

## Increase in the development of *Pueraria phaseoloides* (tropical Kudzu) due to tolerant acid rhizobia under acidity and low fertility conditions

### Incremento del desarrollo de *Pueraria phaseoloides* (Kudzú tropical) por rizobios ácido tolerantes en condiciones de acidez y baja fertilidad

I. Hernández<sup>1</sup>, P. R. Rosales<sup>1</sup>, P. J. González<sup>1</sup>, J. F. Ramírez<sup>2</sup>, María C. Nápoles<sup>1</sup> and René Pérez<sup>1</sup>

I. Hernández: <https://orcid.org/0000-0002-5760-816X>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Gaveta postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, CP 32 700.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, Avenida Independencia, km 81/2 Boyeros, La Habana, Cuba.

Email: ionel@inca.edu.cu

The effect of acid-tolerant rhizobia isolates on growth, nodulation and yield of tropical kudzu, grown under acidity conditions, was determined. By measuring the diameter of the colony and the number of viable cells, the pH tolerance of three Bradyrhizobium strains: K2, 1\_2 and 2\_4 was established under acidity conditions. Two inoculation tests of tropical kudzu were carried out: one under controlled conditions, and another in the field. The effect of acidity on nodulation, growth and yield of crop was determined. A simple classification ANOVA and a two-factor arrangement were used in the statistical analysis. The three strains of rhizobia were tolerant at pH 4.5. This condition did not decrease its dispersion in the Petri dish, the diameter of the colonies or the number of viable cells. The acidity did not decrease the nodulation or the growth of kudzu plants, inoculated with K2 and 1\_2 under controlled conditions. The inoculation of kudzu with rhizobia isolates produced effectiveness in the biological fixation of nitrogen, more than 90 % of the total nodules, more than 75 % of the aerial dry mass yield, and more than 45 % of the nitrogen content of the aerial biomass of plants, under field conditions. The elaboration and application of inoculants based on K2 and 1\_2 would contribute to reducing the use of mineral fertilizers in soils affected by acidity.

Key words: *Bradyrhizobium*, stress, forages, growth.

Approximately 50 % of the world's tropical soils are affected by acidity, a phenomenon that causes a major problem in world agricultural production (Vitorello 2005 and Toledo 2016). In Cuba, more than 30 % are affected by this limitation (Hernández *et al.* 2015). One of the main factors that promote soil acidity is the indiscriminate use of acidifying mineral fertilizers (Goulding 2016).

The knowledge about the symbiosis established by diazotrophic bacteria, such as rhizobia, with leguminous plants has allowed the elaboration and use of biofertilizers made from these microorganisms, a practice that helps to reduce the application of mineral fertilizers (Saldaña 2017).

However, the soils acidity constitutes a limiting factor for establishing the interaction between legumes and rhizobia (Reeve *et al.* 2006). The low pH levels decrease the survival of these bacteria and the establishment of the plant. In addition, the processes of infection, nodulation and biological nitrogen fixation (BNF) are affected

Se determinó el efecto de aislados de rizobios tolerantes a la acidez en el crecimiento, la nodulación y el rendimiento de kudzú tropical, cultivado en condiciones de acidez. Mediante la medición del diámetro de la colonia y el número de células viables se estableció, en condiciones de acidez, la tolerancia a pH 4.5 de tres cepas de Bradyrhizobium: K2, 1\_2 y 2\_4. Se realizaron dos ensayos de inoculación de kudzú tropical: uno en condiciones controladas, y otro en campo. Se determinó el efecto de la acidez en la nodulación, crecimiento y rendimiento del cultivo. Se empleó un ANOVA de clasificación simple y un arreglo bifactorial en el análisis estadístico. Las tres cepas de rizobios resultaron tolerantes a pH 4.5. Esta condición no disminuyó su diseminación por la placa Petri, el diámetro de las colonias ni el número de células viables. La acidez no disminuyó la nodulación ni el crecimiento de plantas de kudzú, inoculadas con K2 y 1\_2 en condiciones controladas. La inoculación de kudzú con los aislados de rizobios produjo efectividad en la fijación biológica del nitrógeno, más de 90 % de los nódulos totales, más de 75 % del rendimiento en masa seca aérea, y más de 45 % del contenido de nitrógeno de la biomasa aérea de las plantas, en condiciones de campo. La elaboración y aplicación de inoculantes basadas en K2 y 1\_2 contribuiría a disminuir el uso de fertilizantes minerales en suelos afectados por la acidez.

