Agronomía Mesoamericana

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Artículo científico
Volumen 35: Artículo 55876, 2024
e-ISSN 2215-3608, https://doi.org/10.15517/am.2024.55876
https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/index

Rhizobium pusense asociado al garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba*

Rhizobium pusense associated to chickpea (*Cicer arietinum* L.), in Cuba

Marisel Ortega-García[1], Yoania Ríos-Rocafull[1], Lily Zelaya-Molina[2], Juan Lara-Aguilera[2], Ramón Arteaga-Garibay[2], María Caridad Nápoles-García[3]

* Recepción: 18 de julio, 2023. Aceptación: 11 de septiembre, 2023. Este trabajo formó parte de una tesis doctoral del primer autor, titulada "Manejo de la biofertilización con rizobacterias en el cultivo del garbanzo (*Cicer arietinum* L.)", financiado por el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt".

[1] Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT), La Habana, Cuba. subdircientifica@inifat.co.cu (autora para correspondencia, https://orcid.org/0000-0002-8076-2675); dpagrobiotec@inifat.co.cu (https://orcid.org/0000-0003-1774-0868).

[2] Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Tepatitlán de Morelos, México. lilyzelayam@yahoo.com.mx (https://orcid.org/0000-0002-3474-3289); ing.juanlara@yahoo.com (https://orcid.org/0000-0002-4702-6094); arteaga.ramon@inifap.gob.mx (https://orcid.org/0000-0002-5745-8149).

[3] Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Mayabeque, Cuba. tere@inca.edu.cu (https://orcid.org/0000-0003-1413-1717).

Resumen

Introducción. El garbanzo se consideró durante muchos años una especie de hospedero restringido para la nodulación, aunque estudios recientes describen una mayor diversidad bacteriana asociada al cultivo que permita incrementar los conocimientos acerca de esta simbiosis para obtener aislados eficientes en su contribución. **Objetivo.** Caracterizar e identificar un aislado obtenido a partir de nódulos de plantas de garbanzo y evaluar su efectividad en condiciones de campo. **Materiales y métodos.** La investigación se desarrolló en los laboratorios de dos centros: Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt", Cuba y en el Centro Nacional de Recursos Genéticos, México, así como en condiciones campo en dos campañas durante los años 2018 y 2020, para demostrar su efectividad en la interacción del cultivo en el primer centro. El aislado R3 se identificó a nivel taxonómico mediante la secuenciación de cuatro genes. Para los experimentos en condiciones de laboratorio se utilizó un diseño completamente aleatorizado, mientras que los ensayos con plantas se realizaron bajo un diseño de bloques al azar. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y las medias se compararon según el test de Tukey ($p < 0,05$). **Resultados.** El aislado R3 mostró variabilidad en cuanto a sus características morfo-fisiológico y bioquímicas. Además, tuvo respuesta con diferencias significativas con respecto al resto de los tratamientos en los indicadores de crecimiento y rendimiento evaluados en el garbanzo. **Conclusión.** Se identificó por primera vez en Cuba *Rhizobium pusense* asociado a nódulos de garbanzo. La cepa mostró un crecimiento positivo a pH entre 5,5 y 9,0 y rangos de temperatura desde 29 ºC hasta 38 ºC, lo que evidencia su tolerancia a estos factores. Su inoculación en garbanzo estimuló la formación de nódulos e incrementó variables del rendimiento.

Palabras claves: caracterización, taxonomía, nodulación, rendimiento.

Agronomía Mesoamericana es desarrollada en la Universidad de Costa Rica bajo una licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional. Para más información escriba a pccmca@ucr.ac.cr o pccmca@gmail.com

Abstract

Introduction. Chickpea has been considered a restricted host species for nodulation, although recent studies describe a greater bacterial diversity associated with the crop to increase the knowledge about this symbiosis in orden to obtain efficient isolates in its contribution. **Objective.** To characterize and identify an isolate obtained from chickpea plant nodules and evaluate its effectiveness under field conditions. **Materials and methods.** The research was conducted in the laboratories of two centers: the Institute of Fundamental Research in Tropical Agriculture "Alejandro de Humboldt," Cuba, and the National Center for Genetic Resources, Mexico, as well as under field conditions in two campaigns during the years 2018 and 2020 to demonstrate its effectiveness in crop interaction in the first center. The isolate R3 was taxonomically identified through the sequencing of four genes. For laboratory experiments, a completely randomized design was used, while plant trials were conducted under a randomized block design. The results were subjected to analysis of variance, and means were compared using the Tukey test ($p<0.05$). **Results.** The isolate R3 showed variability in terms of its morpho-physiological and biochemical characteristics. Furthermore, it exhibited significant differences compared to the other treatments in the growth and yield indicators evaluated in chickpea. **Conclusions.** *Rhizobium pusense* associated with chickpea nodules was identified for the first time in Cuba. The strain demonstrates growth at pH levels between 5.5 and 9.0 and temperature ranges from 29 °C to 38 °C, indicating its tolerance to these factors. Its inoculation in chickpea stimulates nodule formation and increased yield-related variables.

Keywords: characterization, taxonomy, nodulation, yield.

