



Revista Cubana de Ciencia Agrícola

ISSN: 0034-7485

rcca@ica.co.cu

Instituto de Ciencia Animal
Cuba

Sosa, Areadne; Bocourt, R.; Sarmiento, Mariela; Noda, Aida
Evaluación del método de conservación de rizobios en sílica gel en cepas nativas aisladas de
leguminosas rastreñas
Revista Cubana de Ciencia Agrícola, vol. 38, núm. 4, 2004, pp. 443-447
Instituto de Ciencia Animal
La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193017793017>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

Evaluación del método de conservación de rizobios en sílica gel en cepas nativas aisladas de leguminosas rastreras

Areadne Sosa, R. Bocourt, Mariela Sarmiento, y Aida Noda

Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, La Habana.

Correo electrónico: asosa@ica.co.cu

Para evaluar el método de conservación de rizobios en sílica gel, se seleccionaron nueve cepas, según diseño completamente aleatorizado y se conservaron en perlas de sílica gel a 4 °C, siete de ellas aisladas de los nódulos de la leguminosa rastrera *Clitoria ternatea* L. y dos, de *Neonotonia wightii* Lackey. Al año de conservadas, se les determinaron sus características micromorfológicas y culturales, la producción de ácido o álcali y, en un segundo experimento, el efecto de su inoculación en plantas de *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. Para este último, las semillas se seleccionaron al azar y se realizaron cinco repeticiones por tratamiento. Los resultados evidencian que todas las cepas crecieron favorablemente al pasarlas a medio líquido, según la tasa de crecimiento que mostraron antes de su conservación por este método. Las características culturales y morfológicas de las bacterias, así como la producción de ácido o álcali, se correspondieron con los rasgos observados originalmente. Se demostró que ocho de las cepas, a las cuatro semanas de la inoculación, incrementaron de 1.7 a 7 veces la longitud de la raíz y de 2.2 a 7 veces la de la parte aérea. Se concluye que el método de conservación evaluado evitó realizar los subcultivos frecuentes (cada tres meses). Las cepas estudiadas, después de su conservación por período de un año en sílica gel, mantuvieron sus características culturales y micromorfológicas, su capacidad para producir ácido o álcali, además de que la mayoría ejerció un efecto positivo en las leguminosas seleccionadas, aún a las cuatro semanas de ser inoculadas en las plantas. Se recomiendan estudios de viabilidad de las bacterias, así como observar las plantas durante más tiempo, para evaluar la nodulación.

Palabras clave: *rizobios, conservación, fijación de nitrógeno, sílica gel.*

La fijación de nitrógeno por el sistema rizobio-leguminosa ha desempeñado un papel importante en la agricultura moderna. En las últimas décadas se han realizado numerosos estudios, tanto en leguminosas de grano como en las forrajeras. Estos comprenden el aislamiento y selección de cepas, su caracterización fisiológica y bioquímica, la evaluación en cuanto a la tolerancia a la salinidad, así como estudios de diversidad genética y determinación taxonómica (Bécquer *et al.* 2000, García 2000, López 2001, Bécquer *et al.* 2002 y Vance 2002). Para realizar estas investigaciones y producir inoculantes, se necesita un banco de cepas que permita disponer de ellas inmediatamente.

Específicamente para los rizobios, existen varios métodos de conservación de cultivos.

Uno de los más utilizados es la conservación en cuñas de medio Levadura-Manitol Agar a 4 °C (Vincent 1970). En este, la cepa se guarda como cultivo activo en el medio que ha crecido, de esta forma puede conservarse en el refrigerador de 4 a 6 °C, solo durante dos o tres meses, lo que representa una labor considerable. Además, esta vía no es muy confiable, pues el cultivo tiene más posibilidades de contaminarse, pueden secarse el medio y el microorganismo, producto de los pasos sucesivos, además puede perder alguna de sus propiedades, incluso, la capacidad para formar nódulos efectivos. Hay otros métodos como la liofilización y criopreservación, ambos mantienen la viabilidad por un largo período (años), sin que las cepas pierdan sus propiedades, pero requieren una ardua labor inicial y un equipamiento

especializado y costoso (García y Uruburu 2003).

Otro método es la conservación en perlas de porcelana (Vincent 1970 y Beck *et al.* 1993), el cual permite mantener las bacterias viables por un período mayor de tiempo (tres años), sin ser transferidas regularmente, ya que la baja humedad relativa reduce a un mínimo la tasa de crecimiento de los rizobios y extiende la vida del cultivo. Además de garantizar una mayor estabilidad de las cepas, este método ahorra medios de cultivos y facilita el trabajo cuando se cuenta con un gran número de cepas, aspecto que es muy común en los estudios de bacterias que van a utilizarse como biofertilizantes. Sin embargo, cepas específicas pueden tener un comportamiento diferente en las perlas, por lo que debe probarse la habilidad de cada cepa para sobrevivir en las perlas, antes de almacenarlas por este método (Beck *et al.* 1993).