Palabras clave: *Bradyrhizobium*, estrés, forrajes, crecimiento.

Aproximadamente, 50 % de los suelos tropicales del mundo está afectado por la acidez, fenómeno que causa un importante problema en la producción agrícola mundial (Vitorello 2005 y Toledo 2016). En Cuba, más de 30 % se encuentra afectado por esta limitante (Hernández *et al.* 2015). Uno de los principales factores que propician la acidez de los suelos es el uso indiscriminado de los fertilizantes minerales acidificantes (Goulding 2016).

Los conocimientos acerca de la simbiosis que establecen bacterias diazotróficas, como los rizobios, con las plantas leguminosas han permitido la elaboración y el empleo de biofertilizantes elaborados basados en estos microorganismos, práctica que contribuye a disminuir la aplicación de fertilizantes minerales (Saldaña 2017).

No obstante, la acidez de los suelos constituye un factor limitante para el establecimiento de la interacción entre las leguminosas y los rizobios (Reeve *et al.* 2006). Los bajos niveles de pH disminuyen la sobrevivencia de estas bacterias y el establecimiento de la planta. Se afectan además, los procesos de infección, nodulación

(Graham and Vance 2003).

*Pueraria phaseoloides* (tropical kudzú) is a forage legume that, in association with grasses, allows raising the protein level in the animals diet, and increasing the forage quality and digestibility (Carvalho da Paz *et al.* 2016). The inoculation of this crop with rhizobia strains, competitive and specific, promotes their growth, provides nitrogen to the soil and favors the accompanying and successive crops (Sarr *et al.* 2016).

The inoculation of tropical kudzú with rhizobia that have a certain acidity tolerance is an interesting practice that could improve the establishment of the crop in soils affected by acidity.

The objective of this study was to determine the effect of acid-tolerant rhizobia isolates on growth, nodulation and yield of tropical kudzú, grown under acidity conditions.

### Materials and Methods

Three Bradyrhizobium isolates (K2, 1\_2 and 2\_4) were used, from nodules of tropical kudzu (Hernández *et al.* 2013). To obtain pre-inoculums in 250 mL Erlenmeyers bottles, with 50 mL of the same liquid medium, a loop of the isolates, stored at 4 °C in test tubes with mannitol yeast agar (MY medium) (Vincent 1970) and pH 6.8 was used. The cell concentration of cultures was fitted to  $1 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup>.

In the inoculation tests of the three bacterial isolates, under controlled culture conditions and in field conditions, tropical kudzu seeds were used, donated by the Estación Experimental de Pastos y Forrajes (EEPF) of Cascajal, Villa Clara. For the test under controlled conditions, the seeds were superficially disinfected with 70 % ethanol for 5 min. and scarified with 98 % sulfuric acid for 10 min. They were immersed in 25 % (v/v) sodium hypochlorite for 15 min. Then, they were washed ten times with sterile distilled water, under aseptic conditions. The seeds were placed on plates containing water agar (0.75 %) (m/v) and incubated at 28 °C in the darkness for 72 h.

*Classification of bacterial isolates according to their tolerance to acidity.* A loop of the bacterial cultures was grown in triplicate on plates containing solid MY medium, with pH 4.5 and 6.8. The culture technique described by de Oliveira and Magalhães (1999) was applied for this purpose (figure 1). Based on the acidity levels of the medium, this technique allows the bacteria to be classified as sensitive, moderately tolerant or tolerant, according to the areas of the plate that cover with their growth. In the experiment, the growth of the isolates at pH 6.8 was used as a control.

Plates were incubated at 28 °C for 10 d and the areas covered by bacterial growth were monitored every two days. In addition, the colony diameter of the isolates was measured under both pH conditions,

Cuban Journal of Agricultural Science, Volume 54, Number 1, 2020.  
y fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Graham y Vance 2003).