Introducción

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) se consideró durante muchos años una especie de hospedero restringido para la nodulación, razón por la cual los estudios de diversidad de bacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPB, por sus siglas en inglés), que se asociaban a esta especie de planta se limitaron durante largo tiempo al género *Mesorhizobium* (Zhang et al., 2020). Se ha descrito la presencia de nuevas especies asociadas al cultivo, tales como *Rhizobium leguminosarum* (Martínez-Hidalgo et al., 2015); *Achromobacter xylosoxidans* (Egamberdieva et al., 2017); *Burkholderia andropogonis* y *Ochrobactrum ciceri* (Velázquez et al., 2017) entre otras, lo que denota que existe una amplia diversidad de bacterias capaces de asociarse al garbanzo (Zhang et al., 2020).

Son limitadas las investigaciones relacionadas con la simbiosis rizobio-garbanzo, debido a que los microorganismos noduladores o endosimbiontes que lo benefician son pocos y a que además no se considera una planta modelo a nivel de estudios biológicos (Cruz González, 2018). De ahí, la importancia de incrementar los conocimientos acerca de esta simbiosis y del proceso de interacción, ya que los exudados radicales liberados por cada cultivar difieren en su composición química y concentración. Además, por la necesidad de obtener aislados eficientes con potencial de asociarse a cultivares de garbanzo más nodulantes y productivos, como alternativa nutricional para reducir las aplicaciones de fertilizantes minerales. Por esta razón, la implementación de prácticas que limiten la aplicación de insumos sintéticos, como la biofertilización, se convierte en una alternativa viable e importante para lograr un desarrollo agrícola sostenible a nivel ecológico (Chávez-Díaz et al., 2020), que permita reducir el impacto negativo provocado por el exceso de agroquímicos y conservar el equilibrio en el medio ambiente (Rosabal et al., 2021).

El garbanzo se encuentra dentro de los cultivos que brindan beneficios a los agroecosistemas, ya que mejora las condiciones del suelo por la fijación biológica del nitrógeno (FBN), en simbiosis con los rizobios, al alcanzar hasta 300 kg ha^{-1} de N cultivado como abono verde. Favorece, además, la fertilidad del suelo, ya que contribuye

a mantener e incrementar la biomasa microbiana encargada de mejorar su estructura y hacer más accesibles los nutrientes, lo que favorece la sanidad de los cultivos y aumenta la resistencia a las enfermedades (Vargas-Blandino & Cárdenas-Travieso, 2021). Además, el garbanzo se destaca por ser una especie de interés para el consumo humano y animal (Apáez Barrios et al., 2020), con un contenido proteico de alrededor del 20 %, cantidad elevada de carbohidratos (40 %), de alta digestibilidad, es rico en ácidos grasos insaturados y posee pocos elementos antinutritivos (León de la Rocha et al., 2019). De igual forma, a su consumo se le confiere un efecto beneficioso en la prevención de enfermedades crónicas como las cardiovasculares, diabetes, algunos tipos de cáncer y problemas digestivos (Hidalgo et al., 2018).

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar e identificar un aislado obtenido a partir de nódulos de plantas de garbanzo y evaluar su efectividad en condiciones de campo.

Materiales y métodos

Sitio de estudio y material vegetal

El aislamiento de presuntos rizobios se realizó a partir de la colecta de nódulos provenientes de plantas sanas y vigorosas del cultivar de garbanzo (*C. arietinum*) variedad Nacional-29, en el año 2012 en la provincia de Artemisa, Cuba, en un suelo Ferralítico Rojo Lixiviado agrogénico (Hernández Jiménez et al., 2015), con un pH de 7,36 y un contenido de materia orgánica de 2,09 %. Se empleó un termómetro, un pluviómetro y un higrómetro, para evaluar las variables meteorológicas en el período de noviembre-febrero, durante la realización de los experimentos. Se registró una temperatura promedio entre 13,5 °C y 21,8 °C, con precipitaciones medias anuales desde 1016 a 1024 mm y entre 66 % y 85 % de humedad relativa.

Caracterización morfológica, fisiológica y-bioquímica

El aislado de rizobio R3 se cultivó por agotamiento (diluciones sucesivas de la muestra en condiciones de esterilidad) en placas *Petri*, por triplicado, sobre medio de cultivo levadura manitol agar (LMA) con Rojo Congo (Yuan et al., 2020). Se caracterizó su morfología mediante la descripción de las colonias formadas en un cultivo de 24 h a 30 °C. Los aspectos del cultivo que se tuvieron en cuenta para la caracterización fueron: tiempo de aparición, forma, color, aspecto, borde y textura de las colonias, mediante su observación en microscopio estereoscópico (Leica KL 300 LED, 3X de aumento). Las características micromorfológicas y tintoriales, se describieron mediante tinción de Gram según el procedimiento descrito por Madigan et al. (2019) y se visualizó la respuesta del aislado en un microscopio óptico (Leica DM300, 1000 X de aumento). Se evaluó la producción de ácidos o bases y la producción de cetolactasa. En el primer caso, se utilizó el medio de cultivo LMA con azul de bromotimol y en el segundo, el medio de cultivo Levadura Lactosa Agar (LLA) (Yuan et al., 2020). Las placas se incubaron durante siete días a 28-30 °C.

Para la caracterización fisiológico-bioquímica se ejecutaron diez pruebas que incluyeron presencia de las enzimas citocromo oxidasa y catalasa, hidrólisis del almidón, gelatina y caseína, utilización de citrato como fuente de carbono, producción de indol a partir de triptófano, fermentación de la glucosa, utilización de azufre y motilidad, esta última por el método de la gota colgante. En todos los casos las muestras se incubaron durante dos a cinco días, a una temperatura de 28-30 °C y se realizaron las pruebas por triplicado.

