de K_2HPO_4, 0,1 $g.L^{-1}$ NaCl, 1,0 $mL.L^{-1}$ de $FeCl_3$ y $g.L^{-1}$ de agar (Vincent, 1970).

Las placas se incubaron a 28 ºC durante 10 días, realizando observaciones diarias para descartar los contaminantes. A partir de esta siembra, se seleccionaron las colonias crecidas que no absorbieron el Rojo Congo, las que se replicaron hasta obtener cultivos uniformes y libres de impurezas.

Además, se evaluó el crecimiento de los aislados en medio con Bromotimol azul para evaluar la producción de ácidos o bases. Se valoró también la producción de 3- Ketolactosa en medio LLA (Levadura Lactosa Agar), al añadir 15 mL de reactivo de Benedict sobre las colonias durante 10 min. Se determinó la presencia de *Agrobacterium sp* mediante la formación de color amarillo.

A los aislados seleccionados se les evaluó de forma cualitativa su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, según la metodología propuesta por Elbeltagy *et al.* (2001) y citada por Pérez *et al.* (2014), que se basa en el crecimiento del microorganismo en un medio selectivo carente de nitrógeno. Se utilizó como medio de cultivo 5,0 mL de LMA semisólido (sin Extracto de Levadura y con 2,0 $g.L^{-1}$ de agar bacteriológico), en tubos de ensayo, el que se inoculó por punción.

El crecimiento microbiano se midió a partir de la turbidez que presentó el medio de cultivo a los 5 días de incubación y se consideró positiva la prueba al presentarse crecimiento durante tres inoculaciones consecutivas.

A los aislados seleccionados se les evaluó velocidad de crecimiento en medio LMA-RC y se estimó como tiempo máximo de incubación 15 días. Otro de los aspectos que se valoró fue la producción de acidez o alcalinidad en medio LMA con indicador azul de bromotimol.

A todos los cultivares estudiados de las diferentes especies de *Vignas* se les evaluó el numero de nódulos totales y efectivos por planta y además se cuantificaron los aislados obtenidos y los pertenecientes al género *Rhizobium*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra el número de aislados totales correspondientes a los cinco cultivares de *Vignas* y de ellos, los que se corresponden por sus características con la familia rizobios.

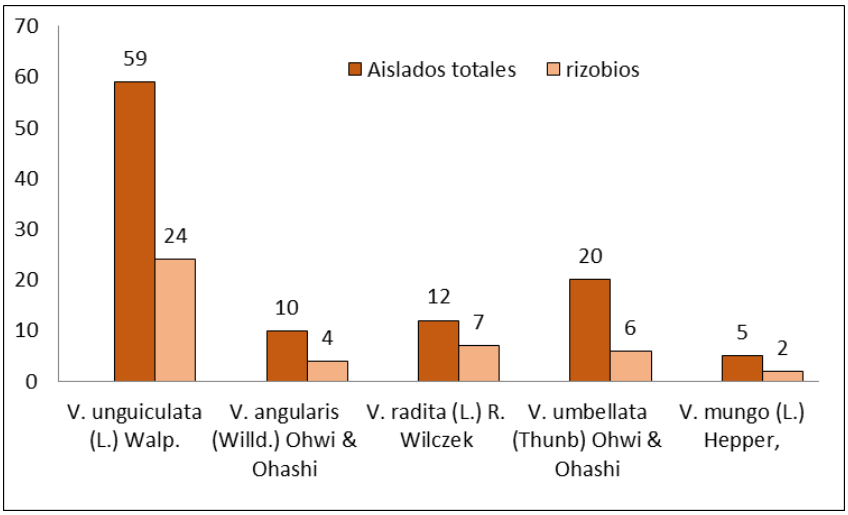


Figura 1. Número de aislados totales y de rizobios.

De estas especies de leguminosas se lograron aislar microorganismos distribuidos de la siguiente forma, de *V. unguiculata* (L.) Walp.) 59 aislados, que represan el mayor porcentaje de aislados, de ellos solo 24 se correspondieron con las características de rizobios, de *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi y Ohashi 10 aislados, de ellos cuatro son rizobios, de *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek 12 aislados, de ellos siete de rizobios, de *Vigna umbellata* (Thunb) Ohwi y Ohashi 20 aislados, de ellos seis de rizobios y de *Vigna mungo* (L.) Hepper, cinco aislados y dos de ellos rizobios.

De todas las especies de *Vignas* se lograron purificar un número de 106 bacterias simbióticas procedentes de los nódulos de los cultivares anteriormente mencionados para ser identificadas, de ellas solamente 43 coinciden con las características descritas para los rizobios.

Las mismas serán incorporadas a la Colección de Bacterias del INIFAT para su posterior estudio y pudieran ser inoculantes potenciales para favorecer el desarrollo de estos cultivares.

