

## Selection of rhizobia due to their effect on germination and incipient development of *Moringa oleifera* Lam. Phase I: controlled conditions

### Selección de rizobios por su efecto en la germinación y desarrollo incipiente de *Moringa oleifera* Lam. Fase I: condiciones controladas.

C. J. Bécquer, T. Cancio, J. A. Nápoles, Ivón Muir, U. Ávila, Orquidia Álvarez and Yahima Madrigal.

*Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes,  
Estación Experimental Sancti Spiritus, Apdo. 2255, ZP. 1, C. P. 62200, Sancti Spiritus, Cuba  
Email: pastosp@enet.cu*

An assay was conducted under controlled conditions to evaluate the effect of different native isolates and reference strains of rhizobia on agro-physiological variables of *Moringa oleifera* Lam., as well as to select the best treatments for their evaluation in greenhouse or nursery. A completely randomized design with 12 treatments and 14 repetitions was applied, an ANOVA analysis was performed. Differences between means were determined by Fisher LSD test. The values with digit counting were transformed by  $\sqrt{x}$ , and the percentage data by  $\arccos\sqrt{p}$ . Correlation coefficient among variables was calculated. It is concluded that isolates JK5, Ho9 and Ho5 exerted a positive superior effect on germination at 10 and 15 days after sowing, as well as in most of the variables. However, the reference strains showed an efficiency index of inoculation in dry weight of the aerial part, lower than that of native isolates. The 50 % of the treatments inoculated presented values superior to the absolute control in dry weight of the aerial part and in dry weight of the root, as well as superior to the control fertilized in this last variable. On the other hand, nitrogen fertilization did not show a positive effect on any of the evaluated variables. It is noteworthy that there was a moderately strong statistical correlation between dry weight of the root and dry weight of the aerial part, as well as between dry weight of the aerial part and index of germination speed, which indicates a high physiological interrelation among these variables. It is recommended to carry out greenhouse or nursery phase tests with the isolates Ho4, JK5 and Ho9.

Key words: *Moringa oleifera*, rhizobia, agro-physiological variables

*Moringa oleifera* Lam. is the best known species of the 13 identified in the *Moringa* genus (Font Quer 1975). It shows nutritional and pharmaceutical benefits, which make it highly promising for its promotion and use. One of the characteristics of this species is its rapid growth during the first year, where it can reach from 3 to 5 m high. For this reason, this plant is very demanding regarding mineral nutrition during the first year and its deficiencies are quickly observed in the foliage coloration (Pita-Hernández and García-Quiñones 2012).

The effect of beneficial rhizospheric bacteria on *Moringa oleifera* and other tree species not belonging to the Legume family has been studied by several authors (Zayed 2012 and Kannan and Rajendran 2015), but little is known about the effect of rhizobia about *Moringa*. However, results obtained by inoculating rhizobia in different crops not belonging to the Legume

Se efectuó un ensayo en condiciones controladas para evaluar el efecto de diferentes aislados nativos y cepas de referencia de rizobios en variables agrofisiológicas de *Moringa oleifera* Lam., así como seleccionar los mejores tratamientos para su evaluación en invernadero o vivero. Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con doce tratamientos y 14 repeticiones, se realizó un análisis de ANOVA. Diferencias entre medias por LSD de Fisher. Los valores con conteo de dígitos se transformaron por  $\sqrt{x}$ , y los datos porcentuales, por  $\arccos\sqrt{p}$ . Se calculó coeficiente de correlación entre variables. Se concluye que los aislados JK5, Ho9 y Ho5, ejercieron un efecto positivo superior en la germinación a los 10 y 15 días después de la siembra, así como en la mayoría de las variables. Sin embargo, las cepas de referencia mostraron un índice de eficiencia de la inoculación en el peso seco de la parte aérea, inferior al de los aislados nativos. El 50% de los tratamientos inoculados presentó valores superiores al control absoluto en peso seco de la parte aérea y en peso seco de la raíz, así como superiores al testigo fertilizado en ésta última variable. Por otra parte, la fertilización nitrogenada no mostró efecto positivo en ninguna de las variables que se evaluaron. Es de destacar que existió una correlación estadística moderadamente fuerte entre peso seco de la raíz y peso seco de la parte aérea, así como entre peso seco de la parte aérea e índice de velocidad de la germinación, lo que indica una alta interrelación fisiológica entre estas variables. Se recomienda efectuar ensayos de invernadero o en fase de vivero con los aislados Ho4, JK5 y Ho9.

Palabras clave: *Moringa oleifera*, rizobios, variables agrofisiológicas.

*Moringa oleifera* Lam. es la especie más conocida de las 13 identificadas en el género *Moringa* (Font Quer 1975). Presenta bondades nutricionales y farmacéuticas, que la hacen altamente promisorias para su fomento y utilización. Entre las características de esta especie está su rápido crecimiento durante el primer año, donde puede alcanzar de 3 a 5 metros de altura. Por ello es una planta muy exigente a la nutrición mineral durante el primer año y sus deficiencias se observan rápidamente en la coloración del follaje (Pita-Hernández and García-Quiñones 2012).

El efecto de las bacterias rizosféricas benéficas en *Moringa oleifera* y otras especies arbóreas no pertenecientes a la familia de las Leguminosas se ha estudiado por varios autores (Zayed 2012 y Kannan y Rajendran 2015), pero poco se conoce sobre el efecto de los rizobios en la *Moringa*. No obstante, resultados que se obtuvieron al inocular rizobios en diferentes cultivos no pertenecientes a la familia de las Leguminosas (Bécquer

family (Bécquer *et al.* 2012, 2013, 2015), demonstrate its usefulness for the phenological development and productivity of different crops. This fact is presumably stated due to their potential for the emission of substances that promote plant growth (Machado *et al.* 2013), as well as the solubility of phosphates (López *et al.* 2013), mechanisms that are responsible to induce a favorable response in the plant.

Although the use of organic fertilizers is recommended in Moringa sowing (Oquendo 2014), biofertilizers can substantially improve their effect, by the production of phytohormones and by the high enzymatic activity of rhizobacteria, which positively affect germination and phenological development of the plant, as well as its yield (Singh *et al.* 2011).

For these reasons, the general objective of this study was to evaluate the effect of native isolates and reference strains of rhizobia on the germination and incipient development of Moringa plantlet and select the most efficient with a view to a subsequent evaluation under greenhouse or nursery conditions.

### Materials and Methods

*Plant variety.* *Moringa oleifera* L., from Supergenius, provided by the Experimental Station of Pastures and Forages Sancti Spiritus.

*Bacterial material.* An amount of 2 reference strains and 8 native isolates was used, which were obtained from radical nodules belonging to forage legumes from cattle ecosystems of Cuba and previously characterized by Bécquer *et al.* (2016) (table 1).

*Substrate characteristics.* A non-sterile substrate was used, containing 40 % of organic matter, 40 % of a soft brown soil (Hernández *et al.* 2015), and 20 % of river sand. Its chemical characteristics are shown in table 2.

*Experimental procedure.* All reference strains and native isolates of rhizobia grew in solid yeast-mannitol

*et al.* 2012, 2013, 2015), demuestran su utilidad para el desarrollo fenológico y productividad de diferentes cultivos, presumiblemente por su potencial de emisión de sustancias promotoras del crecimiento vegetal, (Machado *et al.* 2013), así como de solubilización de fosfatos (López *et al.* 2013), mecanismos que son responsables de inducir una respuesta favorable en la planta.

Aunque se recomienda el uso de abonos orgánicos en la siembra de Moringa (Oquendo 2014), los biofertilizantes pueden mejorar sustancialmente su efecto, por la producción de fitohormonas y por la alta actividad enzimática de las rizobacterias, las cuales inciden positivamente en la germinación y desarrollo fenológico de la planta, así como en su rendimiento (Singh *et al.* 2011).

Por estas razones, el objetivo general del trabajo fue evaluar el efecto de aislados nativos y cepas de referencia de rizobios en la germinación y desarrollo incipiente de plántulas de Moringa y seleccionar los más eficientes con vistas a una posterior evaluación en condiciones de invernadero o vivero.

### Materiales y Métodos

*Variedad vegetal.* *Moringa oleifera* L., procedencia Supergenius, provista por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes Sancti Spiritus.