*Pueraria phaseoloides* (kudzú tropical) es una leguminosa forrajera que, en asociación con gramíneas, permite elevar el nivel proteico en la dieta de animales, y aumentar la calidad y digestibilidad forrajera (Carvalho da Paz *et al.* 2016). La inoculación de este cultivo con cepas de rizobios, competitivas y específicas, promueve su crecimiento, aporta nitrógeno al suelo y favorece los cultivos acompañantes y sucesivos (Sarr *et al.* 2016).

La inoculación de kudzú tropical con rizobios que poseen cierta tolerancia a la acidez constituye una práctica interesante que podría mejorar el establecimiento del cultivo en suelos afectados por la acidez.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de aislados de rizobios tolerantes a la acidez en el crecimiento, la nodulación y el rendimiento de kudzú tropical, cultivado en condiciones de acidez.

### Materiales y Métodos

Se emplearon tres aislados de Bradyrhizobium (K2, 1\_2 y 2\_4), provenientes de nódulos de kudzú tropical (Hernández *et al.* 2013). Para obtener pre inóculos en frascos Erlenmeyers de 250 mL, con 50 mL del mismo medio líquido, se utilizó una asada de los aislados, conservados a 4 °C en tubos de ensayo con medio levadura manitol (LM) agar (Vincent 1970) y pH 6.8. La concentración celular de los cultivos se ajustó a  $1 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>.

En los ensayos de inoculación de los tres aislados bacterianos, en condiciones controladas de cultivo y en condiciones de campo, se utilizaron semillas de kudzú tropical, donadas por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes (EEPF) de Cascajal, Villa Clara. Para el ensayo en condiciones controladas, las semillas se desinfectaron superficialmente con etanol al 70 % durante 5 min. y se escarificaron con ácido sulfúrico al 98 % durante 10 min. Se sumergieron en hipoclorito de sodio al 25 % (v/v) por 15 min. Luego, se lavaron diez veces con agua destilada estéril, en condiciones de asepsia. Las semillas se colocaron en placas que contenían agar agua (0.75 %) (m/v) y se incubaron a 28 °C en la oscuridad durante 72 h.

*Clasificación de los aislados bacterianos según su tolerancia a la acidez.* Una asada de los cultivos bacterianos se cultivó por triplicado en placas que contenían medio LM sólido, con pH 4.5 y 6.8. Se aplicó para ello la técnica de cultivo descrita por Oliveira y Magalhães (1999) (figura 1). Atendiendo a los niveles de acidez del medio, esta técnica permite clasificar las bacterias en sensibles, medianamente tolerantes o tolerantes, según las zonas de la placa que cubran con su crecimiento. En el experimento, se utilizó como control el crecimiento de los aislados a pH 6.8.

Las placas se incubaron a 28 °C durante 10 d y se monitorearon las zonas cubiertas por el crecimiento bacteriano cada dos días. Además, se midió el diámetro de colonia de los aislados en ambas condiciones de pH, a los seis y 10 d de incubación. Se tomaron los valores

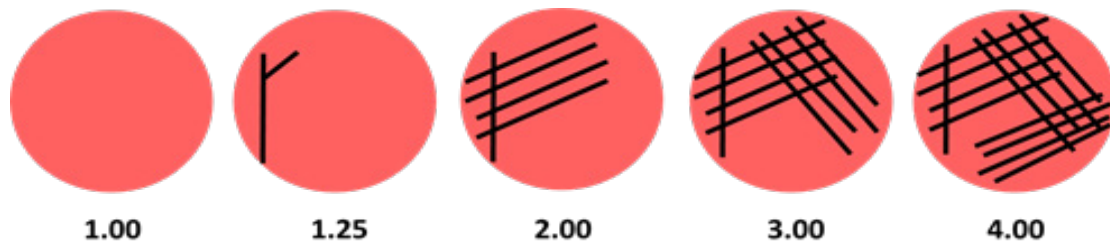


Figure 1. Culture technique proposed by de Oliveira and Magalhães (1999) to classify rhizobia, according to the level of acidity they tolerate in the culture medium: growth area 1 (a loop rubbing several times in both directions), area 2 (four loops only in one direction), area 3 and 4 (same as area 2, but in other regions of the Petri dish). The scoring intervals for the rhizobia classification were: sensitive (1.00-2.00), moderately tolerant (2.01-3.00) and tolerant (3.01-4.00).

at 6 and 10 d of incubation. The diameter values of five colonies were taken in each of the replications per treatment.

