

Rhizobia isolated from forage legumes of an arid cattle rearing ecosystem in Holguín, Cuba. Morpho-cultural evaluation and nodulation (phase I)

Rizobios aislados de leguminosas forrajeras de un ecosistema ganadero árido de Holguín, Cuba. Nodulación y evaluación morfocultural (fase I)

C. J. Bécquer¹, Yaldreisy Galdo¹, Yamilka Ramos¹, Maida D. Peña², N. Almaguer², Y. F. Peña²,
Analeidis Mirabal¹, Maribel Quintana¹ and Adelaida Puentes³

¹Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, Estación Experimental Sancti Spiritus, Apartado 2255, ZP. 1, C. P. 62200, Sancti Spiritus, Cuba

²Centro de Estudios para Ecosistemas Áridos, Universidad de Holguín, Cuba

³Universidad "José Martí Pérez", Sancti Spiritus, Cuba

Email: pastosp@enet.cu

Radical nodules of naturalized and native forage legumes of arid ecosystems in Holguín, Cuba (*Desmodium canum*, *D. triflorum*, *Centrosema virginianum*, *Indigofera mucronata* and *Alysicarpus vaginalis*). An amount of 20 isolates were conducted in order to identify them as rhizobia and determine their morphocultural and staining characteristics. Nodules were macerated and its content was cultivated in specific media. Likewise, plantlets of *Macroptilium atropurpureum* were inoculated for identifying isolates. From them, 11 were identified as rhizobia due to their genotype and their ability to form nodules in *M.atropurpureum*. Three groups of colonies with different morphological characteristics were formed, all of them with slow or very slow growth, as well as with alkali production in the medium, except an isolate that produced an acid and four without reaction. It can be concluded that the 11 isolates that formed three groups of slow growth belonged to the Bradyrhizobiaceae family. However, isolates of *Alysicarpus vaginalis* and *Indigofera mucronata* showed no characteristics as rhizobia. Most of the isolates come from *Centrosema virginianum* and it was observed that growth in all groups was slow or very slow. Nevertheless, colony diameter, acid or alkali production and gum formation had a sensitive variation among formed groups. It is suggested to carry out assays of phenotype and genotype, in order to determine more exactly their taxonomical position up to species level.

Key words: forage legumes, phenotype, Bradyrhizobium

Se colectaron nódulos radicales de leguminosas forrajeras nativas o naturalizadas de ecosistemas áridos de Holguín, Cuba: *Desmodium canum*, *D. triflorum*, *Centrosema virginianum*, *Indigofera mucronata* y *Alysicarpus vaginalis*. Se realizaron 20 aislados con el objetivo de identificarlos como rizobios y determinar sus características morfoculturales y tintoriales. Se maceraron los nódulos y su contenido se sembró en medios específicos. Asimismo, se inocularon plántulas de *Macroptilium atropurpureum* para la identificación de los aislados. De estos, 11 se identificaron como rizobios por su fenotipo y por formar nódulos en *M.atropurpureum*. Se formaron tres grupos de colonias con diferentes características morfológicas, todas con lento o muy lento crecimiento, así como con producción de álcali en el medio, excepto un aislado que produjo ácido y cuatro sin reacción. Se concluye que los 11 aislados que formaron tres grupos de lento crecimiento, pertenecen a la familia Bradyrhizobiaceae. Sin embargo, los aislados de *Alysicarpus vaginalis* e *Indigofera mucronata* no presentaron características como rizobios. La mayor parte de los aislados proceden de *Centrosema virginianum* y se observó que el crecimiento en todos los grupos fue lento o muy lento. Sin embargo, el diámetro de las colonias, la producción de ácido o álcali, así como la formación de goma, varió sensiblemente entre los grupos formados. Se recomienda realizar ensayos de fenotipo y genotipo con el fin de determinar de forma más exacta su posición taxonómica hasta el nivel de especie.

Palabras clave: leguminosas forrajeras, fenotipo, Bradyrhizobium.

Legumes are a rich source of proteins for human and cattle feeding. Legume production depend, considerably, on molecular nitrogen fixation, which is performed in symbiosis with specific rhizobia species. There are around 19.000 legume species and most of them are not used by humans. There is only knowledge about symbionts for around 1 % of legumes that form nitrogen-fixer nodules (Villanueva and Quintana 2012).

Holguín province, Cuba, shows 45 % of the agricultural areas with low or very low productive soils. These last are affected by compaction, salinization, drought, acidity and deficient irrigation (Turrulles and Daley 2009). According to Oquendo *et al.* (2013), these limiting factors, with other climatic and physiographic ones, affect the encouraging and exploitation of

Las leguminosas son ricas como fuente de proteínas para la alimentación humana y para el ganado. La producción de plantas leguminosas depende, en gran medida, de la fijación de nitrógeno molecular que realiza en simbiosis con especies específicas de rizobios. Existen aproximadamente 19.000 especies de leguminosas, y la mayoría aún no se aprovechan por el hombre. Solo se conocen los simbioses para aproximadamente 1 % de las leguminosas que forman nódulos fijadores de nitrógeno(Villanueva y Quintana 2012).

La provincia de Holguín, Cuba, presenta 45 % del área agrícola con suelos poco productivos o muy poco productivos. En estos últimos incide la compactación, la salinización, la sequía, la acidez y el drenaje deficiente (Turrulles y Daley 2009). Según Oquendo *et al.* (2013), estos factores limitantes, y otros de carácter climático y

grasslands in that region. Rhizobia, with constitute microsymbionts of legumes, prospected in the study area, in order to survive under stressing conditions of drought, developed an adapting system, so their characterization and future agronomic selection constitute an essential step to exploit their physiological potential as inducers of tolerance to water stress in plants (Vanderlinde *et al.* 2010, Fitouri *et al.* 2012).

Phenotypical characterization of rhizobia adapted to stressing conditions in soils, constitute one of the first stages for obtaining an effective inoculant that allows a better establishment of legumes and, consequently, increasing food production and reducing the use of nitrogen fertilizers. In spite of the wide use of molecular biology techniques for characterizing these bacteria, many of the traditional phenotypic analysis are used because they evaluate ecological and physiological functions of cells, which favor their taxonomical location (Bécquer 2002).

The objective of this study was to identify and evaluate morphocultural and staining characteristics of rhizobia isolated from forage legumes from an arid cattle ecosystem in Holguín, Cuba, for their further use in agricultural practices under stressing conditions.