*Material bacteriano.* Se utilizaron 2 cepas de referencia y 8 aislados nativos, los cuales se obtuvieron de nódulos radicales pertenecientes a leguminosas forrajeras procedentes de ecosistemas ganaderos de Cuba y que se caracterizaron previamente por Bécquer *et al.* (2016) (tabla 1).

*Características del sustrato.* Se utilizó un sustrato no estéril, que contenía 40% de materia orgánica, 40% de suelo Pardo Mullido (Hernández *et al.* 2015), y 20% de arena de río. Sus características químicas se detallan en la tabla 2.

*Procedimiento experimental.* Todas las cepas de referencia y aislados nativos de rizobios crecieron en

Table 1. Reference strains and native isolates of rhizobia used in the experiment

Native isolates and strains	Genus and species	Macrosymbiont	Geographical origin
Strains of reference			
MSDJ 685	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	China
USDA 191	<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine max</i>	USA
Native isolates			
Ho1	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Centrosema virginianum</i>	Holguín, Cuba
Ho4	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Desmodium triflorum</i>	Holguín, Cuba
Ho5	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Desmodium triflorum</i>	Holguín, Cuba
Ho7	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Centrosema virginianum</i>	Holguín, Cuba
Ho8	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Centrosema virginianum</i>	Holguín, Cuba
Ho9	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Desmodium cannum</i>	Holguín, Cuba
Ho13	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Centrosema virginianum</i>	Holguín, Cuba
JK5	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Centrosema virginianum</i>	Sancti Spiritus, Cuba

Table 2: Chemical characteristics of substrate used in the experiment

Sample	Na	K	Ca	Mg	P	O.M.	pH
	Cmol/kg				(mg/kg)	(%)	H <sub>2</sub> O
Solid substrate	0.15	0.47	10.9	2.0	258	5.29	7.0

medium (Vincent 1970). They were re-suspended in a yeast-mannitol liquid medium until reaching a concentration of  $10^7$ - $10^8$  cfu/mL. Prior to inoculation, the inocula were dissolved in a sterile isotonic NaCl solution (0.9 %), in a 1:10 ratio.

*Sowing and inoculation.* The experiment was carried out in trays of Styrofoam, in glass house, where the plantlet grew under natural light conditions in chamber of 2500 to 3500 lux, with temperatures of  $\pm 27$  °C. The relative humidity was 75/85 % and 2 seeds were planted in each pot containing 120 g of substrate. At the time of planting, 5 mL of inoculum was applied per pot. When germinating, it was thinned to leave 1 plantlet.

Evaluated variables. Percentage of germination (10 d, 15 d and 20 d), according to the formula (Ede *et al.* 2015):

% G: Number of germinated seeds/number of sown seeds x 100

Germination Speed Index (GSI), according to the formula (Terry *et al.* 2014):

$$GSI = \sum (Ni/Ti)$$

Where:

Ni: Number of germinated seeds

Ti: Time from sowing

Inoculation Efficiency Index (IEI, %) (Santillana *et al.* 2012), according to the formula:

IEI: [(Inoculated treatment - Absolute control)/ Absolute control] x 100

In addition, at 20 days after sowing (DAS), stem length (SL, cm) was measured (with ruler graduated from the substrate level up to the apex of the apical branch), root length (RL, cm), number of leaves (NL), dry weight of the aerial part (DWAP, g) and dry weight of the root (DWR, g).

*Experimental design, treatments and statistical analysis.* In a completely randomized design, with twelve treatments (table 3) and 14 repetitions, an ANOVA analysis was performed. There was absolute control (AC), and the fertilized treatment (FT) consisted in an application of 23.84 mg of  $NH_4NO_3$ /pot, equivalent to 150 kgN/ha. Differences between means were determined by Fisher LSD test. The values with digit counting were transformed by  $\sqrt{x}$ , and the percentage data by  $\arcsin\sqrt{P}$ . The correlation coefficient among variables was calculated (Sigarroa 1985). The statistical program Stat Graphics Centurion (Stat Point Technologies 2010) was used.

medio sólido levadura-manitol (Vincent 1970). Se resuspendieron en medio líquido levadura-manitol hasta lograr concentración de  $10^7$ - $10^8$  UFC/mL. Previo a la inoculación, se disolvieron los inóculos en una solución isotónica estéril de NaCl (0.9 %), en proporción 1:10.

*Siembra e inoculación.* El experimento se realizó en bandejas de poliespuma, en casa de cristal, donde las plántulas crecieron en condiciones de luz natural en cámara de 2500 a 3500 lux, con temperaturas de  $\pm 27$  °C. La humedad relativa fue de 75/85 %. Se sembraron 2 semillas en cada pozuelo que contenían 120 g de sustrato. En el momento de la siembra se aplicaron 5 mL de inóculo por pozuelo. Al germinar, se raleó para dejar 1 plántula.

Variables que se evaluaron

% de germinación (10 d, 15 d y 20 d), según la fórmula (Ede *et al.* 2015):

% G: Número de semillas germinadas/número de semillas sembradas x 100

Índice de velocidad de germinación (IVG), según la fórmula (Terry *et al.* 2014):

$$IVG = \sum (Ni/Ti)$$

Donde:

Ni: No. de semillas germinadas

Ti: Tiempo transcurrido desde la siembra.

Índice de Eficiencia de la Inoculación (IEI, %) (Santillana *et al.* 2012), según la fórmula:

IEI: [(Tratamiento inoculado - Control absoluto)/ Control absoluto] x 100

Además, a los 20 días de siembra (DDS), se midió longitud del tallo (LT, cm) (con regla graduada desde el nivel del sustrato hasta el ápice de la rama apical), longitud de la raíz (LR, cm), número de hojas (NH), peso seco parte aérea (PSPA, g) y peso seco de la raíz (PSR, g).

*Diseño experimental, tratamientos y análisis estadístico.* En un diseño completamente aleatorizado, con doce tratamientos (tabla 3) y 14 repeticiones, se realizó un análisis de ANOVA. Hubo un control absoluto (C.A.), y el tratamiento fertilizado (T.F.) consistió en una aplicación de 23.84 mg de  $NH_4NO_3$ /pozuelo, equivalente a 150 kgN/ha. Las diferencias entre medias se determinaron por LSD de Fisher. Los valores con conteo de dígitos se transformaron por  $\sqrt{x}$ , y los datos porcentuales, por  $\arcsen\sqrt{P}$ . Se calculó el coeficiente de correlación entre variables (Sigarroa, 1985). Se utilizó el programa estadístico Stat Graphics Centurion (Stat Point Technologies 2010).

Table 3: Treatments used in the experiment

No.	Treatments
1	USDA 191 (reference strain)
2	MSDJ 865 (reference strain)
3	Ho1 (native strain)
4	Ho4 (native strain)
5	Ho5 (native strain)
6	Ho7 (native strain)
7	Ho8 (native strain)
8	Ho9 (native strain)
9	Ho13 (native strain)
10	JK5 (native strain)
11	Fertilized control (F.C.) (150 kgN/ha, NH <sub>3</sub> NO <sub>4</sub> )
12	Absolute control (A.C.)

### Results and Discussion

When evaluating the germination of seeds, it is observed that at 10 DAS, treatments inoculated with the isolates JK5 (64.3 %), and Ho9 (57.1 %) presented the highest values ( $P < 0.0001$ ) with relation to the rest of the treatments, which include absolute control (28.6 %) and fertilized control (35.7 %) (figure 1). However, at 15 DAS, JK5 shows lower values (85.7%) with respect to Ho5 (92.9 %) and Ho9 (92.9 %), which in turn were higher ( $P < 0.0001$ ) to the rest of the inoculated treatments, and they equal the fertilized control (92.9 %).

On the other hand, at 20 DAS, JK5 showed lower values (85.7 %) than Ho5 (92.9%), Ho9 (92.9 %) and Ho8 (92.9 %), which were higher ( $P < 0.0001$ ) than the rest of the inoculated treatments, although with similar values to the fertilized control (92.9 %) and absolute control (92.9 %).

None of the two reference strains significantly influenced germination throughout the evaluation period and showed low values at each time of evaluation, especially MSDJ 865.