Tolerancia a diferentes valores de pH y temperatura

La tolerancia a valores de pH se realizó mediante el uso de placas *Petri* con medio de cultivo LMA ajustado a diferentes valores de pH (3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9 y 9,5) con HCl 1N ó NaOH 1N (Bécquer et al., 2016), se sembró el aislado mediante una estría central y luego se incubaron a 30 °C. Se observó su crecimiento cada 24 horas durante 12 días (Gómez Padilla et al., 2017). De forma similar, se determinó la tolerancia a diferentes temperaturas, pero en este caso el aislado se sembró en el medio LMA y las placas se incubaron a los valores de temperatura (ºC): 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 39 y 40. Para ambos casos se consideró como respuesta positiva el crecimiento microbiano sobre el medio y como resultado negativo, la ausencia de este (Flores-Félix et al., 2020).

Identificación taxonómica

Se trabajó con el aislado R3 procedente de la provincia Artemisa, Cuba, cuyo código de conservación en el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, en Tepatitlán de Morelos, México: es CM-CNRG 562. El mismo se revitalizó en medio de cultivo LMA para su posterior identificación. Con el fin de extraer el ADN genómico del aislado, se cultivó en medio triptona extracto de levadura (TY, por sus siglas en inglés) (Paudel et al., 2020), durante 24 h, a 28-30 °C. Una colonia aislada se suspendió en 100 μL de agua ultra pura estéril y se centrifugó durante 2 min a 19 000 g. Las células se resuspendieron en una solución de 100 μL de hidróxido de sodio (NaOH, 0,05 M), luego se calentó a 100 ºC, durante 4 min. Transcurrido este tiempo se adicionaron 900 μL de agua destilada estéril y se centrifugó a 19 000 g por 2 min. Se retiraron 700 μL del sobrenadante, que se mezclaron con igual volumen de glicerol al 25 % (v/v) y se conservó a -20 ºC.

La amplificación de los genes ARNr 16S, *atpD*, *gltA*, y *recA* (Cuadro 1) se realizó por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en un termociclador (SelectCycler). Se utilizaron los iniciadores 27f (secuencia 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3´) y 1492r (5´- CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT -3´) (Rasheed et al., 2020). La mezcla de reacción consistió en: 2 μL de cada cebador a una concentración de 10 μM, 25 μL de DreamTaq Green PCR Master Mix (2X); 4,0 μL de ADN y 17 µL de agua ultra pura. Para la PCR se empleó un termociclador con la siguiente programación: una desnaturalización inicial a 95 ºC, 5 min; 30 ciclos de

Cuadro 1. Iniciadores empleados en la amplificación y secuenciación de genes. Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Tepatitlán de Morelos, México. 2020.

Table 1. Primers used for gene amplification and sequencing. Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Tepatitlán de Morelos, México. 2020.

Gen	Iniciador	Secuencia (5'-3')	Fuente
16S Rrna	785F	GGATTAGATACCCTGGTA	Kumar et al. (2016)
	907R	CCGTCAATTCMTTTRAGRTT	
atpD	atpD294F	ATCGGCGAGCCGGTCGACGA	Zhao et al. (2017)
	atpD771R	GCCGACACTTCCGAACCNGCCTG	
gltA	gltA428F	CSGCCTTCTAYCAYGACTC	Khalid et al. (2014)
	gltA1111R	GGGAGCCSAKCGCCTTCAG	
recA	recA6F	CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA	Zhao et al. (2017)
	recA555R	CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT	

ISSN 2215-3608 https://doi.org/10.15517/am.2024.55876

95 ºC, 30 s (desnaturalización); 59 ºC, 30 s (hibridación o alineamiento) y 72 ºC, 90 s (extensión), y una extensión final a 72 ºC, 7 min.

El producto de la amplificación se visualizó por electroforesis en gel de agarosa 0,9 % (m/v) en buffer Tris acetato EDTA (TAE) 1X. La corrida se realizó durante 40 minutos, a 90 V. Los geles se fotografiaron mediante el empleo de un fotodocumentador GoodView (Beijing SBS. GenetechCo. Ltd.) en una relación de 1 µL:50 mL (colorante: agarosa). El tamaño correcto del amplicón (1500 pares de bases) se confirmó mediante su comparación con el marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific #SM1332), al exponer el gel a luz ultravioleta.

Los productos de la PCR se secuenciaron (MACROGEN Inc. Corea) y las secuencias en formato *.abi se transformaron a formato FASTA con el programa BioEdit versión 7.0.9.0. Se analizaron en las bases de datos del NCBI mediante el programa MegaBlast versión 2.2.22 y se construyó una minería de secuencias homólogas del GenBank, por medio del programa Clustal X, versión 2.0. Se generó el alineamiento que se editó con el programa Seaview versión 4.0**.** Con la secuencia consenso, se realizó un nuevo análisis en el programa MegaBlast versión 2.2.22 para determinar la reconstrucción filogenética de las secuencias. La asignación final de identidades se realizó en base a la concordancia de la comparación de la agrupación de las secuencias con secuencias homólogas y la identidad porcentual mayor al 99 % en las bases de las plataformas BLAST (base de nucleótidos y de 16S de Bacterias y Archeas) leBiBi y EzBiocloud.