*Effect of pH on cell viability.* Pre-inoculums of the three rhizobia isolates were used for inoculation in 250 mL Erlenmeyers bottles, containing 50 mL of MY medium at pH 4.5 and 6.8, at a rate of 8 % (v/v). The cultures were maintained under agitation conditions at 150 rpm for 56 hours and at a temperature of 28 °C. A completely randomized design with three repetitions was used for each isolate and pH condition.

The concentration of viable cells (CFU mL<sup>-1</sup>) in the logarithmic or exponential growth phase (56 h of culture) was determined by the serial dilution method (10-4-10-6). The samples were cultured by dissemination in plates with solid MY medium at pH 6.8 and the plates were incubated at 28 °C for 10 d.

*In vitro nodulation test.* The disinfected, scarified and pre-germinated kudzu seeds with emerging roots (1-2 cm) were placed in glass bottles with 50 mL of semi-solid Norris and Date (1976) medium, at a rate of one seed per bottle and were inoculated with 1 mL of the isolates. Inoculants similar to those used in the test of the effect of pH on cell viability were used and ten plants per treatment were established in a completely random design.

The plants grew under controlled conditions, with photoperiod of 16 h daylight/8 h of darkness, at a day/night temperature of 26/22 °C and relative humidity of 7 %. Four weeks after inoculation it was determined: number of nodules in main root (NNmr), total nodulation (TN), number of effective nodules in the main root (NNemr), total (NteN) and dry mass of total nodules (DMtN) (g). The effectiveness of nodules was determined by observing a reddish coloration inside the nodules, characteristic of the leghemoglobin protein (Singh and Varma 2017). The dissection of nodules was made with stainless steel scalpel blades. The root length (cm), dry mass of the aerial part (DMA) (g) and dry mass of root (DMR) (g) were also determined.

*Inoculation test in the field.* The experiment was carried out in the Estación Experimental de Pastos y Forrajes (EEPF) of Cascajal, in Villa Clara, in a

del diámetro de cinco colonias en cada una de las réplicas por tratamiento.

*Efecto del pH en la viabilidad celular.* Se emplearon pre-inóculos de los tres aislados de rizobios para su inoculación en frascos Erlenmeyers de 250 mL, que contenían 50 mL de medio LM a pH 4.5 y 6.8, a razón de 8 % (v/v). Los cultivos se mantuvieron en condiciones de agitación a 150 rpm durante 56 h y a temperatura de 28 °C. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones para cada aislado y condición de pH.

Se determinó la concentración de células viables (UFC mL<sup>-1</sup>) en la fase logarítmica o de crecimiento exponencial (56 h de cultivo) mediante el método de las diluciones seriadas (10-4-10-6). Las muestras se cultivaron por disseminación en placas con medio LM sólido a pH 6.8 y las placas se incubaron a 28 °C durante 10 d.

*Ensayo de nodulación In vitro.* Las semillas desinfectadas, escarificadas y pre germinadas de kudzu con raíces emergentes (1-2 cm) se colocaron en frascos de vidrio con 50 mL de medio Norris y Date (1976) semisólido, a razón de una semilla por frasco y se inocularon con 1 mL de los aislados. Se emplearon inoculantes similares a los que se utilizaron en el ensayo del efecto del pH en la viabilidad celular y se establecieron diez plantas por tratamiento en un diseño completamente aleatorizado.

Las plantas crecieron en condiciones controladas, con fotoperíodo de 16 h luz/8 h de oscuridad, a una temperatura día/noche de 26/22 °C y humedad relativa de 70 %. Cuatro semanas después de la inoculación se determinó: número de nódulos en raíz principal (NNrp), nodulación total (NNt), número de nódulos efectivos en la raíz principal (NNerp), total (NNet) y masa seca de los nódulos totales (MSnt) (g). La efectividad de los nódulos se determinó mediante la observación de una coloración rojiza en el interior de los nódulos, característica de la proteína leghemoglobina (Singh y Varma 2017). La disección de los nódulos se realizó con hojas de bisturí de acero inoxidable. Se determinó además, la longitud de la raíz (cm), masa seca de la parte aérea (MSA) (g) y masa seca de raíz (MSR) (g).