Por esto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del método de conservación de rizobios en sílica gel en cepas nativas aisladas de leguminosas rastreras. De esta forma, podrá contarse con una fuente confiable de microorganismos que sirvan para cualquier trabajo de investigación o para la producción de biofertilizantes.

Materiales y Métodos

Se seleccionaron al azar las cepas de rizobios AM123, AM13, AM14, AM15, AM4, AM511 y AM52, aisladas de los nódulos de la leguminosa rastrera Conchita azul (*Clitoria ternatea* L.), y las cepas GM11 y GM13, aisladas de glicine (*Neonotonia wightii* Lackey), recolectadas en suelo del municipio Mayarí, en la provincia de Holguín, de clasificación ferrítico rojo oscuro típico (Hernández *et al.* 1999), correspondiente a la serie ferralsols, según clasificación de la FAO-UNESCO. Las cepas permanecieron en cuñas de medio Levadura-Manitol-Agar, con el indicador Rojo Congo, a 4°C.

Se pasaron a medio Levadura-Manitol-Agar (LMA) líquido, descrito por Vincent (1970) y Beck *et al.* (1993). Posteriormente, se conservaron en perlas de sílica gel, según el método

de Beck *et al.* (1993). Se utilizaron frascos de tapa de rosca, que se mantuvieron a 4 °C.

Al año de conservadas, las cepas se pasaron a erlenmeyer de 50 mL, que contenía 20 mL de medio LMA líquido. Para esto, se tomaron dos perlas en el flujo laminar con una pinza estéril y se pasaron a los erlenmeyer con el medio. Se incubaron a 28 °C y 100 rpm en una zaranda orbital Gallenkam.

Cuando crecieron las cepas se procedió a comprobar si mantenían sus características culturales y la producción de ácido o álcali. Para esto se sembraron en placas Petri, que contenían medio LMA, con el indicador bromocresol púrpura (0.5g en 100 mL de NaOH 0.016 N) a pH 6.8. Este se ajustó en el flujo laminar, después de esterilizado el medio, añadiendo HCl 1 N (4 mL en 50 mL de H₂O destilada) o KOH 1 N (1.4 g en 25 mL de H₂O destilada) hasta que apareciera un halo verdoso. Las placas sembradas se incubaron a 28 °C de 3 a 10 d, según la tasa de crecimiento. La pureza y las características micromorfológicas se comprobaron por tinción de Gram (Rodríguez-Navarro *et al.* 2000, Hungria *et al.* 2001 y Mostasso *et al.* 2002).

Para comprobar las características simbóticas de las cepas, se utilizaron plantas de Contramalina (*Macroptilium lathyroides* (L.) Urb.). Se seleccionaron semillas cosechadas durante ese año, a las que se les realizó la prueba de germinación. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con cinco repeticiones por tratamiento. La desinfección y germinación de las semillas, así como el transplante de las plantas, se realizó según la metodología de Beck *et al.* (1993). Para esta evaluación, se utilizaron tubos de ensayo (2.5 x 20 cm) que contenían 25 mL de medio Norris (Norris y Date 1976), al que se le añadió 4 g de Agar Bacteriológico A por litro de medio de cultivo, para garantizar así una consistencia adecuada para el soporte de las plantas.

Las plantas se colocaron en gradillas de madera, de forma tal que la luz no incidiera directamente en las raíces y se sometieron a un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. A la semana de transferirse a los tubos, se inocularon con 0.1 mL de un cultivo de cepas con

72 h de incubación y una concentración de 10^7 ufc/mL. Se utilizaron dos controles sin inocular: uno sin nitrógeno y otro con KNO_3 (0.75g/L) como fuente de nitrógeno (Hungria *et al.* 2000 y Mostasso *et al.* 2002). Las plantas se observaron diariamente para analizar su desarrollo y determinar la presencia de nódulos. A las cuatro semanas se midió la longitud de la raíz y la parte aérea de las plantas.

Resultados y Discusión

Todas las cepas conservadas crecieron al pasarse al medio líquido, dos de ellas lo hicieron a las 24 h, pues eran cepas de crecimiento rápido, y el resto era de crecimiento lento a los 7 d. Esto se comprobó por el aumento de la turbidez del medio. Los resultados demostraron que las bacterias no presentaron alteraciones en su tasa de crecimiento al utilizar este método de conservación.