Efectividad en el crecimiento y rendimiento de garbanzo en condiciones de campo

El ensayo se llevó a cabo en lotes agrícolas del INIFAT, Cuba, en un suelo Ferralítico Rojo Compactado (Hernández Jiménez et al., 2015), para medir la efectividad en el crecimiento y rendimiento de la variedad de garbanzo Nacional-29 en condiciones de campo. Se utilizaron dos cepas, 1) el aislado R3 bajo estudio y 2) la cepa de referencia (*Mesorhizobium ciceri* INIFAT GR-1), empleada para la inoculación de garbanzo en Cuba. En ambos casos, los inóculos se prepararon mediante un proceso de fermentación sumergida en zaranda orbital en medio de cultivo LM. Para esto, se empleó un agitador orbital de 200 rpm, durante 48 h y a una temperatura de 28-30 °C, hasta obtener una concentración de 2,4 x 10^{10} UFC mL^{-1}. Los mismos se diluyeron en agua, a razón de 1:10 (v:v) y se aplicaron mediante imbibición de las semillas variedad Nacional 29 durante 15 min. Para los tratamientos testigos, las semillas solo se embebieron en agua durante igual periodo de tiempo. En todos los casos, las semillas se orearon a la sombra sobre un tamiz, antes de proceder a la siembra en un suelo Ferralítico Rojo Lixiviado (Hernández Jiménez et al., 2015).

El ensayo contó con cuatro réplicas por tratamiento y un tamaño de parcela de 30 m^2, con seis surcos de 5 m de largo por 6 m de ancho para cada tratamiento, y una distancia entre plantas de 0,20 m y 0,70 m, entre surcos. Se realizaron las atenciones culturales recomendadas para el cultivo de garbanzo en Cuba (Shagarodsky et al., 2021). Se utilizó además como tratamiento control un testigo absoluto sin aplicación de microorganismos ni fertilizantes.

A los 60 días después de la siembra, se extrajeron diez plantas por cada tratamiento, a las que se les determinó número de nódulos (u) y masa seca de nódulos por planta (g), esto último, mediante el uso de una estufa a 70 °C, durante 72 h. En el momento de la cosecha, se desecharon los bordes de cada parcela y se utilizaron diez plantas por surco para determinar a cada una de ellas los siguientes indicadores: número de vainas (u), masa seca de 100 granos y masa seca de los granos (g), las que se le determinaron con una balanza semi-analítica (0,01 g de error). Para cuantificar la masa seca de los granos se utilizó una balanza de precisión (1 g de error).

Para los experimentos en condiciones de laboratorio se utilizó un diseño completamente aleatorizado, mientras que los ensayos con plantas se realizaron bajo un diseño de bloques al azar. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y las medias se compararon según el test de Tuckey ($p < 0,05$). El análisis estadístico se realizó con el software InfoStat (Di Rienzo et al., 2018).

Resultados

Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica

El aislado R3 mostró características culturales, morfológicas y tintoriales similares a las de los rizobios, i.e, cocobacilos o bacilos pequeños, Gram negativos, sin esporas. Creció a los dos días de la siembra, con colonias de 1 mm de diámetro de coloración blanquecina, sin absorción de rojo congo, circulares, convexas y mucilaginosas, con una coloración beige. Las células con una forma cocobacilar, sin esporas, Gram negativas. El crecimiento mostró cambio de coloración de verde a amarillo en el medio de cultivo LMA con azul de bromotimol, lo que indica su capacidad para producir ácidos y una respuesta negativa a la cetolactasa. Además, mostró una respuesta positiva a las pruebas de oxidasa, catalasa, hidrólisis de caseína, utilización de citrato y motilidad. Sin embargo, la respuesta fue negativa a la hidrólisis de almidón y de gelatina, a la producción de indol a partir del triptófano, el uso de azufre a partir del crecimiento en medio Kliger y a la degradación de la celulosa.

Tolerancia a diferentes valores de pH y temperatura

El aislado no creció a valores de pH entre 3 y 5 ni a pH de 9,5. No obstante, mostró crecimiento a pH entre 5,5 y 9,0. Tampoco creció a valores de temperatura entre 25 y 27 ºC, ni a 40 ºC. Sin embargo, toleró rangos desde 28 hasta 39 ºC (Cuadro 2).

Cuadro 2. Crecimiento del aislado R3 obtenido a partir de la colecta de nódulos en la provincia de Artemisa, Cuba a diferentes niveles de pH y temperatura. Cuba. 2020.

Table 2. Growth of isolated R3 obtained from the collection of nodules in Artemisa, Cuba to different pH levels and temperature. Cuba. 2020.

Valores de pH														
3	**3,5**	**4**	**4,5**	**5**	**5,5**	**6**	**6,5**	**7**	**7,5**	**8**	**8,5**	**9**	**9,5**	
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Temperatura (ºC)														
25	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**	**31**	**32**	**33**	**34**	**35**	**36**	**37**	**38**	**39**	**40**
-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Crecimiento (+) ausencia de crecimiento (-). / Legend: Growth (+) absence of growth (-).

Identificación taxonómica

En el árbol filogenético de la cepa R3 con la secuencia de los cuatro genes (Figura 1), la cepa se identifica como perteneciente a la especie *Rhizobium pusense*. Los porcentajes de identidad entre las cepas de las diferentes especies de *Rhizobium* se indican en el Cuadro 3.