Materials and Methods

Nodule collecting site. Nodule collecting was performed in the area known as “Monte Alto”, from the municipality of Calixto García, Holguín province, under semi-intensive cattle rearing conditions. This region is located at a longitude of 73.3740 and a latitude of 20.4410 (UTM).

Characteristics of the climate of collecting site. It is characterized by low precipitations, although relative humidity is high (table 1). During the specific collection period (from 10 to 20 of July), total rain is almost 50 % of the month, which could favor, in a way, nodulation of legumes.

Soil characteristics of collection site. The soil is Vertisol, dark plastic gley, yellowish gray, on transported materials. It is usually carbonated, deep, moderately humified, with little erosion and weakly saline, carbonated, with frank clay and very little gravel. It has 60 cm depth and flat relief (Hernández *et al.* 1999). Macronutrient content was low in phosphorus, although potassium showed little high levels (Table 2).

Nodule prospection. For a representative sampling, between 15 and 20 subsamples were taken at random

fisiográfico, inciden negativamente en el fomento y la explotación de pastizales en esa región. Los rizobios, que constituyeron microsimbiontes de las leguminosas pratenses prospectadas en la zona de estudio, para poder sobrevivir en las condiciones estresantes de sequía desarrollaron un sistema de adaptación, por lo que su caracterización y posterior selección agronómica, constituyen un paso obligado para explotar su potencial fisiológico como inductores de tolerancia al estrés hídrico en las plantas (Vanderlinde *et al.* 2010, Fitouri *et al.* 2012).

La caracterización fenotípica de rizobios adaptados a condiciones estresantes en los suelos constituye una de las primeras etapas para la obtención de un inoculante efectivo, que permita un mejor establecimiento de las leguminosas y con ello, incrementar la producción de alimentos y reducir el empleo de fertilizantes nitrogenados. A pesar de la amplia utilización de técnicas de biología molecular en la caracterización de estas bacterias, se mantienen muchos de los análisis fenotípicos tradicionales, pues estos evalúan las funciones fisiológicas y ecológicas de la célula, lo que favorece su ubicación taxonómica (Bécquer 2002).

El objetivo de este trabajo fue identificar y evaluar las características morfoculturales y tintoriales de rizobios aislados de leguminosas forrajeras de un ecosistema ganadero árido de Holguín, Cuba, con el propósito de utilizarlos en un futuro en la práctica agrícola en condiciones estresantes.

Materiales y Métodos

Sitio de colecta de nódulos. Se realizó la colecta de nódulos en la zona conocida por “Monte Alto”, perteneciente al municipio Calixto García, provincia de Holguín, en condiciones de ganadería semintensiva. Esta región se halla ubicada a una longitud de 73.3740 y latitud de 20.4410 (UTM).

Características de clima en el sitio de colecta. Se caracteriza por escasas precipitaciones, aunque la humedad relativa es alta (tabla 1). En el período específico de colecta (2da decena de Julio), la lluvia total constituye casi 50 % de la del mes, lo que pudo favorecer, de cierta forma, la nodulación de las leguminosas.

Características del suelo del sitio de colecta. El suelo es de tipo Vertisuelo, oscuro plástico gleysado, gris amarillento, sobre materiales transportados. Es generalmente carbonatado, profundo, medianamente humificado, con poca erosión y débilmente salino, carbonatado, con arcilla franca y muy poca graviliosidad. Cuenta con 60 cm de profundidad efectiva y relieve llano (Hernández *et al.* 1999). El contenido de macronutrientes

Table 1. Climate data from the collecting site

Month	Mean temperature	Absolut max. temperature	Mean relative humidity, (%)	Total rain, (mm)	Max. rain up to 24 h, (mm)
July	27.6	34.5	82	90.5	31.2
From July 10th to 20th	27.4	33.2	85	44.5	22.2

Table 2. Basic characteristics of soil from collecting site

P ₂ O ₅ mg/100g	K ₂ O mg/100g	M.O. %	pH
5.0	57.77	3.01	7.35

in a pattern of W or zigzag. To avoid drying of nodules, soil and root samples were taken at the same time (Perez *et al.* 2011). Vigorous plants, on the phenological stage of early flowering, were selected, with no evidence of pest attacks or diseases. Legume root nodule extraction and their later preservation was performed according to Somasegaran and Hoben (1994), so one soil section was cut with a shovel at no less than 15.0 cm around the plant and, at least, 20.0 cm deep. Nodules, together with roots, were preserved in containers with CaCl₂, for their conservation and moving.

Rhizobia isolation. Rhizobia were isolated according to the method of Date and Halliday (Date 1982). They were sterilized in 95 % ethanol (30 s), 4-6 % sodium hypochlorite (2-3 min) and were rinsed in sterile distilled water. Their strains were isolated from a compression made with a sterile glass macerator to extract its contents. Culture was carried out in a mannitol-yeast solid medium with Congo red (CR) (Vincent 1970) and was incubated at 28 °C for 10 d. Those colonies with cultural characteristics similar to rhizobia, which did not absorb Congo red, were selected, and successive passes of them were performed in the previously described medium to obtain a pure culture. Later, they were preserved in wedges of this same medium at 4 °C. Culture purity, as well as their staining and morphological characteristics, were determined by Gram staining method (Somasegaran and Hoben 1994, Parker 2012).

Identification of isolates. Rhizobia identity was confirmed by its ability to cause nodulation in *Macropodium atropurpureum* (Vincent 1970) in test tubes of 150 x 25 cm, containing a nitrogen-free Hoagland agar nutrient solution, as described by Bécquer (2002), with arrangements in Fe source with the use of Fe₂Na₂EDTA in substitution of FeC₆H₅O₇·H₂O. Therefore, fresh inocula from each isolated strains were used, with approximate titer of 10⁸ cells/mL, from which 1.0 mL was added to each tube. Seeds were sterilized with sodium hypochlorite (2.5 %) (Somasegaran and Hoben 1994) and were scarified in hot water at 80-90 °C (2-3 min) before culture. Plantlets were grown in a chamber of Phytotron controlled conditions (Korea), with intervals of 16 h-light (300 µE/m²/s) at 26 °C during the day and 22 °C overnight. Relative humidity was 75/85 %. After two weeks, plantlets were examined to confirm nodulation. Likewise, growth in peptone-glucose-agar was evaluated according to Somasegaran and Hoben (1994) methodology.

fue bajo en fósforo, aunque el potasio presentó niveles algo elevados (tabla 2).