These results indicate that the greatest impact of inoculation with rhizobia was performed at 15 DAS. Note that the JK5 isolate exerted a greater effect at 10 DAS, however, that treatment was lower than Ho5 and Ho8, as well as the fertilized control (15 and 20 DAS) and absolute control (20 DAS), however, the treatment inoculated with Ho9 maintained superiority in its values from 10 DAS to 20 DAS. The treatment inoculated with Ho8 was superior only at 20 DAS. Apparently, the hormonal substances emitted by different strains of these bacteria have a limited effect on the development of the embryo with respect to the time of application, which does not necessarily prevent its positive effect on other physiological variables of the plant. It is also possible that the effect on some seeds was delayed due to the impermeability of the seminal cortex, which causes a temporary dormancy and affects germination in a certain way (Kassa *et al.* 2010).

### Resultados y Discusión

Al evaluar la germinación de las semillas, se observa que a los 10 DDS, los tratamientos inoculados con los aislados JK5 (64.3%), y Ho9 (57.1%) presentan los valores superiores ( $P < 0.0001$ ) en relación con el resto de los tratamientos, donde se incluyen el control absoluto (28.6 %) y el testigo fertilizado (35.7 %) (figura 1). Sin embargo, a los 15 DDS, JK5 muestra valores inferiores (85.7 %) con respecto a Ho5 (92.9 %) y Ho9 (92.9 %), los cuales a su vez fueron superiores ( $P < 0.0001$ ) al resto de los tratamientos inoculados, e igualan al testigo fertilizado (92.9 %).

Por otra parte, a los 20 DDS, JK5 muestra valores inferiores (85.7 %) a Ho5 (92.9 %), Ho9 (92.9 %) y Ho8 (92.9 %), los cuales fueron superiores ( $P < 0.0001$ ) al resto de los tratamientos inoculados, aunque con valores similares al testigo fertilizado (92.9 %) y al control absoluto (92.9 %).

Ninguna de las dos cepas de referencia influyó notablemente en la germinación en todo el período evaluativo y sí mostraron valores bajos en cada momento de evaluación, sobre todo MSDJ 865.

Estos resultados indican que el mayor impacto de la inoculación con rizobios se realizó a los 15 DDS. Nótese que el aislado JK5 ejerció mayor efecto a los 10 DDS, sin embargo, ese tratamiento resultó inferior a Ho5 y Ho8, así como al testigo fertilizado (15 y 20 DDS) y al control absoluto (20 DDS), sin embargo, el tratamiento inoculado con Ho9 mantuvo superioridad en sus valores desde los 10 DDS hasta los 20 DDS. El tratamiento inoculado con Ho8 fue superior sólo a los 20 DDS. Al parecer, las sustancias hormonales emitidas por diferentes cepas de estas bacterias tienen un efecto limitado en el desarrollo del embrión con respecto al tiempo de aplicación, lo que no necesariamente impide su efecto positivo en otras variables fisiológicas de la planta. También es posible que el efecto en algunas semillas se retardó debido a la impermeabilidad de la corteza seminal, lo cual provoca dormancia temporal y afecta de cierto modo la germinación (Kassa *et al.* 2010).



Santillana *et al.* (2005) observed that 47 % of the evaluated rhizobia strains had a stimulating effect on tomato seeds, which resulted in better germination, possibly due to the ability of rhizobia to produce hormones such as indoleacetic acid, gibberellic acid and cytokinins, substances that regulate plant growth. Cassán *et al.* (2009) found that a strain of *Bradyrhizobium japonicum* that stimulated the germination and incipient development of the aerial part of maize, produced abundant indoleacetic acid, zeatin and gibberellic acid, which supports the possibility that these properties of rhizobia have had a positive effect on germination, with better results in treatments inoculated with the previously mentioned strains.

Santillana *et al.* (2005), observaron que el 47 % de las cepas de rizobios que evaluaron, presentaron efecto estimulante en las semillas de tomate, lo que resultó en una mejor germinación, posiblemente debido a la habilidad de los rizobios para producir hormonas como el ácido indolacético, ácido giberélico y citoquininas, sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas. Cassán *et al.* (2009) encontraron que una cepa de *Bradyrhizobium japonicum* que estimuló la germinación y el desarrollo incipiente de la parte aérea de maíz, produjo abundante ácido indolacético, zeatina y ácido giberélico, lo que sustenta la posibilidad que estas propiedades de los rizobios hayan incidido positivamente en la germinación, con mejores resultados en los tratamientos inoculados con las cepas antes mencionadas.

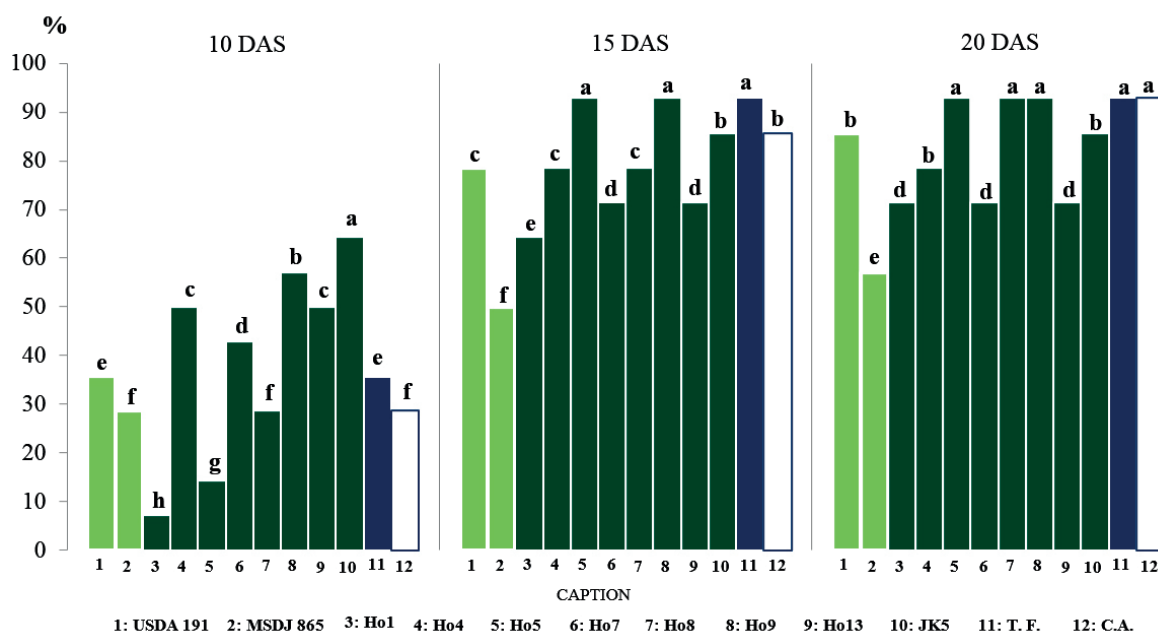


Figure 1. Percentage of germination of seeds of *Moringa oleifera*, at 10 DAS (SD: 0.0848,  $P < 0.0001$ ); 15 DAS (SD: 0.0699,  $P < 0.0001$ ) and 20 DAS (SD: 0.0661,  $P < 0.0001$ )

Figure 2 shows that the highest germination speed indexes (GSI) corresponded to the treatments inoculated with the Ho9 isolate (2.32), similar to the fertilized control (2.52), as well as JK5 (2.30). These treatments were superior ( $P < 0.0001$ ) to absolute control and to the rest of the evaluated treatments.

The GSI is an important variable related to vigor of seeds taking into account the number of these that germinate and the time they require to achieve it (Meot-Duros and Magné, 2008). According to Mia *et al.* (2012), the GSI determines the health state of the planlet and, finally, the productivity of the plant.

Evidently, treatments inoculated with the mentioned isolates had a significant influence on this variable. It is possible that these showed a higher activity of gibberellic acid, which can break the latency of seeds and frequently replace the need of environmental stimulus, such as light and temperature (Hernández 2004).

En la figura 2 se observa que los mayores índices de velocidad de la germinación (IVG), correspondieron a los tratamientos inoculados con el aislado Ho9 (2.32), similar al testigo fertilizado (2.52), así como JK5 (2.30). Estos tratamientos fueron superiores ( $P < 0.0001$ ) al control absoluto y al resto de los tratamientos que se evaluaron.

El IVG es una variable importante que se relaciona con el vigor de las semillas, al tener en cuenta el número de éstas que germinan y el tiempo que requieren para lograrlo (Meot-Duros y Magné, 2008). Según Mia *et al.* (2012), el IVG determina el estado de salud de la plántula y finalmente el estado de productividad de la planta.