En cuanto a la capacidad en el proceso de FBN, la asociación de los rizobios se considera del tipo simbiótica y ocurre entre ellos y las plantas leguminosas (Figura 2). Los mismos son capaces de fijar nitrógeno de la atmósfera en forma de amonio, para que pueda ser absorbido por las plantas, por lo que son responsables de contribuir con la mayor cantidad de nitrógeno fijado en especies agrícolas (Casa, 2014).

Los aislados estudiados mostraron disímiles características en cuanto al tiempo de crecimiento, tamaño de las colonias, forma, textura y color, en medio de cultivo LMA con rojo congo, de ellas se muestran que solamente 43 pertenecen a rizobios (Figura 3).

De estos aislados mostraron crecimiento rápido entre dos y cinco días un total de 14 aislados, los que coinciden con los que acidificaron el medio de cultivo LMA, las que a su vez mostraron colonias gomosas, suaves y translucidas.

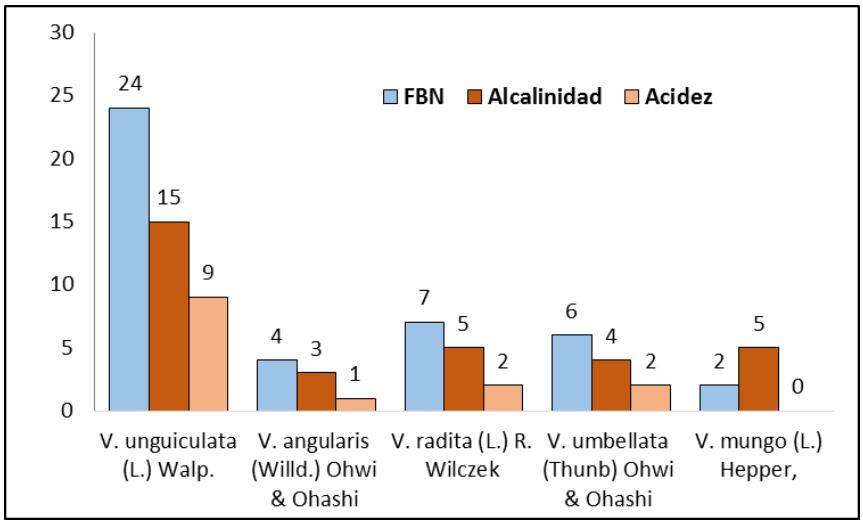


Figura 2. Evaluación de número de aislados por cultivo en cuanto a la fijación biológica de nitrógeno (FBN), presencia de álcalis y acidez.

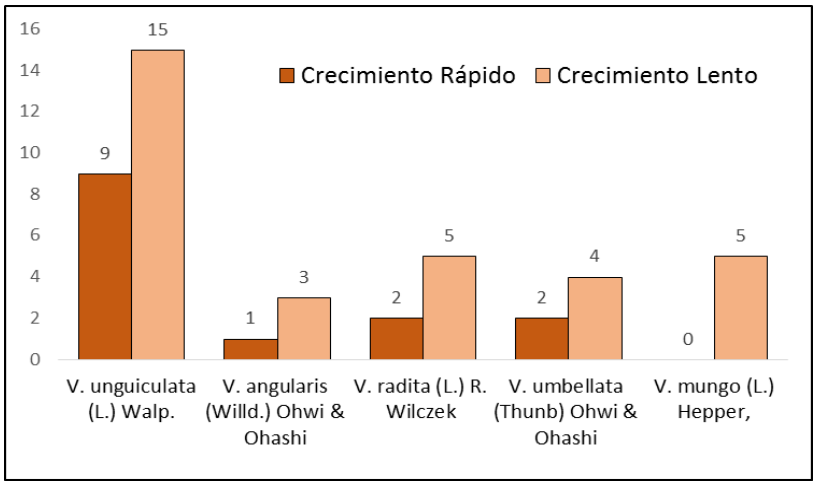


Figura 3. Número de rizobios divididos en dos grupos por su tipo de crecimiento (lento y rápido).

De los 43 aislados seleccionados como rizobios, el 30 % se corresponden con crecimiento rápido y el 70 % con lento crecimiento, por lo que se puede afirmar que la mayoría de los aislados obtenidos de las diferentes especies de *Vignas* estudiadas predominan los aislados de lento crecimiento. Los resultados obtenidos muestran similitud a los reportados por otros investigadores (Fentahun *et al*., 2013 y Alcocer y López, 2017), donde exponen que algunas de las colonias muestran rápido crecimiento entre dos a tres días y que se describen como de color blanco o ligeramente rosado y colonias circulares, convexas, lisas y de aspecto translucido, por lo que pueden afirmar su pertenencia al género *Rhizobium.*

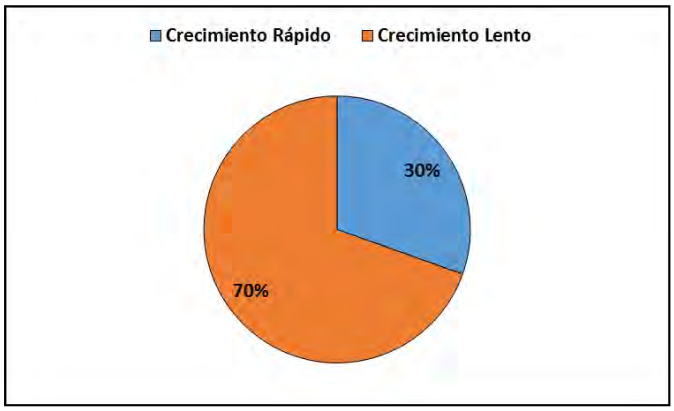


Figura 4. Porcentaje de aislados de rizobios de acuerdo a sus tipos de crecimiento.