Prospección de nódulos. Se tomaron para un muestreo representativo entre 15–20 submuestras al azar en un patrón de W o zig-zag. Para evitar desecamiento de los nódulos, se tomaron al mismo tiempo suelo y raíces (Pérez *et al.* 2011). Se seleccionaron plantas vigorosas, en estadio fenológico de inicios de floración, sin indicios de ataques de plagas o presencia de enfermedades. La extracción de los nódulos de las raíces de leguminosas y su conservación posterior se realizó según Somasegaran y Hoben (1994), para lo que se cortó con una pala una sección de suelo a no menos de 15.0 cm alrededor de la planta y, al menos, a 20.0 cm de profundidad. Los nódulos, conjuntamente con las raíces, se preservaron en recipientes con CaCl₂, para su conservación y traslado.

Aislamiento de rizobios. Los rizobios se aislaron según el método de Date y Halliday (Date 1982). Se esterilizaron en etanol 95 % (30 s), hipoclorito de sodio 4-6 % (2-3 min) y se enjuagaron en agua destilada estéril. Se les aislaron las cepas a partir de una compresión hecha con un macerador de vidrio estéril para extraer su contenido. La siembra se efectuó en medio sólido levadura-manitol con rojo congo (RC) (Vincent 1970) y se incubó a 28 °C durante 10 d. Se seleccionaron aquellas colonias con características culturales semejantes a los rizobios, que no absorbieran rojo congo, y se realizaron pases sucesivos de ellas en el medio antes descrito hasta obtener un cultivo puro. Posteriormente, se conservaron en cuñas de este mismo medio a 4 °C. La pureza de los cultivos, así como sus características tintoriales y morfología de las células, se determinaron mediante la tinción de Gram (Somasegaran y Hoben 1994, Parker 2012).

Identificación de los aislados. La identidad de los rizobios se confirmó por su capacidad de provocar la nodulación en *Macropodium atropurpureum* (Vincent 1970) en tubos de ensayos de 150 x 25 cm, que contenían solución nutritiva agarizada Hoagland libre de nitrógeno, según lo descrito por Bécquer (2002), con arreglos en la fuente de Fe al utilizar Fe₂Na₂EDTA en lugar de FeC₆H₅O₇·H₂O. Para ello se emplearon inóculos frescos de cada una de las cepas aisladas, con título aproximado de 10⁸ células/mL, del cual se añadió 1.0 mL a cada tubo. Las semillas se esterilizaron con hipoclorito de sodio (2.5 %) (Somasegaran y Hoben 1994) y se escarificaron en agua caliente a 80-90 °C (2-3 min) antes de la siembra. Las plántulas crecieron en una cámara de condiciones controladas Fitotron (Korea), con periodicidad luminosa de 16 h-luz (300 µE/m²/s) a 26 °C durante el día y 22 °C durante la noche. La humedad relativa fue de 75/85 %. Después de pasadas dos semanas, las plántulas se examinaron para comprobar la nodulación. Asimismo, se evaluó el crecimiento en peptona-glucosa-

Morphology and growth of colonies on yeast-mannitol solid medium. These variables were evaluated by observing shape and growth of colonies in yeast-mannitol solid medium at 30 °C up to 10 d. The change of color of the culture medium to determine the acid-alkali production and Congo red absorption (Vincent 1970) was conducted with bromothymol blue (BTB) (5.0 mL/L, pH 6.8) (table 4).

Commercial strains used in the evaluations. Different commercial strains, serving as control in different

agar, según metodología de Somasegaran y Hoben (1994).

Morfología y crecimiento de las colonias en medio sólido levadura-manitol. Estas variables se evaluaron mediante la observación de la forma y crecimiento de las colonias en medio sólido levadura-manitol a 30 °C hasta 10 d. El cambio de coloración del medio de cultivo para determinar la producción ácido-álcali, así como la absorción de rojo congo (Vincent 1970) se llevó a cabo con azul de bromotimol (ABT) (5.0 mL/L, pH 6.8) (tabla 4).

Cepas comerciales utilizadas en las evaluaciones. Se

Table 3. Commercial strains used for the evaluations

Strains	Genus and Species
ATCC 10004	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
CIAT 899 IIB	<i>Rhizobium tropici</i>
HAMBI 1174	<i>Rhizobium galegae</i>
CCBAU 2609	<i>Mesorhizobium loti</i>
NZP 2213	<i>Mesorhizobium huakuii</i>
ATCC 9930	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
USDA 110	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>

evaluations of identification and characterization (table 3), were used.

Results and Discussion

Macrosymbionts from which root nodules were collected belonged to Desmodium, Centrosema, Alysicarpus and Indigofera genera. These legumes were located in an arid livestock ecosystem with scarce precipitations in July (table 1). The distribution of sampled plants was disperse in the area, but with good phenological development.

Even with signs of being effective, nodules collected from some legumes were predominantly scarce and, in some cases, small and ineffective, which are indicators that could be influenced by the lack of soil humidity, as well as low phosphorus content, high potassium (K) (table 2) and low amounts of salt.

Although low salinity of soil could have no severe implications in plants and bacteria, and potassium is the most abundant cation in the cytoplasm, with an important effect on creation and regulation of enzymatic activity, when there is an excess of this element, there is a possible interaction with physiological availability and absorption of Mg and Ca in plants (Marschner 1986). However, interactions between legumes and rhizobacteria are particularly important when these result in tolerance to extreme environmental conditions, such as severe drought, high temperatures and salinity (Moschetti *et al.* 2005).

Nodules were also found in numbers of 10-50, medium size (2-5 mm) and a predominant internal color, which varied from red to brown, except nodules collected from Indigofera and Alysicarpus, which

utilizaron diferentes cepas comerciales que sirvieron de testigo en las diferentes evaluaciones de identificación y caracterización (tabla 3).

Resultados y Discusión

Los macrosimbiontes de los que se colectaron los nódulos radicales pertenecen a los géneros Desmodium, Centrosema, Alysicarpus e Indigofera. Estas leguminosas se encontraban en un ecosistema ganadero árido, con escasas precipitaciones en julio (tabla 1). La distribución de las plantas muestreadas en el área fue dispersa, aunque con buen desarrollo fenológico.

Aún con indicios de ser efectivos, los nódulos que se colectaron de algunas leguminosas fueron predominantemente escasos y, en algunos casos, de tamaño pequeño e inefectivos, indicadores en los que pudieron influir la carencia de humedad del suelo, así como el bajo contenido de fósforo, alto contenido de potasio (K) (tabla 2) y tenores débiles de sal.