Evidentemente, los tratamientos inoculados con los aislados que se mencionan, influyeron significativamente en dicha variable. Es posible que estos presentaron mayor actividad de ácido giberélico, el cual puede romper la latencia de las semillas y que frecuentemente reemplaza la necesidad de estímulos ambientales, tales

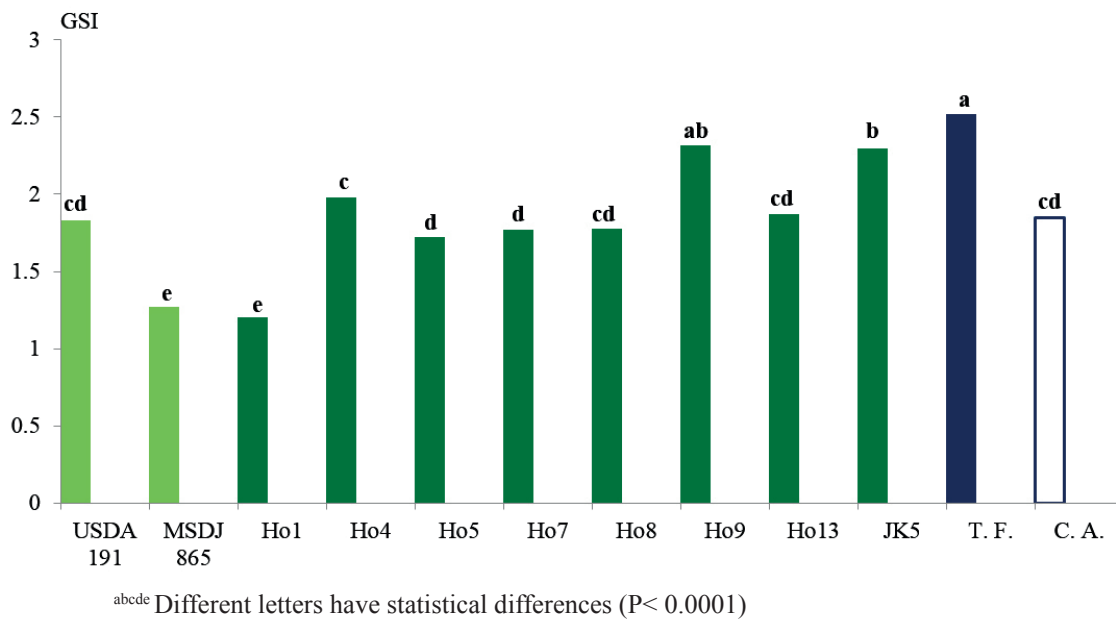


Figure 2. Germination Speed Index of seeds of *Moringa oleifera* (S.D.: 0.432,  $P < 0.0001$ )

Figure 3 shows the results of dry weight of the aerial part (DWAP), where the superiority of the inoculated treatment with the native JK5 (162.5 g/plant) isolate is evident, regarding the rest of the treatments. It is followed by Ho9 (137.5 g/plant), which was superior ( $P < 0.0001$ ) to absolute control (109.0 g/plant), fertilized control (119.9 g/plant), Ho13 (109.5 g/plant), Ho5 (104.9 g/plant), as well as the reference strain USDA 191 (115.2 g/plant) and MSDJ 865 (103.1 g/plant).

On the other hand, calculating the Inoculation Efficiency Index (IEI) (figure 4), based on the DWAP, it was confirmed that treatments inoculated with isolates JK5 (49.1 %) and Ho9 (26.1 %) showed the highest increases regarding the non-inoculated control. In general, a better efficiency of isolated natives was confirmed in this variable, compared to reference strains.

These results are in contradiction with those found by Mazher *et al.* (2014), who observed that inoculation with rhizobia had no positive effect on variables of aerial biomass in *Moringa oleifera*. It is not rejected the possibility that, in this experiment, this variable is related to the increase of values of dry weight of the root due to a strong enzymatic activity of the previously mentioned isolates, and, that way, could favor a higher absorption of nutrients by the plant (McCully 2001).

Figure 5 demonstrates that, in the number of leaves, the treatment inoculated with the isolate Ho9 (29) was superior ( $P < 0.0001$ ) to absolute control (23), to treatments inoculated with MSDJ 865 (21), Ho13 (21), Ho1 (22), Ho8 (22) and USDA 191 (23). Likewise, showed values similar to the fertilized control (28), and to treatments inoculated with JK5 (27), Ho7 (26), and Ho4 (26).

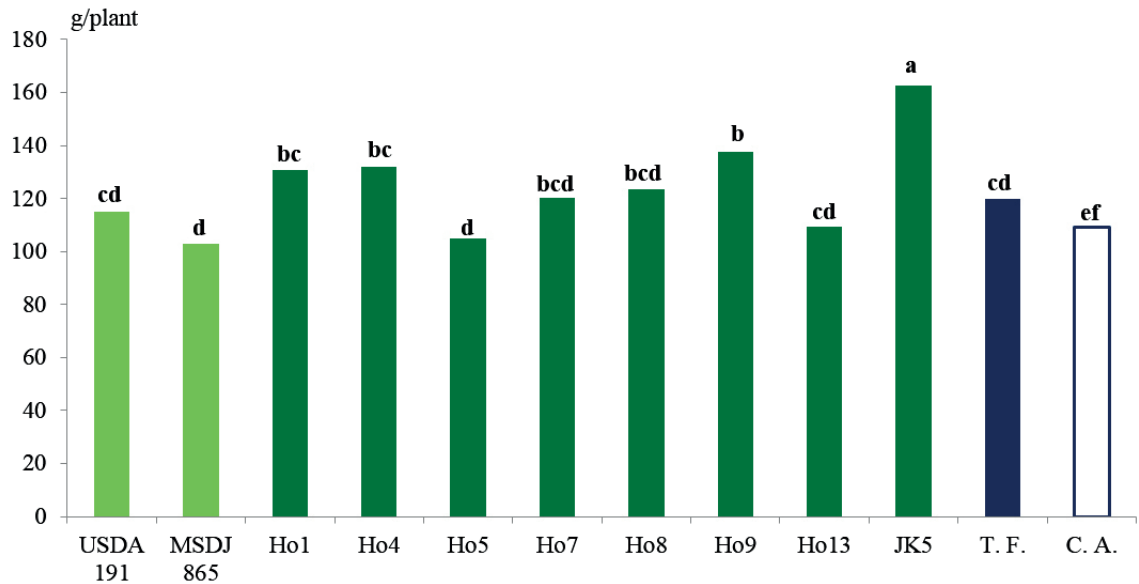
como luz y temperatura (Hernández, 2004).

En la figura 3 se muestran los resultados en el peso seco de la parte aérea (PSPA), donde se evidencia la superioridad del tratamiento inoculado con el aislado nativo JK5 (162.5 g/planta) con respecto al resto de los tratamientos, seguido por Ho9 (137.5 g/planta), el cual fue superior ( $P < 0.0001$ ) al control absoluto (109.0 g/planta), testigo fertilizado (119.9 g/planta), Ho13 (109.5 g/planta), Ho5 (104.9 g/planta), así como las cepas de referencia USDA 191 (115.2 g/planta) y MSDJ 865 (103.1 g/planta).

Por otra parte, al calcular el Índice de Eficiencia de la Inoculación (IEI) (figura 4), sobre la base del PSPA, se confirmó que los tratamientos inoculados con los aislados JK5 (49.1%) y Ho9 (26.1%) presentaron los mayores incrementos con respecto al control no inoculado. En general, se constató en dicha variable una mayor eficiencia de los aislados nativos, en comparación con las cepas de referencia.

Estos resultados están en contradicción con lo que Mazher *et al.* (2014) observaron, que la inoculación con rizobios no ejerció efecto positivo en las variables de biomasa aérea en *Moringa oleifera*. No se descarta la posibilidad que, en el presente experimento, esta variable esté relacionada con el incremento de valores en el peso seco de la raíz debido a la fuerte actividad enzimática de los aislados anteriormente mencionados, y así pudieran incidir en la mayor absorción de nutrientes por la planta (McCully 2001).