*Ensayo de inoculación en campo.* El experimento se realizó en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes (EEPF) de Cascajal, en Villa Clara, en un suelo gleysol

petroferric ferruginous nodular gleysol soil (Hernández *et al.* 2015). This soil has strongly acidic pH. The content of organic matter (OM), assimilable phosphorus ( $P_2O_5$ ), calcium ( $Ca^{2+}$ ), magnesium ( $Mg^{2+}$ ), sodium ( $Na^+$ ), potassium ( $K^+$ ) and cationic exchange capacity (CEC) are low (Paneque *et al.* 2010) (table 1).

nodular ferruginoso petroférico (Hernández *et al.* 2015). Este suelo presenta pH fuertemente ácido. El contenido de materia orgánica (MO), fósforo asimilable ( $P_2O_5$ ), calcio ( $Ca^{2+}$ ), magnesio ( $Mg^{2+}$ ), sodio ( $Na^+$ ), potasio ( $K^+$ ) y capacidad de cambio catiónico (CCB) son bajos (Paneque *et al.* 2010) (tabla 1).

Table 1. Chemical characteristics of the soil (0-20 cm deep) petroferric ferruginous nodular gleysol

pH H <sub>2</sub> O	OM (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg 100 g <sup>-1</sup> )	Exchangeable cations (cmolc kg <sup>-1</sup> )				
			Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	CEC
4.7+0.2	2.50+0.09	1.3+0.3	3.51+0.12	1.10+0.03	0.08+0.01	0.11+0.02	4.80+0.16

The confidence intervals of each parameter are shown (Tukey,  $\alpha = 0.05$ )

The soil preparation was carried out in a conventional way by means of ploughing, light harrow, crossing, harrowing and furrowing. No fertilizer or fertility enhancing products were applied. Plots with a total area of 21 m<sup>2</sup> and a calculation area of 14 m<sup>2</sup> were used (six rows 5 m long, 70 cm apart). Four treatments were established: one without inoculation and the remaining three with rhizobia isolates, all distributed in a random block design, with four replications.

The inoculation of kudzu seeds with the rhizobia isolates was carried out using the seed covering method at the time of sowing, at a rate of 200 mL of inoculum for every 50 kg of seeds. The kudzu was sown in rows, with doses of 8 kg of total seed ha<sup>-1</sup> (2 kg of pure germinable seed per ha).

At 120 d after sowing, samples from 10 plants of each plot were taken and the total number of nodules and the percentage of total effective nodules were determined. The aerial part of the plants was placed in an oven at 70 °C, for 72 h and the ADM was determined. The percentage of ADM (% ADM) was calculated by the relation between the ADM of the control treatment, without inoculation, and the inoculated.

The yield in aerial dry mass of the plants (YADM, t ha<sup>-1</sup>) was determined 180 d after sowing, from the equation:  $YinADM = (\text{green mass} \times \% ADM) / 100$ . The percentage of nitrogen content of the aerial biomass in 200 g of green mass was evaluated by colorimetric methods (Paneque *et al.* 2010). The percentage of increase of this variable in the inoculated treatments with respect to the control without inoculation was also evaluated.

*Statistical analysis.* The data from the acidity tolerance tests in the culture medium were subjected to the normality test (Bartlett test) and variance homogeneity (Kormogorov-Smirnov test). Simple classification variance analysis was applied. The Tukey ( $P < 0.05$ ) means comparison test was used to discriminate differences between the means (Sigarra 1985).

A bifactorial arrangement was used with the inoculation test data under controlled conditions and the

La preparación del suelo se realizó de forma convencional mediante labores de roturación, grada ligera, cruce, grada y surcado. No se aplicó fertilizante ni productos mejoradores de la fertilidad. Se emplearon parcelas con área total de 21 m<sup>2</sup> y área de cálculo de 14 m<sup>2</sup> (seis surcos de 5 m de largo, separados a 70 cm). Se establecieron cuatro tratamientos: uno sin inocular y los tres restantes con aislados de rizobios, todos distribuidos en un diseño de bloques al azar, con cuatro réplicas.