Se sabe que la escasa salinidad el suelo pudiera no tener implicaciones severas en plantas y bacterias y el potasio es el catión más abundante en el citoplasma, con un efecto importante en la conformación y regulación de la actividad de las enzimas, cuando hay exceso de este elemento hay una posible interacción con la absorción y disponibilidad fisiológica de Mg y Ca en las plantas (Marschner 1986). No obstante, las interacciones entre las leguminosas y las rizobacterias son particularmente importantes cuando estas derivan en la tolerancia a condiciones ambientales extremas, como la sequía severa, elevadas temperaturas y salinidad (Moschetti *et al.* 2005).

También se encontraron nódulos en número de 10-50, tamaño mediano (2-5 mm) y con un color interno

presented a color that varied from white to green (table 4). The highest amount was found in secondary roots (figure 1). In this regard, Sharma *et al.* (2012) considered that nodules formed in the main roots are more efficient than those located in secondary roots. In the case of *Alysicarpus* and *Indigofera* nodules, its green or white color indicates that they were not effective (Somasegaran and Hoben 1994). The accompanying vegetation was mainly grasses, with abundance of *Dichantium sp.* and *Paspalum notatum*. There were also cacti, with advanced phenological development, which confirms the arid characteristics of the zone. Collected nodules were considered, in

predominante, que varió de rojo a marrón, excepto los nódulos colectados de *Indigofera* y *Alysicarpus*, los que presentaron un color que varió de blanco a verde (tabla 4). La mayor localización se encontró en las raíces secundarias (figura 1). Al respecto, Sharma *et al.* (2012) consideran que los nódulos que se forman en las raíces principales son más eficientes que los que constituyen en las raíces secundarias. En el caso de los nódulos de *Alysicarpus* e *Indigofera*, su color verde o blanco indica que no eran efectivos (Somasegaran y Hoben 1994). La vegetación acompañante fue, fundamentalmente, de gramíneas pratenses, con abundancia de *Dichantiumsp* y *Paspalumnotatum*. También se encontraron cactáceas, con desarrollo fenológico



Figure 1. Round middle-sized root nodules of *Centrosema virginianum*, located in secondary roots (white arrows)

Tabla 4. Characteristics of collected modules in an arid ecosystem of Holguin province

Macro symbiont	Size	Shape	Internal color	Nodulation type	Nodulation, main root	Surrounding vegetation
<i>Desmodium canum</i>	Small (1-1.5 mm)	Round	Red-brown	Scarce (1-10)	Null	<i>Dichantium sp.</i> <i>Paspalum notatum</i>
<i>Desmodium canum</i>	Middle-sized (2.5-3 mm)	Round	Red-brown	Scarce (1-10)	Null	<i>Dichantium sp.</i> <i>Paspalum notatum</i>
<i>Desmodium triflorum</i>	Small (1-1.5 mm)	Round	Red-brown	Medium (10-50)	Abundant	<i>Dichantium sp.</i> <i>Paspalum notatum</i>
<i>Desmodium triflorum</i>	Small (1-1.5 mm)	Round	Red-brown	Scarce (1-10)	Regular	<i>Dichantium sp.</i> <i>Paspalum notatum</i>
<i>Alysicarpus vaginalis</i>	Small (1-1.5 mm)	Round	Green	Scarce (1-10)	Regular	<i>Dichantium sp.</i> <i>Paspalum notatum</i>
<i>Indigo feramucronata</i>	Middle-sized (2.5-3 mm)	Round	White	Scarce (1-10)	Regular	<i>Dichantium sp.</i> <i>Paspalum notatum</i>
<i>Centrosema virginianum</i>	Middle-sized (2.5-3 mm)	Round	Red-brown	Scarce (1-10)	Regular	<i>Dichantiumsp.</i> <i>Paspalum notatum</i>
<i>Centrosema virginianum</i>	Middle-sized (2.5-3 mm)	Round	Red-brown	Abundant (50-100)	Abundant	<i>Dichantiumsp.</i> <i>Paspalum notatum</i>

general, as desmoids, with defined growth habit, ovoid shape and spherical meristem (Bergersen 1982).

It was observed that *Centrosema* and *Desmodium* genera predominated among macrosymbionts in the prospection. It is known that Olivera *et al.* (2008) found *Centrosema* widely disseminated in three Eastern provinces of Cuba. Gómez *et al.* (2010), studies of legumes, conducted in the Valle del Cauto, Cuba, found that *C. plumieri* showed high indexes of natural nodulation in the Valle del Cauto, Cuba.

An amount of 11 rhizobia isolates were performed from root nodules of *Centrosema virginianum*, *Desmodium cannum* and *D. triflorum* in arid cattle areas of Calixto García municipality, Holguín. Isolates performed in *Alysicarpus vaginalis* and *Indigofera mucronata* were not confirmed as rhizobia, showing abundant growth in peptone-glucose solid medium and absorption of Congo red in a yeast-mannitol solid medium, with no typical morphocultural characteristics for rhizobia (Vincent 1970). It is possible that, connected to this result, nodules of these two macrosymbionts were not effective, due to their green or white coloration (Somasegaran and Hoben, 1994).

Table 5 shows isolates and their natural macrosymbiont. Most of the isolates come from *Centrosema virginianum*, which could be related to the characteristics of this macrosymbiont.

With the isolation of most of the prospected macrosymbionts, colonies with morphological characteristics typical of Bradyrhizobiaceae family (Weir 2016) were obtained. Its identity as rhizobia was confirmed due to their Gram (-) characteristics, after producing nodules in in vitro plantlets of *Macroptilium atropurpureum*, with low or null growth in peptone-glucose-agar. There was no absorption of Congo red in the previously mentioned medium (tables 6, 7, 8, 9, 10 and 11). These results are not surprising because, according to Doyle (2011), Fonseca *et al.* (2012), Koppell and Parker (2012) and Parker and Rousteau

avanzado, lo que corrobora las características áridas de la zona. Los nódulos que se colectaron se consideraron, en general, desmoideos, con hábito de crecimiento definido, de forma oblonga, y meristemo esférico (Bergersen 1982).

Se observó que los géneros *Centrosema* y *Desmodium* predominaron entre los macrosimbiontes en la prospección. Se conoce que Olivera *et al.* (2008) hallaron a *Centrosema* ampliamente disseminado en tres provincias orientales de Cuba. Gómez *et al.* (2010), en prospecciones de leguminosas realizadas en el Valle del Cauto, Cuba, encontraron que *C. plumieri* presentó altos índices de nodulación natural.