En la figura 5 se constata, en el No. de hojas, que el tratamiento inoculado con el aislado Ho9 (29) fue superior ( $p < 0,0001$ ) al control absoluto (23), a los tratamientos inoculados con MSDJ 865 (21), Ho13 (21), Ho1 (22), Ho8 (22) y USDA 191 (23). Así mismo, presentó valores similares al testigo fertilizado (28), y a los tratamientos inoculados con JK5 (27), Ho7 (26), y Ho4 (26).



abcde Different letters have statistical differences (P<0.001).

Figure 3. Dry weight of the aerial part of seedlings of *Moringa oleifera* (S.D.: 23.0031, P<0.001).

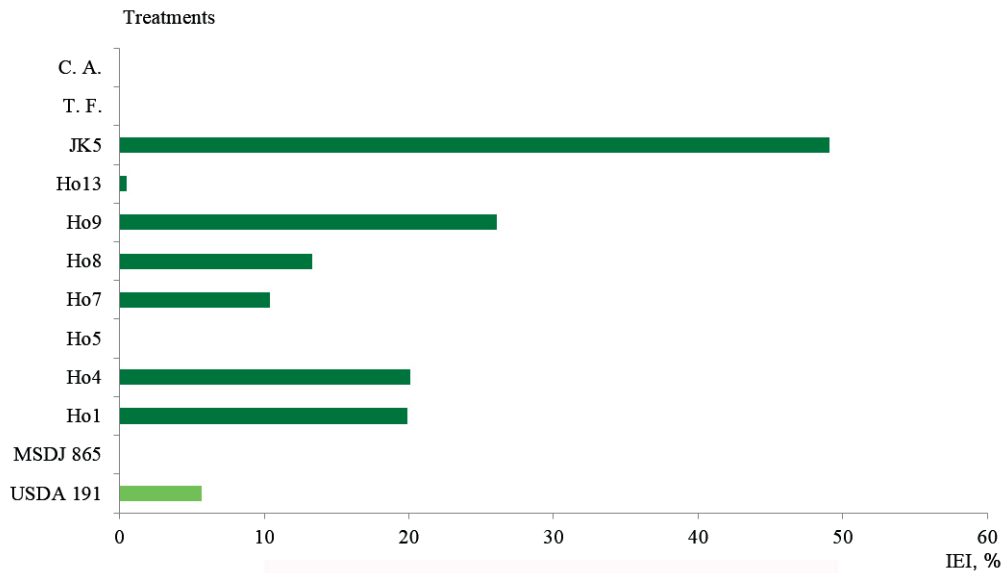
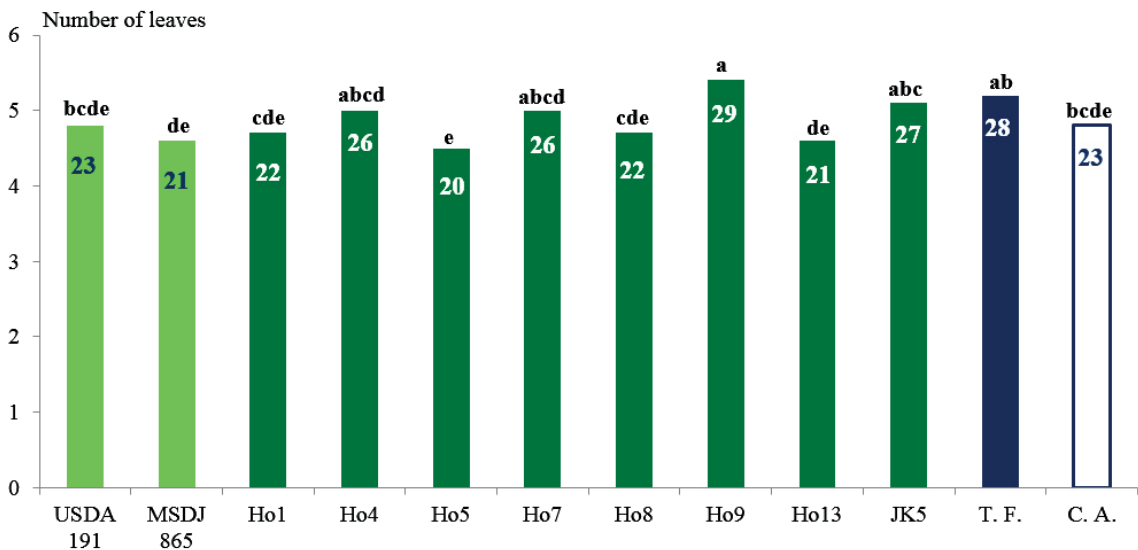


Figure 4. Inoculation Efficiency Index based on DWAP



abcde Different letters have significant differences (P<0.001). Figures within bars: original data, without transformation

Figure 5. Number of leaves per planlet of *Moringa oleifera* (Data transformed by  $\sqrt{x}$ : S. D.: 0.5702, P<0.001).

In this variable, there is a stimulating effect of one of the isolates (Ho9), which showed superior results in DWAP, and showed it in the amount of leaves.

According to Mia and Shamsudin (2010), auxin synthesis by rhizobia is widely demonstrated, so it is considered that there is a strong activity, in the isolate Ho9, of these enzymes, which are responsible for the apical dominance.

Although there is no abundant literature about the effect of rhizobia on this variable in Moringa, Mazher *et al.* (2014) found that the application of several commercial biofertilizers based on rhizobia and other plant growth stimulating bacteria had a favorable influence on the number of leaves/plant in Moringa, compared to the non-inoculated control.

Figure 6 shows, in the length of the stem (LT), that the treatment inoculated with the Ho7 native isolate (24.0 cm) had similar results to Ho8 (23.0 cm) and Ho9 (22.5 cm), as well as the fertilized control (22.4 cm) and was superior ( $P < 0.0001$ ) to the rest of the inoculated treatments, and to the absolute control (20.0 cm).

It is inferred that, according to these results, the production of phytohormones by the corresponding isolates, should have an impact not only on the root system, but through it could positively influence the development in the variables of the aerial part, like dry weight and stem length. In addition, Yanni *et al.* (2001) and Rosenblueth and Martínez-Romero (2006) considered that rhizobia and other microorganisms can penetrate the roots of non-legume species through the cracks or by the points of the lateral appearance of the root and settle in the xylem and in the intercellular spaces of the plants. Therefore, the radius of action of metabolites emitted by bacteria can reach far from the root system. According to reports by Mia *et al.* (2012), the elongation of the stem in rice seeds, when inoculated with different strains of rhizobia and dinitrofixer bacteria

En esta variable, se puede observar el efecto estimulador de una de los aislados (Ho9), que mostró resultados superiores en PSPA, y lo mostró también en la emisión de hojas.

Según Mia y Shamsudin (2010), la síntesis de auxinas por los rizobios se demuestra ampliamente, por lo que no se descarta que en el aislado Ho9 existiera una fuerte actividad de dichas enzimas, las cuales son responsables de la dominancia apical.

Aunque no se cuenta con literatura abundante sobre el efecto de los rizobios en esta variable en Moringa, Mazher *et al.* (2014) encontraron que la aplicación de varios biofertilizantes comerciales basados en rizobios y otras bacterias estimuladoras del crecimiento vegetal influyó favorablemente en el número de hojas/planta en Moringa, al compararlo con el control no inoculado.

En la figura 6 se observa, en la longitud del tallo (LT), que el tratamiento inoculado con el aislado nativo Ho7 (24.0 cm) mostró resultados similares a Ho8 (23.0 cm) y Ho9 (22.5 cm), así como al testigo fertilizado (22.4 cm) y fue superior ( $P < 0.0001$ ) al resto de los tratamientos inoculados, y al control absoluto (20.0 cm).