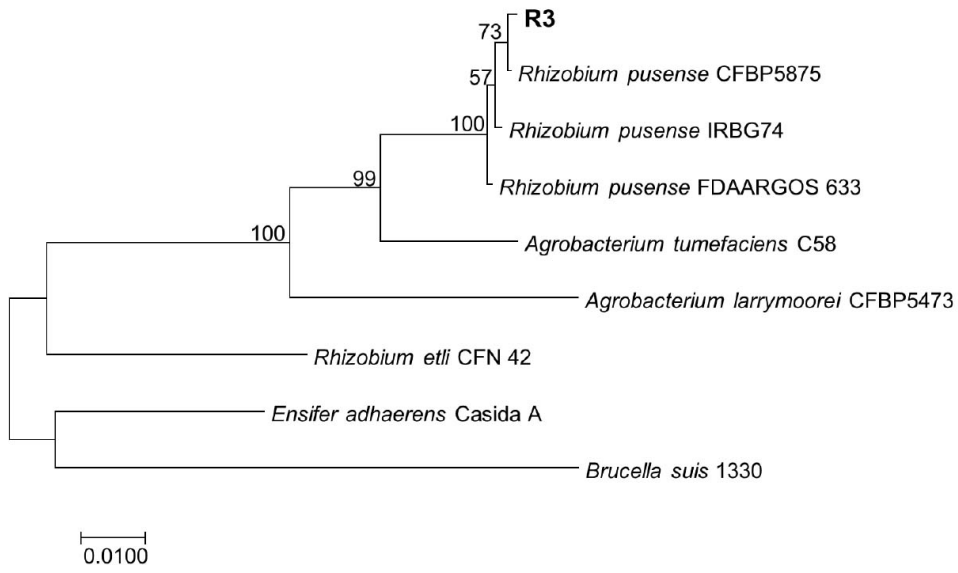


Figura 1. Árbol filogenético de la cepa R3 de *Rhizobium pusense* obtenida a partir de la colecta de nódulos en la provincia de Artemisa, Cuba construido con la secuencia concatenada de los genes 16S rRNA, *atpD*, *gltA* y *recA*, con el método de máxima verosimilitud y el modelo de sustitución nucleotídica de Tamira Nei 93, con 1000 repeticiones Bootstrap. Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Tepatitlán de Morelos, México. 2020.

Figure 1. Phylogenetic tree of the R3 pusense strain of *Rhizobium pusense* obtained from nodule collection in the province of Artemisa, Cuba, constructed with the concatenated sequence of the 16S rRNA, atpD, gltA, and recA genes, with the maximum likelihood method and the Tamura-Nei 93 nucleotide substitution model, with 1000 Bootstrap repetitions. Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Tepatitlán de Morelos, Mexico. 2020.

Cuadro 3. Porcentajes de identidad con la secuencia de la cepa R3 y cepas de referencia relacionadas. Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Tepatitlán de Morelos, México. 2020.

Table 3. Percentage sequence identity with strain R3 and related reference strains. Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Tepatitlán de Morelos, México. 2020.

	16S rRNA	***atp*D**	***glt*A**	***rec*A**
Rhizobium pusense FDAARGO3_633	99,85	98,19	99,11	99,48
Rhizobium pusense CFBP5875	99,85	99,60	99,25	99,83
Rhizobium pusense IRBG74	99,85	98,79	99.40	99,48
Rhizobium etli CFN_42	94,44	88,58	85,88	88,31

Códigos de las cepas empleadas en el: / Codes of the strains used in the: GenBank.16S rRNA: MK108017, atpD: OP795820, gltA: OP795821 y recA: OP795822.

Efectividad en el crecimiento y rendimiento de garbanzo en condiciones de campo

La cepa R3 mostró una mejor respuesta con diferencias significativas con respecto al tratamiento inoculado con la cepa INIFAT GR-1 y el testigo sin inocular, con un mayor número y masa seca de los nódulos (Figura 2), de igual manera se expresó este resultado en los indicadores vinculados al rendimiento del cultivo que se evaluaron como el número de vainas por planta, la masa seca de 100 granos y la masa seca de los granos por planta (Figura 3).

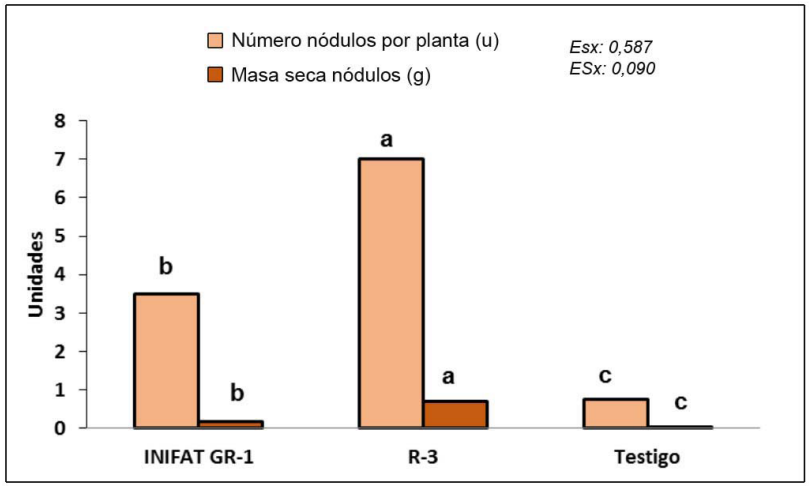


Figura 2. Número y masa seca de los nódulos de plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) de la variedad Nacional-29 inoculadas o no (testigo). Cuba. 2020.