Se hicieron 11 aislamientos de rizobios a partir de nódulos radicales de *Centrosema virginianum*, *Desmodium cannum* y *D. triflorum* en áreas ganaderas áridas del municipio Calixto García, Holguín. Los aislamientos que se realizaron en *Alysicarpus vaginalis* e *Indigofera mucronata* no se confirmaron como rizobios, al mostrar crecimiento exuberante en medio sólido peptona-glucosa y absorción de rojo congo en medio sólido levadura-manitol, con características morfológicas no típicas para rizobios (Vincent 1970). Es posible que, vinculado a este resultado, los nódulos de estos dos macrosimbiontes no fueron efectivos, por su coloración verde o blanca (Somasegaran y Hoben 1994).

En la tabla 5 se muestran los aislados y su macrosimbionte natural. Nótese que la mayor parte de los aislados proceden de *Centrosema virginianum*, lo que pudiera estar vinculado a las características de este macrosimbionte.

Con el aislamiento que se realizó en la mayor parte de los macrosimbiontes que se prospectaron, se obtuvieron colonias con características morfológicas típicas para la familia Bradyrhizobiaceae (Weir 2016). Se comprobó su identidad como rizobios por sus características de Gram (-), al producir nódulos en plántulas in vitro de *Macroptilium atropurpureum*, con poco o nulo crecimiento en peptona-glucosa-agar. Tampoco hubo absorción de rojo congo en el medio antes referido (tabla 6, 7, 8, 9, 10 y 11). Estos resultados no son sorprendentes,

Tabla 5. Isolates and their natural microsymbiont

Isolates	Natural microsymbiont
Ho1	<i>Centrosema virginianum</i>
Ho2	<i>Centrosema virginianum</i>
Ho4	<i>Desmodium triflorum</i>
Ho5	<i>Desmodium triflorum</i>
Ho6	<i>Desmodium triflorum</i>
Ho7	<i>Centrosema virginianum</i>
Ho8	<i>Centrosema virginianum</i>
Ho9	<i>Desmodium canum</i>
Ho10	<i>Desmodium canum</i>
Ho12	<i>Centrosema virginianum</i>
Ho13	<i>Centrosema virginianum</i>

(2014), bacteria from *Bradyrhizobium* genus interact with the widest diversity of legumes and are associated to nodule-forming groups that represent early ramifications of clades in each of the three subfamilies of legumes.

Three growth groups were identified. The first had low growth, with appearance of colonies after the sixth day and 3-4 mm of diameter, which were white, gummy, semi-translucent, round, convex, with entire edges and five isolates (three of *Centrosema virginianum*: Ho2, Ho7 and Ho8, and two of *Desmodium canum*: Ho9 and Ho10). Out of these, four produced alkali and one didn't show apparent reaction in a yeast-mannitol solid medium with bromothymol blue (figure 2a, table 6, and table 7).

Second group had low growth, with appearance of colonies after the seventh day, 1-3 mm of diameter, which were white, gummy, semi-opaque, round, with

ya que según Doyle (2011), Fonseca *et al.* (2012), Koppell y Parker (2012) y Parker y Rousteau (2014), las bacterias pertenecientes al género *Bradyrhizobium* interactúan con la más amplia diversidad de leguminosas y se asocian con grupos formadores de nódulos que representan ramificaciones tempranas de clados en cada una de las tres subfamilias de leguminosas.

Se identificaron tres grupos de crecimiento. El primero fue el de crecimiento lento, con aparición de colonias a partir del sexto día, 3-4 mm de diámetro, blancas, gomosas, semitranslúcidas, circulares, convexas, con bordes enteros y cinco aislados (tres aislados de *Centrosema virginianum*: Ho2, Ho7 y Ho8, así como dos de *Desmodium canum*: Ho9 y Ho10). De estos, cuatro produjeron álcali y uno no mostró reacción aparente en medio sólido levadura-manitol con azul de bromotimol (figura 2a, tabla 6, tabla 7).

El segundo grupo fue de crecimiento lento, con

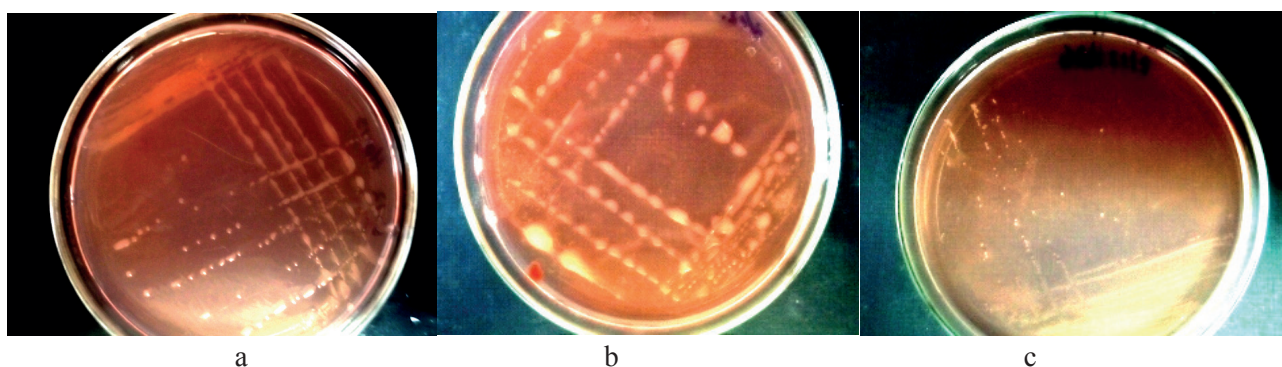


Figure 2. Rhizobia colonies from the first, second and third group, respectively: a) isolate of *Desmodium canum*, b) isolate of *Centrosema virginianum*, c) isolate of *D. triflorum*.