Es de inferir, de acuerdo con estos resultados, que la producción de fitohormonas por parte de los aislados correspondientes, debió incidir no sólo en el sistema radical, sino que a través de éste pudiera influir positivamente en las variables de desarrollo de la parte aérea, como peso seco y longitud del tallo. También Yanni *et al.* (2001) y Rosenblueth y Martínez-Romero (2006), consideraron que rizobios y otros microorganismos pueden penetrar las raíces de las especies no leguminosas a través de las grietas o por los puntos de la aparición lateral de la raíz y establecerse en el xilema y en los espacios intercelulares de las plantas, por lo que el radio de acción de los metabolitos emitidos por las bacterias puede llegar lejos del sistema radical. De acuerdo a informes de Mia *et al.* (2012), la elongación del tallo en semillas de arroz, al

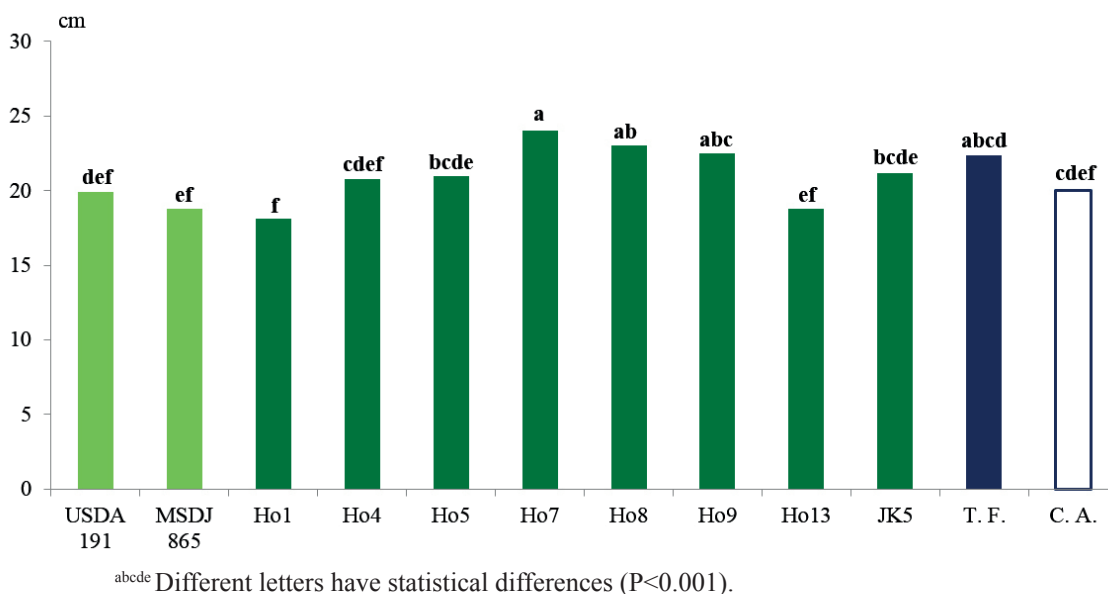


Figure 6. Stem length in seedlings of *Moringa oleifera* (SD: 3.1697,  $P < 0.001$ )



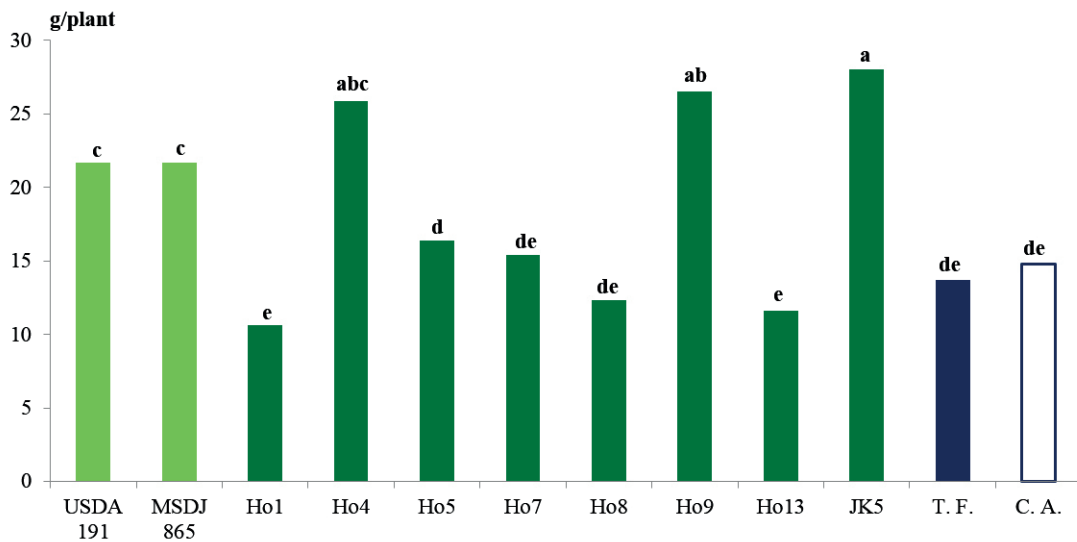
of free life, is due to the production of gibberellin by bacteria of both groups, so it is inferred that Ho7, Ho8 and Ho9, show high activity of this phytohormone

Also in the variable dry weight of the root (DWR) (figure 7), the treatment inoculated with the native isolate JK5 presented the highest value (28.0 g/plant) in comparison with most of the treatments, although its values coincide, in greater measure, with Ho9 (26.5 g/plant) and with Ho4 (25.9 g/plant). It was observed that 50 % of the inoculated treatments showed higher values ( $P < 0.0001$ ) than those of absolute control (14.8 g/plant) and the fertilized control (13.7 g/plant). When calculating the IEI based on this variable (figure 8), the superiority of treatments inoculated with JK5, Ho9 and Ho4 with respect to absolute control was verified, with indexes of 89.2 % (JK5) and 79.1 % (Ho9). The treatment inoculated with Ho4 (75.0 %) also showed higher increases.

Zayed (2012) found a significant increase of

ser inoculadas con diferentes cepas de rizobios y bacterias dinitro fijadoras de vida libre, se debe a la producción de giberelina por parte de las bacterias de ambos grupos, por lo que se infiere que Ho7, Ho8 y Ho9, presentan alta actividad de dicha fitohormona.

También en la variable peso seco de la raíz (PSR) (figura 7), el tratamiento inoculado con el aislado nativo JK5 presentó el mayor valor (28.0 g/planta) en comparación con la mayor parte de los tratamientos, aunque sus valores coinciden en mayor medida con Ho9 (26.5 g/planta) y con Ho4 (25.9 g/planta). Se observó que el 50 % de los tratamientos inoculados mostraron valores superiores ( $P < 0.0001$ ) a los del control absoluto (14.8 g/planta) y del testigo fertilizado (13.7 g/planta). Al calcular el IEI sobre la base de esta variable (figura 8), se comprobó la superioridad de los tratamientos inoculados con JK5, Ho9 y Ho4 con respecto al control absoluto, con índices de 89.2 % (JK5), 79.1 % (Ho9). El tratamiento inoculado con Ho4 (75.0 %) también mostró incrementos



abcde Different letters have statistical differences ( $P < 0.001$ ).

Figure 7: Dry weight of the root in plantlets of *Moringa oleifera* (SD.: 7,3338,  $P < 0.001$ ).

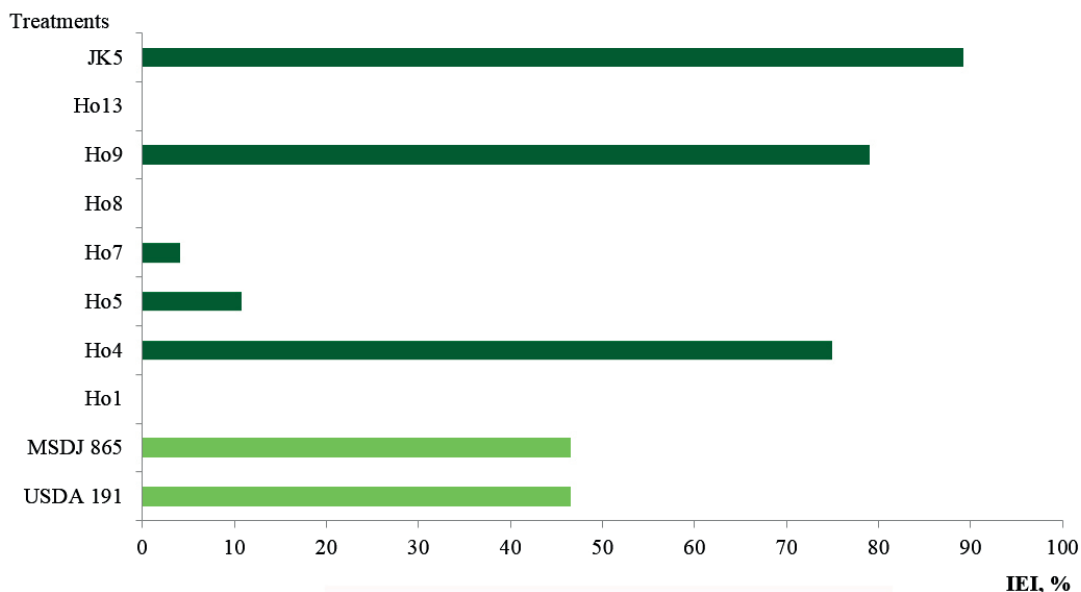


Figure 8: Inoculation Efficiency Index based on DWR

length and dry weight of the root of *Moringa oleifera*, when inoculated with *Azotobacter chroococcum* and *Sacharomyces cerevisiae*, which, like rhizobia, produce substances that stimulate plant growth. In this regard, Perrine *et al.* (2004), as well as Kumari *et al.* (2009), maintain that growth-promoting molecules such as indoleacetic acid, gibberellins and cytokinins produced by the rhizobia present, either in the rhizosphere or in plant tissues, stimulate the highest radical development and increase the absorption ability of root nutrients to its benefit.