INIFAT GR-1: cepa INIFAT GR-1, TA: testigo absoluto, R3: cepa R3. Letras iguales no difieren significativamente entre sí, según Tukey α=0,05, n= 10.

Figure 2. Number and dry mass of nodules mass of chickpea plants (*Cicer arietinum* L.) variety Nacional-29 inoculated and not (control) ed. Cuba. 2020.

INIFAT GR-1: strain INIFAT GR-1, TA: absolute witness, R3: strain R3. Same letters don't differ significantly to each other, according to Tukey α=0,05, n = 10.

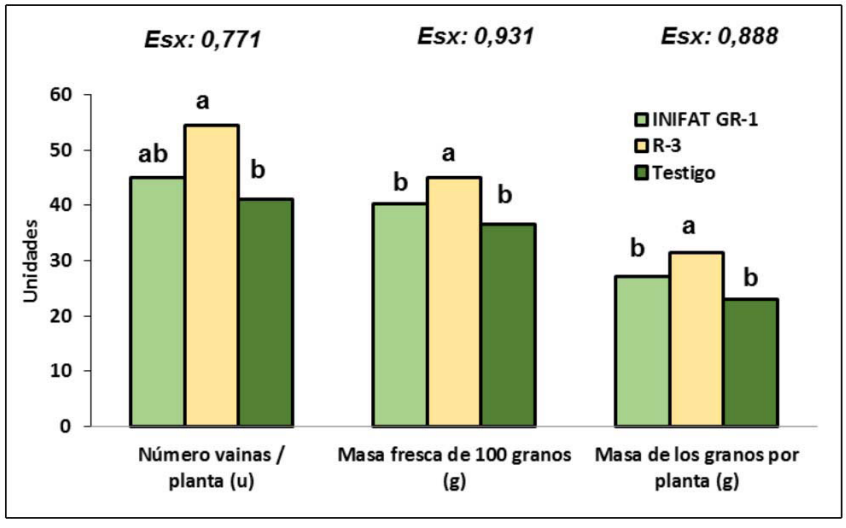


Figura 3. Número de vainas por planta, masa fresca (g) de 100 granos y masa seca (g) de los granos por planta en plantas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en la variedad Nacional-29, inoculadas o no (testigo). Cuba. 2020

INIFAT GR-1: cepa INIFAT GR-1, TA: testigo absoluto, R3: cepa R3. Letras iguales no difieren significativamente entre sí, según Tukey α=0,05, n= 10. Cuba. 2020.

Figure 3. Number of pods per plant, fresh mass (g) of 100-grain and dry mass (g) t of grains per plant in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants of variety Nacional-29, inoculated or not (control). Cuba. 2020.

INIFAT GR-1: strain INIFAT GR-1, TA: absolute control, R3: strain R3. Same letters don't differ significantly to each other, according to Tukey α=0,05, n = 10. Cuba. 2020.

Discusión

El aislado R3 mostró características similares a las que se describen para los rizobios (Madigan et al., 2019). Entre las que se destacan una respuesta positiva frente a la prueba de la catalasa y la oxidasa, no hidrolizan almidón ni gelatina, pero sí caseína, utilizan citrato como fuente de carbono y tienen una respuesta negativa en el medio Kliger y a la producción de indol a partir del triptófano (Singha et al., 2017).

La mayoría de los rizobios crecen en valores de pH cercanos a la neutralidad (Bécquer Granados, 2022), sin embargo, se ha demostrado que algunas cepas de esta familia pueden tolerar rangos de pH desde 3,5 hasta 9 (Gómez Padilla et al., 2017). El aislado R3 creció a pH 5,5 y también a valores de pH 9; lo que sugiere la presencia de mecanismos de adaptación que le permiten sobrevivir en estas condiciones (Moreno Reséndez et al., 2018), aspecto que constituye una ventaja para el uso en la práctica de este microorganismo como principio activo de un biofertilizante para beneficiar al cultivo del garbanzo, ya que, de mantener su efecto estimulador del crecimiento en las diferentes condiciones de acidez, podría utilizarse en distintos tipos de suelo y en diferentes agroecosistemas.

Los rizobios pueden crecer en temperaturas entre 28-30 °C (Fernández Canigia, 2020). Otras investigaciones han obtenido resultados similares a los alcanzados en el presente estudio e incluso superiores, donde aislados de nódulos de *Vigna unguiculata* toleraron hasta 45 ºC (Gómez Padilla et al., 2017). Esto sucede con la tolerancia de algunas cepas a diferentes valores de pH y temperaturas, lo que puede favorecer su multiplicación en la rizosfera y contribuir a una mayor colonización de la especie. Otros autores señalaron que estos factores, le confieren a los rizobios mayores posibilidades de sobrevivir y competir con otras bacterias del suelo, lo que favorece la colonización de las leguminosas y la fijación de nitrógeno atmosférico (Moreno Reséndez et al., 2018).