Table 6. Morphological characteristics of colonies in a yeast-mannitol solid medium with Congo red

Isolates	Morphological characteristics of colonies							
	Diameter (mm)	Color	Amount of gum	Optical details	Shape	Growth time (days)	Edge	Elevation
Ho2	3.5	White	Abundant	Semi-translucent	Round	6	Entire	Convex
Ho7	3.0	White	Abundant	Semi-translucent	Round	7	Entire	Convex
Ho8	4.0	White	Abundant	Semi-translucent	Round	6	Entire	Convex
Ho9	4.0	White	Abundant	Semi-translucent	Round	6	Entire	Convex
Ho10	3.8	White	Abundant	Semi-translucent	Round	6	Entire	Convex

Table 7. Biochemical characteristics of colonies in different culture media

Isolates	Biochemical characteristics of colonies		
	Growth in PGA	Acid-alkali reaction (growth in ABT)	Congo red absorption
Ho2	NG	WAR	WAR
Ho7	NG	Alkali	WAR
Ho8	NG	Alkali	WAR
Ho9	NG	Alkali	WAR
Ho10	NG	Alkali	WAR

NG: no growth

NA: no absorption

WAR: without apparent reaction

(+) positive reaction

entire edges, convex, and three isolates (*C. virginianum*: Ho1, Ho12 and Ho13) (figure 2b, table 8, and table 9). There was no apparent reaction of them in a yeast-mannitol solid medium with bromothymol blue (figure 2b, table 8, and table 9).

Third group had very low growth, with appearance

aparición de colonias a partir del séptimo día, 1-3 mm de diámetro, blancas, gomosas, semiopacas, circulares, con bordes enteros, convexas y tres aislados (*C. virginianum*: Ho1, Ho12 y Ho13) (figura 2b, tabla 8, tabla 9). No hubo reacción aparente de los mismos en medio sólido levadura-manitol con azul de bromotimol.

Table 8. Morphological characteristics of colonies in a yeast-mannitol solid medium with RC

Isolates	Morphological characteristics of colonies							
	Diameter (mm)	Color	Amount of gum	Optical details	Shape	Growth time (days)	Edge	Elevation
Ho1	3.0	White	Abundant	Semi-opaque	Round	7	Entire	Convex
Ho12	1.0	White	Abundant	Semi-opaque	Round	7	Entire	Convex
Ho13	2.8	White	Abundant	Semi-opaque	Round	7	Entire	Convex

Tabla 9. Biochemical characteristics of colonies in different culture media

Isolates	Biochemical characteristics of colonies		
	Growth in PGA	Acid-alkali reaction (growth in ABT)	Congo red absorption
Ho2	NG	WAR	NA
Ho7	NG	WAR	NA
Ho8	NG	WAR	NA
Ho9	NG	WAR	NA
Ho10	NG	WAR	NA

NG: no growth

NA: no absorption

WAR: without apparent reaction

(+) positive reaction

of colonies after the seventh day, < 0.5 mm of diameter, which were white, dry, opaque, round with entire edges and punctiform, convex, and three isolates (*D. triflorum*: Ho4, Ho5 and Ho6) (figure 2c, table 10, table 11). Two of the isolates produced alkali and one produced acid in a yeast-mannitol solid medium with bromothymol blue. This group also includes USDA 110, which is a control strain belonging to *Bradyrhizobium japonicum*, which is a genus that represents rhizobia of low growth, with those previously described characteristics. According to Pires *et al.* (2010), generally, isolates of fast growth do not form dry colonies.

Control strains, except USDA 110, had the appearance of colonies after 3-5 days, with 2 and 3 mm of diameter, with gum formation and production of bromothymol blue, except ATCC 9930 (*Sinorhizobium meliloti*) that

El tercer grupo fue de muy lento crecimiento, con aparición de colonias a partir del séptimo día, < 0.5 mm de diámetro, colonias blancas, secas, opacas, circulares con bordes enteros y punctiformes, convexas y tres aislados (*D. triflorum*: Ho4, Ho5 y Ho6) (figuras 2c, tabla 10, tabla 11). Dos de los aislados produjeron álcali, y uno produjo ácido en medio sólido levadura-manitol con azul de bromotimol. En este grupo se incluye también USDA 110, cepa testigo perteneciente a *Bradyrhizobium japonicum*, género representativo de los rizobios de lento crecimiento, con las características antes descritas. Según Pires *et al.* (2010), normalmente, los aislados de rápido crecimiento no forman colonias secas.

Las cepas testigo, excepto USDA 110, tuvieron aparición de colonias a los tres-cinco días, de diámetro entre 2 y 3 mm, con formación de goma y producción de

Table 10. Morphological characteristics of colonies in a yeast-mannitol solid medium with RC

Isolates	Morphological characteristics of colonies							
	Diameter (mm)	Color	Amount of gum	Optical details	Shape	Growth time (days)	Edge	Elevation
Ho4	0.2	White	Very scarce	Opaque	Round	7	Entire	Convex
Ho5	0.1	White	Very scarce	Opaque	Round	8	Entire	Convex
Ho6	0.4	White	Very scarce	Opaque	Round	8	Entire	Convex

Table 11: Biochemical characteristics of colonies in different culture media

Isolates	Biochemical characteristics of colonies		
	Growth in PGA	Acid-alkali reaction (growth in ABT)	Congo red absorption
Ho4	NG	Alkali	NA
Ho5	NG	Alkali	NA
Ho6	NG	Acid	NA

NG: no growth

NA: no absorption

WAR: without apparent reaction

(+) positive reaction

had no reaction. None of these strains absorbed Congo red from the medium. This group, clearly, was very different from the three previous groups, formed by the new isolates.

Isolates belonging to these three groups, despite their high morphological variability, could be considered as representative of *Bradyrhizobium* genus (*Bradyrhizobium* sp.), due to their growth, morphology and alkali-acid production (Young 1996). USDA 110 strain (*B. japonicum*), used as control, also corresponded to these characteristics, mainly to those of the third group, with alkali production and colonies of <0.5 mm of diameter. It is evident that growth in all groups was slow or very slow. However, diameter of colonies, as well as gum formation, had variation among formed groups, which demonstrates morphological diversity of these bacteria (Granda *et al.* 2013).

It is important to highlight that one of the isolates (third group, *D. triflorum*) produced acid in the belonging medium, which contradicts the characteristics of bradyrhizobia that generally show alkaline reaction (Jordan 1982). Nevertheless, Bécquer (2002) reported bradyrhizobia that were isolated from forage legumes in Sancti Spiritus province, with acid reaction. Odee *et al.* (1997) found acid producer strains in *Bradyrhizobium* sp. colonies of fast growth. It is possible that acid producer isolates could be native from areas with alkaline characteristics and mutation of amino acids due to different environmental factors, had not already influenced on their phenotypical expression (Stanier *et al.* 1979). It is important to state that pH of the soil where nodules were collected, was not acid, but neutral (7.35) (table 2), so there was no influence of the medium on alkali secretion. Rojas *et al.* (2009) found that a strain of *Bradyrhizobium* sp., which grew in a yeast-mannitol solid medium with bromothymol blue, turned acid the culture medium. This characteristic of some rhizobia may be a competitive advantage that allows them to survive under negative conditions, and it could not be considered as an exclusive taxonomical character of these microorganisms (Moreno 2010).