In the length of the main root (LMR) (figure 9), the treatment inoculated with Ho7 was superior ( $P < 0.0001$ ) to the rest of the treatments, with values of 9.2 cm, except for the absolute control (8.3 cm) and Ho8 (8.1 cm).

These results do not agree with authors like Mayak *et al.* (2004), who mention the ability of rhizobia to produce ACC (1-aminocyclopropane, 1-carboxylic acid) deaminase. This compound reduces the level of ethylene in the roots of plants, since ACC is its precursor, with the consequent increase of the length and growth of roots when decreasing this compound. It is inferred that, in spite of the treatments inoculated with Ho7 and Ho8, they excelled with respect to those inoculated with the rest of the strains and native isolates applied, in general, the production of substances that stimulate plant growth by rhizobia, did not favor the longitudinal development of the radicle. According to Lynch (1983), auxins, which are produced by rhizobia and other rhizobacteria, inhibit the elongation of plant roots, although they favor their thickening.

When calculating the correlation between DWAP and DWR, in the inoculated treatments, it was determined that the coefficient was 0.57 ( $P < 0.0001$ , SE: 24.09). The correlation between DWAP and GSI was also calculated, where the coefficient was similar to the previous one:

superiores.

Zayed (2012) encontró un aumento significativo de la longitud y peso seco de la raíz de *Moringa oleifera*, al inocularla con *Azotobacter chroococcum* y *Sacharomyces cerevisiae*; microorganismos los cuales, al igual que los rizobios, producen sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal. En tal sentido, Perrine *et al.* (2004), así como Kumari *et al.* (2009), sostienen que las moléculas promotoras del crecimiento como el ácido indolacético, las giberelinas y las citoquininas producidas por los rizobios presentes, ya sea en la rizosfera o en tejidos de las plantas, estimulan el mayor desarrollo radical e incrementan la capacidad de absorción de nutrientes de la raíz en su beneficio.

En la longitud de la raíz principal (LRP) (figura 9), el tratamiento inoculado con Ho7 fue superior ( $P < 0.0001$ ) con valores de 9.2 cm al resto de los tratamientos, excepto al control absoluto (8.3 cm) y Ho8 (8.1 cm).

Estos resultados no concuerdan con autores como Mayak *et al.* (2004) quienes hacen mención sobre la habilidad de los rizobios para producir ACC (1-AminoCiclopropano, 1-Ácido Carboxílico) diaminasa, compuesto que reduce el nivel de etileno en las raíces de las plantas, por ser ACC su precursor, con el consiguiente incremento de la longitud y el crecimiento de las raíces al disminuir dicho compuesto. Se infiere que a pesar de que los tratamientos inoculados con Ho7 y Ho8, sobresalieron con respecto a los inoculados con el resto de las cepas y aislados nativos que se aplicaron, en general, la producción de sustancias estimuladoras del crecimiento vegetal por parte de los rizobios, no favoreció el desarrollo longitudinal de la radícula. Según Lynch (1983), las auxinas, las cuales son producidas por los rizobios y otras rizobacterias, inhiben la elongación de las raíces de las plantas, aunque favorecen su engrosamiento.

Al calcular la correlación entre PSPA y PSR, en los tratamientos inoculados, se determinó que el coeficiente fue de 0.57 ( $P < 0.0001$ ; E. E.: 24.09), También se calculó la correlación entre PSPA y el IVG, donde el coeficiente

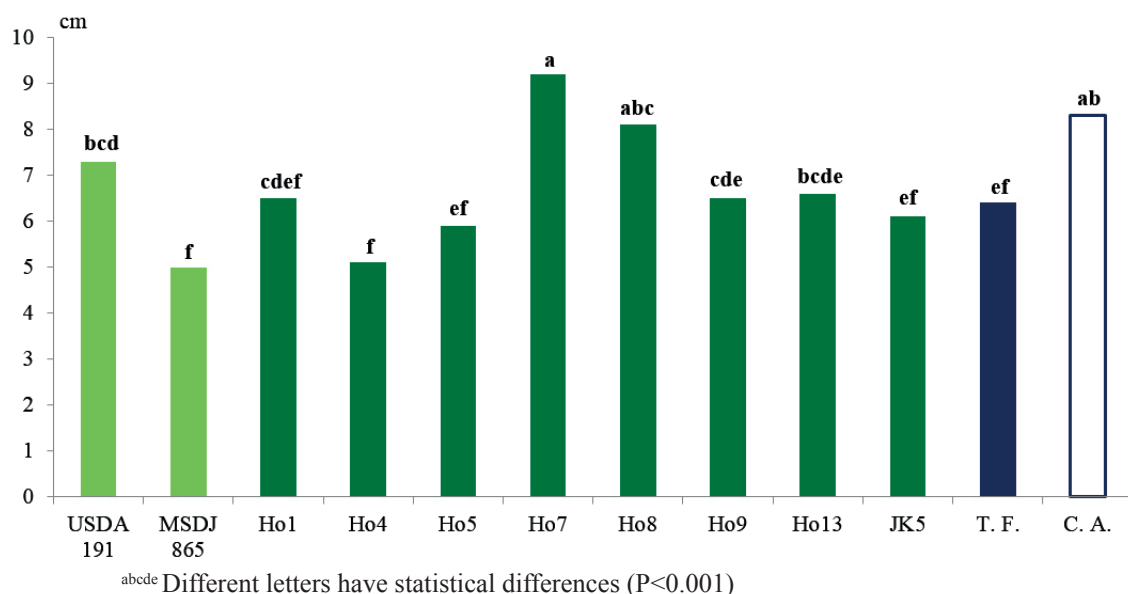


Figure 9. Length of the main root in plantlets of *Moringa oleifera* (SD: 2.1370,  $P < 0.001$ ).

0.60 ( $P < 0.05$ , SE: 15.22). Both coefficients indicate a moderately strong relationship among variables (Sigarroat 1985).

Data suggest a close physiological relationship between the variables analyzed in those treatments where rhizobia strains were applied, where the correlation between the DWAP and GSI draws attention, which indicates a possible dependence on the development of aerial biomass with respect to vigor of seeds. The strong correlation between DWAP and DWR could explain the results obtained in both variables, where the treatments inoculated with Ho9 and JK5 presented superior values, indistinctly of the evaluated variable.

It is concluded that isolates JK5, Ho9 and Ho5 had a superior positive effect on germination at 10 and 15 DAS, as well as in most of the variables. However, the reference strains showed an Inoculation Efficiency Index in DWAP, inferior to that of the native isolates. The 50 % of inoculated treatments showed higher values than absolute control in DWAP and DWR, as well as higher than the control fertilized in the latter variable. On the other hand, nitrogen fertilization did not show a positive effect on any of the evaluated variables. It is noteworthy that there was a moderately strong statistical correlation between DWR and DWAP, as well as between DWAP and GSI, which indicates a high physiological interrelation among these variables.

It is recommended to carry out assays in Green houses or in nursery phase with the isolates Ho4, JK5 and Ho9.

fue similar al anterior: 0,60 ( $p < 0,05$ ; E. E.: 15,22). Ambos coeficientes indican una relación entre variables moderadamente fuerte (Sigarroat, 1985).