El análisis filogenético mostró que la cepa R3 pertenece al género *Rhizobium* y a la especie *pusense*. El mismo, es originario de la India y se aisló por primera vez de la rizosfera de garbanzo, de ahí que sea posible su presencia asociada a esta especie vegetal bajo las condiciones de Cuba, aunque este constituye el primer informe en el país que demuestra su presencia en el cultivo.

La mayor cantidad de nódulos formados con la inoculación de *R. pusense* cepa R3, sugiere una mayor afinidad entre esta cepa y el cultivar de garbanzo Nacional 29 y, por lo tanto, una mejor colonización del sistema radical y establecimiento de los bacteroides dentro de los nódulos, lo que conlleva a un incremento de la masa nodular (Velázquez et al., 2017). Ello implica un mayor suministro de N a la planta, que, junto a otros nutrientes y agua, se convertirán en biomasa aérea, por tanto, en mayor capacidad de realizar fotosíntesis, lo que permitirá una mayor producción de legumbres y granos. Respecto a esto, otros estudios plantean la posibilidad de lograr una nodulación eficiente garantiza los elementos necesarios para el crecimiento y el desarrollo de las plantas (Chandra et al., 2018).

Estos resultados constituyen el primer informe de la especie *R. pusense* en Cuba, asociada al cultivo del garbanzo y sugieren que la cepa R3 podría constituir el principio activo de un nuevo bioproducto para beneficiar el cultivo.

Conclusiones

Se identifica por primera vez en Cuba la especie *R. pusense* asociada a nódulos de garbanzo (*C. arietinum* L.). La cepa mostró un crecimiento positivo a pH entre 5,5 y 9,0 y rangos de temperatura desde 29 hasta 38 ºC, lo que evidencia su tolerancia a estos factores. Su inoculación en garbanzo estimuló la formación de nódulos e incrementó las variables del rendimiento. Los resultados constituyen un punto de partida para la utilización de esta cepa como principio activo de un biofertilizante que beneficie el cultivo del garbanzo en las condiciones de Cuba.

Referencias

Apáez Barrios, M., Escalante Estrada, J. A., Apáez Barrios, P., & Álvarez Hernández, J. C. (2020). Producción, crecimiento y calidad nutrimental del garbanzo en función del nitrógeno y fósforo. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas, 11*(6), 1273–1284. https://doi.org/10.29312/remexca.v11i6.2226

Bécquer, C. J., Galdo, Y., Ramos, Y., Peña, M. D., Almaguer, N., Peña, Y. F., Mirabal, A., Quintana, M., & Puentes, A. (2016). Rhizobia isolated from forage legumes of an arid cattle rearing ecosystem in Holguín, Cuba. Morpho-cultural evaluation and nodulation (phase I). *Cuban Journal of Agricultural Science, 50*(4), 607–617. https://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/665

Bécquer Granados, C. J. (2022). Las rizobacterias y su contribución a la tolerancia de las plantas a la sequía y a la salinidad. *Cuban Journal of Agricultural Science, 56*(2), 69–87. https://www.cjascience.com/index.php/CJAS/article/view/1051

Chandra, S., Askari, K., & Kumari, M. (2018). Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 16*(2), 581-586. http://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.09.001

Chávez-Díaz, I. F., Zelaya, L. X., Cruz, C. I., Rojas, E., Ruíz, S., & de los Santos, S. (2020). Consideraciones sobre el uso de biofertilizantes como alternativa agro-biotecnológica sostenible para la seguridad alimentaria en México. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas, 11*(6), 1423–1436. http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v11i6.2492

Cruz González, X. A. (2018). *Análisis genotípicos, fenotípico y funcional de bacterias aisladas de nódulos de Cicer arietinum L. para la evaluación de su potencial como biofertilizantes agrícolas en cultivos de garbanzo y trigo* (Tesis doctoral, Universidad de Salamanca). Repositorio Documental CREDOS de la Universidad de Salamanca. http://doi.org/10.14201/gredos.139493

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2018). *Infostat* (Versión 2018) [Software]. Universidad Nacional de Córdoba. http://www.infostat.com.ar

Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Shurigin, V. V., Hashem, A., & Abd-Allah, E. F. (2017). Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by Fusarium solani under salt stress. *Frontiers in Microbiology, 8*, Article 1887. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01887

Fernández Canigia, M. V. (2020). *Factores determinantes de la nodulación (1a ed. ampliada). Engormix*. https://images.engormix.com/externalFiles/6_factores_determinantes_de_la_nodulacion.pdf

Flores-Félix, J. D., Carro, L., Cerda-Castillo, E., Squartini, A., Rivas, R., & Velázquez, E. (2020). Analysis of the interaction between *Pisum sativum* and *Rhizobium laguerreae* strains nodulating this legume in Northwest Spain. *Plants, 9*(12), Article 1755. https://doi.org/10.3390/plants9121755

Gómez Padilla, E., Ruiz-Díez, B., Fajardo, S., Eichler-Loebermann, B., Samson, R., Van Damme, P., López Sánchez, R., & Fernandez-Pascual, M. (2017). Caracterización de rizobios aislados de nódulos de frijol caupí, en suelos salinos de Cuba. *Cultivos Tropicales, 38*(4), 39–49. https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1401

Hernández Jiménez, A., Pérez Jiménez, J. M., Bosch Infante, D., & Castro Speck, N. (2015). *Clasificación de los suelos de Cuba 2015*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas.