It can be concluded that 11 isolates, forming three

ácido en azul de bromotimol, excepto la cepa ATCC 9930 (*Sinorhizobium meliloti*) que no tuvo reacción. Ninguna de estas cepas absorbió rojo congo del medio. Este grupo, evidentemente, se diferenció en gran medida de los tres grupos anteriores que se formaron por los nuevos aislados.

Los aislados pertenecientes a esos tres grupos, a pesar de su alta variación morfológica, podrían ser considerados representantes del género *Bradyrhizobium* (*Bradyrhizobium* sp.), por su crecimiento, morfología y producción ácido-álcali (Young 1996). La cepa USDA 110 (*B. japonicum*), que se usó como testigo, correspondió también a estas características, sobre todo a las del tercer grupo, con producción de álcali y colonias de <0.5 mm de diámetro. Resulta evidente que el crecimiento en todos los grupos fue lento o muy lento. Sin embargo, el diámetro de las colonias, así como la formación de goma, varió sensiblemente entre los grupos formados, lo que demuestra la diversidad morfológica de estas bacterias (Granda *et al.* 2013).

Es de destacar también que uno de los aislados (tercer grupo, *D. triflorum*) produjo ácido en el medio correspondiente, lo que contradice las características de los bradyrizobios, que generalmente presentan reacción alcalina (Jordan 1982). No obstante, Bécquer (2002) informó bradyrizobios que se aislaron de leguminosas forrajeras de la provincia Sancti Spiritus, con reacción ácida. Odee *et al.* (1997) encontraron cepas productoras de ácido en colonias de rápido crecimiento de *Bradyrhizobium* sp. Es posible que los aislados productores de ácido pudieran ser originarios de áreas con características alcalinas, y que la mutación producida en los aminoácidos por factores ambientales diferentes no haya incidido aún en su expresión fenotípica (Stanier *et al.* 1979). Nótese que el pH del suelo donde se colectaron los nódulos no es ácido, sino neutro (7.35) (tabla 2), por lo que no hubo influencia del medio en la secreción de álcali. Rojas *et al.* (2009) encontraron que una cepa de *Bradyrhizobium* sp., que creció en medio sólido levadura-manitol más azul de bromotimol, acidificó el medio de cultivo. Esta característica que algunos rizobios presentan puede ser una ventaja competitiva que les permite sobrevivir a condiciones adversas, y no se puede tomar como carácter taxonómico exclusivo de estos microorganismos (Moreno 2010).

groups of slow growth, belong to Bradyrhizobiaceae family. However, isolated from *Alysicarpus vaginalis* and *Indigofera mucronata* showed no characteristics as rhizobia. Most of the isolates come from *Centrosema virginianum*. It was observed that growth in all groups was slow or very slow. However, diameter of colonies, acid or alkali production and gum formation, had a small variation among the groups. It is suggested to conduct phenotypical and genotypic assays to have a more exact determination of their taxonomical position up to species level.

Se concluye que 11 aislados, que formaron tres grupos de lento crecimiento, pertenecen a la familia Bradyrhizobiaceae. Sin embargo, los aislados de *Alysicarpus vaginalis* e *Indigofera mucronata* no presentaron características como rizobios. La mayor parte de los aislados proceden de *Centrosema virginianum*. Se observó que el crecimiento en todos los grupos fue lento o muy lento. Sin embargo, el diámetro de las colonias, la producción de ácido o álcali y la formación de goma, varió sensiblemente entre los grupos. Se recomienda realizar ensayos de fenotipo y genotipo para determinar de forma más exacta su posición taxonómica hasta el nivel de especie.