Los datos que se muestran sugieren una estrecha relación fisiológica entre las variables analizadas en aquellos tratamientos donde se aplicaron las cepas de rizobios, donde llama la atención la correlación entre el PSPA y el IVG, lo que indica una posible dependencia del desarrollo de la biomasa aérea con respecto al vigor de las semillas. La correlación fuerte entre PSPA y PSR pudiera explicar los resultados que se obtuvieron en ambas variables, donde los tratamientos inoculados con Ho9 y JK5 presentaron valores superiores, indistintamente de la variable que se evaluó.

Se concluye que los aislados JK5, Ho9 y Ho5, ejercieron un efecto positivo superior en la germinación a los 10 y 15 DDS, así como en la mayoría de las variables. Sin embargo, las cepas de referencia mostraron un índice de eficiencia de la inoculación en PSPA, inferior al de los aislados nativos. El 50% de los tratamientos inoculados presentó valores superiores al control absoluto en PSPA y en PSR, así como superiores al testigo fertilizado en ésta última variable. Por otra parte, la fertilización nitrogenada no mostró efecto positivo en ninguna de las variables que se evaluaron. Es de destacar que existió una correlación estadística moderadamente fuerte entre PSR y PSPA, así como entre PSPA e IVG, lo que indica una alta interrelación fisiológica entre estas variables.

Se recomienda efectuar ensayos de invernadero o en fase de vivero con los aislados Ho4, JK5 y Ho9.

## References

- 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, ISSN: 2079-3480.
- Bécquer, C. J., Lazarovits, G., Nielsen, Laura, Quintana, Maribel, Adesina, Modupe, Quigley, Laura, Lalin, I. & Ibbotson, C. 2015. Efecto de la inoculación con bacterias rizosféricas y *Trichoderma* en trigo (*Triticum aestivum* L.). Pastos y Forrajes. 38(1): 111-116.
- Bécquer, C. J., Nápoles, J. A., Álvarez, O., Ramos, Y., Quintana, M. & Galdo, Y. 2012. Respuesta de diferentes variedades de cereales a la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas. 3(1): 187-200.
- Bécquer, C. J., Salas, B., Slaski, J., Archambault, D. & Anya, A. 2013. Influence of rhizospheric bacteria on germination and initial growth of *Sporobolus cryptandrus* (Torr.) A. Gray. Cuban Journal of Agricultural Science, 47(4): 431-436.
- 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: 28-31.
- Ede, A. E., Ndubuaku, U. M. & Baiyeri, K. P. 2015. Media Effects on Emergence and Growth of Moringa (*Moringa oleifera* Lam) Seedlings in the Nursery. American Journal of Experimental Agriculture, 7(3): 182–189, ISSN: 2231-0606.
- Font Quer, P. 1975. Diccionario Botánico. Edit. Labor S.A. Barcelona. 1244 p. ISBN: 84-335-5804-8.
- Hernández, S. V. 2004. Efecto de la luz, temperatura y ácido giberélico sobre la germinación de semillas de poblaciones de chiles silvestres. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa. Primer Convenio Mundial del Chile, p. 441.
- Hernández, A., Pérez, J. M., Bosch, D. & Castro, N. 2015. Clasificación de los Suelos de Cuba 2015. Ediciones INCA. Mayabeque, Cuba, 64 p. ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Kannan, M. & Rajendran, K. 2015. A sustainable agro-biotechnology for quality seedling production of *Jatropha curcas* L. in tropical nursery conditions. Int. Curr. Res. Aca. Rev. 3(2): 92-103.
- Kassa A., Alia R., Tadesse W., Pando V. & Bravo F. 2010. Seed germination and viability in two African Acacia species growing under different water stress levels. African J. Pl. Sci. 4(9): 353-359.
- Kumari, B.S., Ram, M. R. & Mallaiiah, K. V. 2009. Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by Rhizobium strains from Indigofera. African Journal of Microbiology Research. 3: 10 - 14.
- López, M. del P., Criollo, P. J., Gómez, R. M., C., M., Estrada, G., Garrido, M. F. & Bonilla, R. 2013. Caracterización de

- bacterias diazotróficas solubilizadoras de fosfato como promotoras de crecimiento en plantas de maíz. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 15(2): 115-123.
- Lynch, J. M. 1983. *Soil biotechnology. Microbial factors in crop productivity.* Blackwell Scientific Publications. 191 p. ISBN 0 632 00952 7.
- Machado, R. G., de Sá, E. L. S., Bruxel, M., Giongo, A., Santos, N. da S. & Nunes, A. S. 2013. Indoleacetic Acid Producing Rhizobia Promote Growth of Tanzania grass (*Panicum maximum*) and Pensacola grass (*Paspalum sauriae*). *International Journal of Agriculture & Biology*, 15(5): 827–834, ISSN: 1560–8530, 1814–9596.
- Mayak, S., Tirosh, T. & Glick, B. 2004. Plant growth promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42: 565-572.
- Mazher, A., Abdel-Aziz, N., El-Dabh, R. S., El-Khateeb, M. A. & Abd El-Badaie, A. A. 2014. Effect of biofertilization on growth and constituents of *Moringa oleifera* Lam. *Plants. Middle East Journal of Agriculture Research*. 3(4): 793-798.
- McCully M. E. 2001. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28: 983 - 990.
- Meot-Duros, L. & Magné, C. 2008. Effect of salinity and chemical factors on seed germination in the halophyte *Crithmum maritimum*. *Plant and Soil*. 313(1-2): 83-87.
- Mía, M. A. B. & Shamsuddin, Z. H. 2010. Rhizobium as a crop enhancer and biofertilizer for increased cereal production". *African Journal of Biotechnology*. 9(37): 6001-6009.
- Mía, M.A. B., Shamsuddin, Z. H. & Mahmood, M. 2012. Effects of rhizobia and plant growth promoting bacteria inoculation on germination and seedling vigor of lowland rice. *African Journal of Biotechnology*. 11: 3758-3765.
- Oquendo, G. 2014. Descripción, establecimiento y uso de las principales arbóreas: *Moringa oleifera*. In: *Uso de arbóreas como recurso sostenible para la crianza animal.* Ed.: José M. Argenter, Holguín. Cuba. 112 p.
- Perrine, F., Rolfe, B., Hynes, M. & Hocart, C. 2004. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of indoleacetic acid and tryptophan following aqueous chloroformate derivatisation of Rhizobium exudates. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42: 723 - 729.
- Pita-Hernández, A., García-Quiñones, E. 2012. Efectos del *Glomus fasciculatum* en la nutrición de *Moringa oleifera* Lam. *Rev. Avances*. 14(3): 241-250.
- Rosenblueth, M., Martínez-Romero, E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(8): 827 – 837.
- Santillana, N., Arellano, C. & Zúñiga, D. 2005. Capacidad del Rhizobium de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecología Aplicada*. 4(1,2): 47-51.
- Santillana, N., Zúñiga, D., Arellano, C. 2012. Capacidad promotora del crecimiento en cebada (*Hordeum vulgare*) y potencial antagonico de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium etli*. *Agrociencia Uruguay*. 16(2):11-17.
- Sigarroa, A. 1985. *Biometría y diseño experimental. I Parte.* Ed. Pueblo y Educación. 394 p. SNLC.CU 01.2665 1.9.
- Singh, J., Pandey, C., Singh, D.P. 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 140: 339–353.
- Stat Point Technologies 2010. *Statgraphics Centurion version XVI.* Available: <<http://statgraphics-centurion software.informser.com/download/>>
- Terry, E., Ruiz, J., Tejada, T. & Reynaldo, I. 2014. Efectividad agrobiológica del producto bioactivo Pectimorf® en el cultivo del Rábano (*Raphanus sativus* L.) . *Cultivos Tropicales*. 35(2): 105-11.
- Vincent, J. M. 1970. *A manual for the practical study of root nodules bacteria.* Blackwell Sci. Publications. Oxford and Edinburgh. 164 p.
- Yanni, Y., Rizk, R., Fattah, F. K. & Squartine, A. 2001. The beneficial plant growth promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice root. *Australian Journal of Plant Physiology*. 28: 845 - 870.
- Zayed, M. S. 2012. Improvement of growth and nutritional quality of *Moringa oleifera* using different biofertilizers. *Annals of Agricultural Sciences*. 57(1): 53–62.

**Received: March 8, 2018**