Hidalgo, M., Rodríguez, V., & Porras, O. (2018). Una mirada actualizada de los beneficios fisiológicos derivados del consumo de legumbres. *Revista Chilena de Nutrición, 45*(Supl.1), 32–44. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182018000200032

Khalid, R., Zhang, Y. J., Ali, S., Sui, X. H., Zhang, X. X., Amara, U., Chen, W. X., & Hayat, R. (2014). *Rhizobium pakistanensis* sp. nov., isolated from groundnut (*Arachis hypogaea*) nodules grown in rainfed Pothwar, Pakistan. *Antonie van Leeuwenhoek, 107*(1), 281–290. https://doi.org/10.1007/s10482-014-0326-x

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution, 33*(7), 1870–1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

León de la Rocha, J. F., Sariol Sánchez, D. M., & Juárez Cortez, J. A. (2019). Efecto de la fertilización nitrogenada y fechas de siembra en el cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Tehuacán, Puebla, México. *Roca, 15*(3), 25–34. https://revistas.udg.co.cu/index.php/roca/article/view/925.

Madigan, M. T., Bender, K., Buckley, D., Sattley, W., & Stahl, D. (2019). *Brock Biology of Microorganisms* (15th ed.). Pearson.

Martínez-Hidalgo, P., Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Rivas, R., Carro, L., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., León-Barrios, M., & Velázquez, E. (2015). Cicer canariense, an endemic legume to the Canary Islands, is nodulated in mainland Spain by fast-growing strains from simbiovar trifolii phylogenetically related to *Rhizobium leguminosarum*. *Systematic and Applied Microbiology, 38*(5), 346–350. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.011

Moreno Reséndez, A., García Mendoza, V., Reyes Carrillo, J. L., Vásquez Arroyo, J., & Cano Ríos, P. (2018). Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: una alternativa de biofertilización para la agricultura sustentable. *Revista Colombiana de Biotecnología, 20*(1), 68–83. http://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73707

Paudel, D., Liu, F., Wang, L., Crook, M., Maya, S., Peng, Z., Kelley, K., Ané, J.-M., & Wang, J. (2020). Isolation, characterization, and complete genome sequence of a *Bradyrhizobium* strain Lb8 from nodules of peanut utilizing crack entry infection. *Frontiers in Microbiology, 11*, Article 93. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00093

Rasheed, M., Naseer, T., Hassan, A., Hassan, F., Hayat, R., Jilani, G., Vaseer, S. G., & Ali, M. B. (2020). Isolation of nodule associated bacteria for promotion of lentil growth. *Pakistan Journal of Agricultural Research, 33*(1), 170–179. http://dx.doi.org/10.17582/journal.pjar/2020/33.1.170.179

Rosabal, L., Macías, P., Maza, M., López, R., & Guevara, F. (2021). Microorganismos del suelo y sus usos potenciales en la agricultura frente al escenario del cambio climático. *Magna Scientia UCEVA, 1*(1), 104–117. https://doi.org/10.54502/msuceva.v1n1a14.

Shagarodsky, T., Veitia, M., & Cabrera, M. (2021). *Manual para el manejo y producción sostenible del cultivo del garbanzo (Cicer arietinum L.) en Cuba*. Editorial Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt"

Singha, B., Behari Mazumder, P., & Pandey, P. (2017). Characterization of plant growth promoting rhizobia from root nodule of two legume species cultivated in Assam. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 88*(3), 1007–1016. https://doi.org/10.1007/s40011-016-0836-6

Vargas-Blandino, D., & Cárdenas-Travieso, R. (2021). Cultivo del garbanzo, una posible solución frente al cambio climático. *Cultivos Tropicales, 42*(1), Article e09. https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1583

Velázquez, E., García-Fraile, P., Ramírez-Bahena, M. H., Rivas, R., & Molina-Martínez, E. (2017). Current status of the taxonomy of bacteria able to establish nitrogen-fixing legume symbiosis. In A. Zaidi, M. S. Khan, & J. Musarrat (Eds.), *Microbes for legume improvement* (2nd Ed., pp. 1–43). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59174-2_1

Yuan, K., Reckling, M., Artigas Ramirez, M. D., Djedidi, S., Fukuhara, I., Ohyama, T., Yokoyama, T., Bellingrath-Kimura, S. D., Halwani, M., Egamberdieva, D. & Ohkama-Ohtsu, N. (2020). Characterization of rhizobia for the improvement of soybean cultivation at cold conditions in Central Europe. *Microbes and Environments, 35*(1), Article ME19124. https://doi.org/10.1264/jsme2.ME19124

Zhao, J. -J., Zhang, J., Zhang, R. -J., Zhang, C. -W., Yin, H. -Q., & Zhang, X. -X. (2017). *Rhizobium rhizosphaerae* sp. nov., a novel species isolated from rice rhizosphere. *Antonie van Leeuwenhoek, 110*, 651–656. https://doi.org/10.1007/s10482-017-0831-9

Zhang, J., Peng, S., Shang, Y., Brunel, B., Li, S., Zhao, Y., Liu, Y., Chen, W., Wang, E., Pratap Singh, R., & James, E. K. (2020). Genomic diversity of chickpea-nodulating rhizobia in Ningxia (north Central China) and gene flow within symbiotic *Mesorhizobium muleiense* populations. *Systematic and Applied Microbiology, 43*(4), Article 126089. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126089