Las cepas mantuvieron sus características morfológicas y culturales, y fundamentalmente, los patrones de producción de ácido o álcali. Al observar las bacterias con el microscopio óptico, todas las cepas resultaron ser bacilos Gram negativos.

El método de conservación debe garantizar que se mantengan los caracteres de la cepa

igual que en el cultivo original (Fernández 2002). Los resultados obtenidos corroboran la eficiencia del método utilizado, pues mantener las características analizadas indica que, al menos en este aspecto, no se afectó la estabilidad genética.

En la prueba realizada para comprobar las propiedades simbióticas de las cepas, se utilizó la planta de contramaligna, por ser una leguminosa que puede ser nodulada por la mayoría de las cepas de rizobios (Elías, A. 2003, comunicación personal).

A las cuatro semanas de inocular, todas las cepas estudiadas en las plantas de contramaligna, excepto la GM13, mostraron mayor desarrollo radical y foliar que en el control sin inocular (tabla 1). Esto puede deberse a la producción de metabolitos secundarios por parte de las cepas inocularadas, como son las fitohormonas, lo que se ha demostrado en los rizobios (Bhattacharyya y Basu 1997 y Garg y Sharma 2002). Estas sustancias, específicamente las auxinas, y dentro de éstas el ácido indolacético, no solo están relacionadas con la nodulación, sino que también están involucradas en numerosos aspectos del crecimiento, desde la embriogénesis hasta todos los estados del crecimiento vegetativo (Kuklinsky 2003 y Torres *et al.*

Tabla 1. Comportamiento del crecimiento radical y de la parte aérea de las plantas a las 4 semanas de inocular

Cepas	Indicadores					
	Longitud de la raíz	EE ±	Sign.	Longitud de la parte aérea	EE ±	Sign.
Control (-) ¹	1.38 ^a	1.06	***	1.66 ^a	1.66	***
Control KNO_3 ¹	4.62 ^{bc}	1.06		7.32 ^{bc}	1.66	
GM13	1.38 ^a	0.94		1.75 ^a	0.48	
AM123	2.30 ^{ab}	0.94		3.60 ^{ab}	0.48	
AM52	4.64 ^{bc}	0.94		7.78 ^{bc}	0.48	
AM14	4.80 ^{bcd}	0.94		9.08 ^c	0.48	
AM4 ¹	6.35 ^{cd}	1.06		11.38 ^c	1.66	
GM11	6.35 ^{cd}	0.94		11.40 ^c	0.48	
AM511	6.76 ^{cd}	0.94		10.24 ^c	0.48	
AM13	7.90 ^{de}	0.94		11.80 ^c	0.48	
AM15 ¹	9.73 ^e	1.06		11.28 ^c	1.66	

^{abcde}Letras distintas difieren significativamente a $P < 0.05$ (Duncan 1955) ¹ $n = 4$ *** $P < 0.001$

al. 2004). Esto explica el desarrollo de las plantas estudiadas, incluyendo aquellas en las que aún no se observaron indicios de nodulación.

Las diferencias encontradas entre plantas inoculadas con cepas diferentes, se deben a que los patrones de producción de estas sustancias son específicos para cada cepa.

Los resultados obtenidos demuestran que las cepas utilizadas, además de su posible capacidad para fijar nitrógeno, estimularon el crecimiento de las plantas y éste no se afectó al ser preservado por el método de conservación empleado.

Se concluye que el método de conservación evaluado eliminó los subcultivos frecuentes de las cepas (cada tres meses) y garantizó así la viabilidad de estas hasta el año. Las cepas estudiadas mantuvieron sus características culturales y micromorfológicas, así como la producción de ácido o álcali después de permanecer conservadas por un año en sílica gel. La mayoría de las cepas conservadas ejercieron un efecto positivo en las leguminosas seleccionadas, aun a las cuatro semanas de ser inoculadas en las plantas. No obstante, se deben realizar estudios de viabilidad de las bacterias y observar las plantas por más tiempo, para evaluar así la nodulación.