References

- Bécquer, C. J. 2002. Caracterización y selección de rizobios, aislados de leguminosas nativas de Sancti Spiritus, Cuba. Ph.D. Thesis, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba, 140 p.
- Bergersen, F. J. 1982. Root nodules of legumes: structure and functions. New York: Research Studies Press, 164 p., ISBN: 978-0-471-10456-8.
- Date, R. A. 1982. "Collection, isolation, characterization and conservation of Rhizobium". In: Vincent, J. M. (ed.), Nitrogen fixation in legumes, Sydney: Academic Press, pp. 95–109, ISBN: 978-0-12-721980-6.
- Doyle, J. J. 2011. "Phylogenetic Perspectives on the Origins of Nodulation". Molecular Plant-Microbe Interactions, 24(11): 1289–1295, ISSN: 0894-0282, DOI: 10.1094/MPMI-05-11-0114.
- Fitouri, S. D., Trabelsi, D., Saïdi, S., Zribi, K., Ben Jeddi, F. & Mhamdi, R. 2012. "Diversity of rhizobia nodulating *Hedysarum coronarium* L.) and selection of inoculant strains for semi-arid Tunisia". Annals of Microbiology, 62(1): 77–84, ISSN: 1590-4261, 1869-2044, DOI: 10.1007/s13213-011-0229-2.
- Fonseca, M. B., Peix, A., de Faria, S. M., Mateos, P. F., Rivera, L. P., Simões-Araújo, J. L., Costa, F. M. G., dos Santos, I. R. M., Cruz, C., Velázquez, E., Scotti, M. R., Sprent, J. I. & James, E. K. 2012. "Nodulation in *Dimorphanthera wilsonii* Rizz. (Caesalpinioideae), a Threatened Species Native to the Brazilian Cerrado". PLoS ONE, 7(11): e49520, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0049520.
- Gómez, I., Cordoví, E., Benítez, D. G., López, R. C., Nuviola, Y. & Olivera, Y. 2010. "Leguminosas naturalizadas en el Valle del Cauto, Cuba". Pastos y Forrajes, 33(4): 1–1, ISSN: 0864-0394.
- Granda, M. K., Paccha, C. H., Campoverde, S. C. & Torres, G. R. 2013. "Variabilidad de aislados diazotróficos simbióticos en diferentes condiciones agroecológicas del sur del Ecuador". Centro de Biotecnología, 2(1): 6–15, ISSN: 1390-7573.
- Hernández, J. A., Pérez, J. M., Bosch, D., Rivero, L., Camacho, E., Ruiz, J., Salgado, E. J., Marsán, R., Obregón, A., Torres, J. M., Gonzáles, J. E., Orellana, R., Paneque, J., Ruiz, J. M., Mesa, A., Fuentes, E., Durán, J. L., Pena, J., Cid, G., Ponce de León, D., Hernández, M., Frómata, E., Fernández, L., Garcés, N., Morales, M., Suárez, E. & Martínez, E. 1999. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. La Habana, Cuba: AGROINFOR, 64 p., ISBN: 959-246-022-1.
- Jordan, D. C. 1982. "Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to Bradyrhizobium gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants". International Journal of Systematic Bacteriology, 32(1): 136–139, ISSN: 0020-7713, 1465-2102, DOI: 10.1099/00207713-32-1-136.
- Koppell, J. H. & Parker, M. A. 2012. "Phylogenetic clustering of *Bradyrhizobium symbionts* on legumes indigenous to North America". Microbiology, 158(Pt_8): 2050–2059, ISSN: 1350-0872, 1465-2080, DOI: 10.1099/mic.0.059238-0.
- Marschner, H. 1986. "Functions of mineral nutrients: Macronutrients". In: The mineral nutrition of higher plants, London; Orlando: Academic Press, pp. 229–299, ISBN: 978-0-12-473540-8.
- Moreno, M. 2010. Caracterización de las cepas ICA 19 e ICA j96, de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno y pruebas de estabilidad de inoculantes elaborados para cultivos de arveja y soya. M.Sc. Thesis, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia, 126 p.
- Moschetti, G., Peluso, A., Protopapa, A., Anastasio, M., Pepe, O. & Defez, R. 2005. "Use of nodulation pattern, stress tolerance, nodC gene amplification, RAPD-PCR and RFLP–16S rDNA analysis to discriminate genotypes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*". Systematic and Applied Microbiology, 28(7): 619–631, ISSN: 0723-2020, DOI: 10.1016/j.syapm.2005.03.009.
- Odee, D. W., Sutherland, J. M., Makatiani, E. T., McInroy, S. G. & Sprent, J. I. 1997. "Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions". Plant and Soil, 188(1): 65–75, ISSN: 0032-079X, DOI: 10.1023/A:1004204413140.
- Olivera, Y., Machado, R. & Fung, C. 2008. "Colecta de leguminosas forrajeras en tres provincias orientales de Cuba". Pastos y Forrajes, 31(1): 1–1, ISSN: 0864-0394.
- Oquendo, G., Pupo, N., Corella, P., Machado, R., Olivera, Y., Iglesias, J. M. & Swaby, Y. 2013. "Prospección y colecta de especies forrajeras en formaciones vegetales del municipio Rafael Freyre, Holguín, Cuba". Pastos y Forrajes, 36(2): 159–168, ISSN: 0864-0394.
- Parker, M. A. 2012. "Legumes select symbiosis island sequence variants in Bradyrhizobium". Molecular Ecology, 21(7): 1769–1778, ISSN: 0962-1083, DOI: 10.1111/j.1365-294X.2012.05497.x.

- Parker, M. A. & Rousteau, A. 2014. "Mosaic origins of Bradyrhizobium legume symbionts on the Caribbean island of Guadeloupe". *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 77: 110–115, ISSN: 1055-7903, DOI: 10.1016/j.ympev.2014.04.011.
- Pérez, A., Grisales, T. & Fuentes, J. 2011. "Determinación de morfotipos nativos de Rhizobium asociados a la leguminosa *Teramnus volubilis* Sw en fincas ganaderas del municipio de Tolú en el departamento del Sucre". *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 3(1): 62–89, ISSN: 2027-4297.
- Pires, T. F. C., Lustrino, B. W., Ribeiro, X. G. & Gouvêa, R. N. 2010. "Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga". *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1): 201–208, ISSN: 1517-8382, DOI: 10.1590/S1517-83822010000100029.
- Rojas, D. F., Garrido, M. F. & Bonilla, R. R. 2009. "Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de Rhizobium sp.". *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 10(1): 70, ISSN: 2500-5308, 0122-8706, DOI: 10.21930/rcta.vol10_num1_art:131.
- Sharma, S. R., Rao, N. K., Gokhale, T. S. & Ismail, S. 2012. "Isolation and characterization of salt-tolerant rhizobia native to the desert soils of United Arab Emirates". *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(2): 102–108, ISSN: 2079-0538, 2079-052X, DOI: 10.9755/ejfa.v25i2.7590.
- Somasegaran, P. & Hoben, H. J. 1994. *Handbook for Rhizobia: methods in legume-rhizobium technology*. New York: Springer-Verlag, 450 p., ISBN: 978-0-387-94134-9.
- Stanier, R. Y., Adelberg, E. A. & Ingraham, J. L. 1979. *General microbiology*. London: Macmillan Press, 871 p.
- Turrulles, H. R. & Daley, P. M. 2009. *La degradación de los suelos en la provincia de Holguín un problema de alta significación*. Santa Fe, Argentina: El Cid Editor, 7 p., Available: <<http://public.ebib.com/choice/PublicFullRecord.aspx?p=3184287>>, [Consulted: November 10, 2016].
- Vanderlinde, E. M., Harrison, J. J., Muszyński, A., Carlson, R. W., Turner, R. J. & Yost, C. K. 2010. "Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841". *FEMS Microbiology Ecology*, 71(3): 327–340, ISSN: 0168-6496, 1574-6941, DOI: 10.1111/j.1574-6941.2009.00824.x.
- Villanueva, T. E. E. & Quintana, D. A. 2012. "Aislamiento y selección de bacterias nativas de rizobios fijadores de nitrógeno, a partir de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris*". *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*, 32(1): 24–103.
- Vincent, J. M. 1970. *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*. (ser. International Biological Programme, no. ser. 15), Oxford: Blackwell Scientific Publications, 164 p., ISBN: 978-0-397-60197-4, Available: <https://books.google.com/cu/books/about/A_Manual_for_the_Practical_Study_of_Root.html?id=dcQcAQAAIAAJ&redir_esc=y164>, [Consulted: November 9, 2016].
- Weir, B. 2016. *The current taxonomy of rhizobia*. NZ Rhizobia | Bacterial and fungal systematics research, Available: <<https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>>, [Consulted: November 10, 2016].
- Young, J. P. W. 1996. "Phylogeny and taxonomy of rhizobia". *Plant and Soil*, 186(1): 45–52, ISSN: 0032-079X, 1573-5036, DOI: 10.1007/BF00035054.

Received: January, 13, 2015