Estas características permiten definir a todos los aislados como rizobios; no obstante se necesita, realizar una caracterización de estos microorganismos y a su vez estudiar su asociación con plantas para definir el género de las mismas. Estos aislados muestran que son bacterias Gram negativas, fijadoras de nitrógeno y forman nódulos en la planta anfitrión, lo que las ubica dentro de la clase Alpha Rizobiales.

Estos resultados concuerdan con investigaciones realizadas en el trópico por Saldaña (2017), que explica la necesidad de buscar diversidad de especies rizobianas capaces de formar nódulos en diferentes especies de leguminosas. Estas especies constituyen un significativo depósito de genes que influyen en el proceso de fijación biológica del nitrógeno.

CONCLUSIONES

- Se cuantificaron rizobios por especies de vignas de ellos 24 de *V. unguiculata* (L.) Walp, cuatro de *V. angularis* (Willd.) Ohwi y Ohashi, siete de *V. radita* (L.) R. Wilczek, seis de *V. umbellata* (Thunb) Ohwi y Ohashi, y dos de *V. mungo* (L.) Hepper.
- El mayor porcentaje de aislados se correspondió con los cultivares de *V. unguiculata* (L.) Walp. de la que se obtuvieron 24 nuevos aislados para su estudio.
- De los 43 aislados de rizobios el 30 % presentan crecimiento rápido y el 70 % de lento crecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcocer, J.J. y López, I.R. (2017). Caracterización Morfológica y Bioquímica de Cepas de *Rhizobium* Colectadas en Frijol Común Silvestre y Domesticado. Rev. Fitotec. Mex., 40(1): 73 – 81. ISSN 0187-7380.

Bashan, Y.; de-Bashan, L.E.; Prabhu, S.R. y Hernández, J.P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). Paises Bajos. Plant Soil, 378 (1-2): 1-33. ISSN 1573-5036.

Bhattacharyya, P.N.; Goswami, M.P. y Bhattacharyya, L.H. (2016). Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: A review. Journal of Phytology, 8: 26-41. ISSN 2075-6240.

Bruning, B. y Rozema, J. (2013). Symbiotic nitrogen fixation in legumes: Perspectives

for saline agriculture. Env. Exp. Bot., 92: 134 - 143.

Casa, B. (2014). Evaluación de La fijación de nitrógeno de cepas de *Rhizobium spp.* en invernadero, para arveja (*Pisum sativum*), chocho (*Lupinus mutabilis*), fríjol (*Phaseolus vulgaris*), haba (*Vicia faba*) y vicia (*Vicia sp*.), Pichincha. Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central del Ecuador UCE., 208 p.

Fentahun, M.; Akhtar, M.S.; Muleta, D. y Lemessa, F. (2013). Isolation and characterization of nitrogen deficit Rhizobium isolates and their effect on growth of haricot bean. African Journal of Agricultural, 8 (46): 5942-5952. ISSN: 1991-637.

Granda, M.K.; Ochoa, M.; Ruilova, V.; Guamán, F. y Torres, R. (2014). Evaluación de cepas nativas de *Rhizobium* sobre parámetros fenotípicos en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Centro de Biotecnología, 3: 25-37. E- ISSN 2588-0853.

Korir, H.; Mungai, M.W.; Thuita, M.; Hamba, Y. y Masso, C. (2017). Co-inoculation effect of Rhizobia and plant growth promoting Rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil. Plant Sci., 7 (8): 141. doi: 10.3389/fpls.2017.00141. Collection 2017.

Pérez, A.; Tuberquia, A. y Amell, D. (2014). Actividad *in vitro* de bacterias endófitas fijadores de nitrógeno y solubilizadores de fosfato. Agron. Mesoam., 25(2): 213-223. ISSN 2215-3608. DOI: http://dx.doi.org/.

Saldaña, J.M. (2017). Aislamiento e Identificación de cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* de suelo de la Presa de la Juventud de Marín, Nuevo León. Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa, 4 (7): 1-22. ISSN 2007 – 8412.

Vincent, J.M. (1970). A Manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook No.15. International Biological Pro-gramme. Blackwell Scientific, Oxford-Edinburgh, 164 p.

Fecha de recepción: 6 junio 2019

Fecha de aceptación: 4 noviembre 2019

Agrotecnia de Cuba
ISSN impresa: 0568-3114
ISSN digital: 2414- 4673
http:www.ausuc.co.cu