Referencias

- Beck, D.P., Materon, L.A. & Afandi, F. 1993. Practical Rhizobium-Legume Tech. Manual. Eds. D.P. Beck., L.A. Materon y F. Afandi. Int. Center Agric. Res. Dry Areas (ICARDA). Syria. p. 5
- Bécquer, C.J., Prévost, D., Cloutier, J. & Laguerre, G. 2002. Enfoque taxonómico de rizobios aislados. Biología 16:49
- Bécquer, C.J., Prévost, D. & Prieto, A. 2000. Caracterización fisiológica y bioquímica de rizobios aislados de leguminosas forrajeras. Biología 14:57
- Bhattacharyya, R.N. & Basu, P.S. 1997. Bioproduction of indolacetic acid by a Rhizobium sp. from the root nodule of *Desmodium gangeticum* DC. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 44:109
- Duncan, D.E. 1955. Multiple range and multiple F. test. Biometrics 11:1
- Fernández, J.M. 2002. Conservación de cultivos y mantenimiento de propiedades. Curso de Microbiología Industrial. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca, España. p.14
- García, D. 2000. Aislamiento y selección de cepas de rizobios asociadas al cultivo de la soya (*Glycine max* (L.) Merrill) para la biofertilización. Tesis de Master en Ciencias. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba
- García, M.D. & Uruburu, F. 2003. La conservación de cepas microbianas. <<http://www.uv.es/cect/docs/cons.doc>> [Fecha de consulta: 10 diciembre 2003]
- Garg, N. & Sharma, V. 2002. Recent advances in legume-rhizobium physiology and their interrelationship with phytohormones. En: Advances in Plant Physiology. Ed. A. Hemantaranjan. Sci. Publisher. Jodpur, India. p. 349
- Hernández, A., Pérez, J.M. & Bosch, D. 1999. Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. AGRINFOR. MINAGRI. Ciudad de la Habana, Cuba. p. 26
- Hungria, M., Andrade, D.S., Chueire, L.M.O., Probanza, A., Gutiérrez-Mañero, F.J. & Mejias, M. 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. Soil Biol. & Biochem. 32:1515
- Hungria, M., Chueire, L.M.O., Coca, R.G. & Mejias, M. 2001. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. Soil Biol. & Biochem. 33:1349
- Kuklinsky, J. 2003. A comunidade bacteriana endofítica e epífita de soja (*Glycine max*) e estudo da interação eddófitos-planta. Tesis Doctor en Agronomía. Universidad de São Pablo, Brasil. 174 pp. <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-24052004-154815/publico/julia.pdf>> [Fecha de consulta: 26 agosto 2004]
- López, R.C. 2001. Selección y evaluación de combinaciones de rizobio-leguminosa en suelos afectados por la salinidad. Tesis Dr. Universidad de Granma. Granma, Cuba.
- Mostasso, L., Mostasso, F.L., Días, B.G., Vargas, M.A.T. & Hungria, M. 2002. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. Field Crops Res. 73:121
- Norris, D.O. & Date, R.A. 1976. Tropical Pasture Res. Principles and Methods. Eds. N.H. Shaw y W.W. Bryan. Commonwealth Agric. Bur. (C.A.B.). Bulletin 51. p. 19
- Rodríguez-Navarro, D.N., Buendía, A.M., Camacho, M., Lucas, M.M. & Santamaría, C. 2000.

- Characterization of Rhizobium spp. bean isolates from South-West Spain. *Soil Biol. Biochem.* 32:1601
- Torres, R., Soria, E.M., Pérez, C. & García, J. 2004. Incrementos de la fijación biológica del nitrógeno mediante la inoculación combinada de bacterias fijadoras de N₂ atmosférico. <<http://www.monografias.com/trabajos12/fibi/fibi.shtml>> [Fecha de consulta: 4 agosto 2004]
- Vance, C.P. 2002. Root-Bacteria Interactions: Symbiotic Nitrogen Fixation. En: *Plant Roots the hidden half*. Eds. Y. Waisel, A. Eshel y U. Kafkafi. 3th Ed. Marcel Dekker Inc. New York, USA. p. 839
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodules bacteria. Backwell Scientific Publications, Oxford, p. 21

Recibido: 3 de agosto de 2004.



Instituto de Ciencia Animal

Como parte de las celebraciones en saludo a su 40 aniversario, el Instituto de Ciencia Animal desarrollará, durante los meses de junio a septiembre, un sistema de talleres en todas las provincias del país junto a universidades, centros de investigación y productores de cada región. Estos constituirán el marco propicio para hacer extensivos los principales resultados a investigadores, docentes y productores de todo el territorio nacional, y concluirán con la celebración del 3^{er} Encuentro de Extensión y Transferencia de Tecnologías, del 3 al 5 de noviembre, y el I Congreso Internacional de Producción Animal que abrirá sus puertas al debate científico del 7 al 11 de ese mes, en el Palacio de las Convenciones de Cuba.

Para mayor información, puede dirigirse al Comité Organizador del evento:

Presidente
Dr. Emilio Castillo Corría.
ecasti2003@yahoo.es

Vicepresidente
Dr. Eulogio Muñoz Borges.
emunoz@ica.co.cu