La inoculación de semillas de kudzú con los aislados de rizobios se realizó mediante el método de recubrimiento de la semilla en el momento de la siembra, a razón de 200 mL de inóculo por cada 50 kg de semillas. El kudzú se sembró en los surcos a chorrillo ligero, con dosis de 8 kg de semilla total ha<sup>-1</sup> (2 kg de semilla pura germinable por ha).

A los 120 d después de la siembra, se tomaron muestras de 10 plantas de cada parcela y se determinó el número total de nódulos y el porcentaje de nódulos totales efectivos. La parte aérea de las plantas se colocó en estufa a 70 °C, durante 72 h y se determinó la MSA. El porcentaje de MSA (% MSA) se calculó mediante la relación entre la MSA del tratamiento control, sin inocular, y los inoculados.

El rendimiento en masa seca aérea de las plantas (RendMSA, t ha<sup>-1</sup>) se determinó 180 d después de la siembra, a partir de la ecuación:  $RenMSA = (\text{masa verde} \times \% MSA) / 100$ . Se evaluó el porcentaje de contenido de nitrógeno de la biomasa aérea en 200 g de masa verde mediante métodos colorimétricos (Paneque *et al.* 2010). También se evaluó el porcentaje de incremento de esta variable en los tratamientos inoculados con respecto al control sin inocular.

*Análisis estadístico.* Los datos provenientes de los ensayos de tolerancia a condiciones de acidez en el medio de cultivo se sometieron a la prueba de normalidad (test de Bartlett) y homogeneidad de varianza (test de Kormogorov-Smirnov). Se aplicó análisis de varianza de clasificación simple. Se utilizó el Test de comparación de medias de Tukey ( $P < 0.05$ ) para discriminar diferencias entre las medias (Sigarra 1985).

Un arreglo bifactorial se utilizó con los datos del ensayo de inoculación en condiciones controladas y



strain factors with three levels (1\_2, 2\_4 and K2) and pH with two (6.8 and 4.5) were taken into account. The data were processed similar to that described above, regarding the test of normality and homogeneity of variance. The SPSS 21 program was used for statistical processing (Gray and Kinnear 2012)

The results of the experiment under field conditions were processed by analysis of variance. The Tukey's multiple comparison test was used (Sigarroat 1985) in cases there were significant differences between treatments.

At average values of the petroferic ferruginous nodular gleysol soil of the EEPF Cascajal, Villa Clara, was estimated the confidence interval of means at  $\alpha = 0.05$  (Payton *et al.* 2000). All results were showed in the SigmaPlot program (2001).

## Results

*Tolerance and multiplication of rhizobia isolates under acidity conditions.* Rhizobia isolates takes up to the fourth growth area in the solid ML medium, with pH 4.5, at six incubation days, so they are microorganisms tolerant to this acidity condition (dos Santos Hara and Oliveira 2005). This performance occurred at four days for the isolated 2\_4, at six for 1\_2, and at eight days for K2. It took place in the same culture medium with pH 6.8 (figure 2).

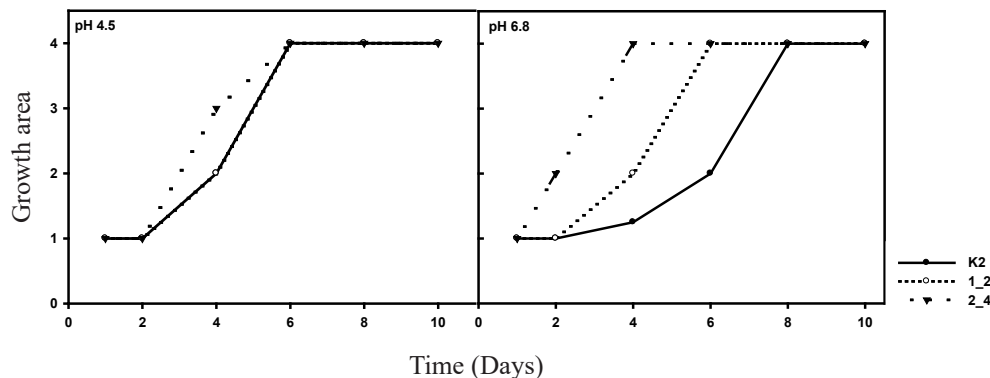


Figure 2. Scoring intervals, according to the growth areas of rhizobia isolates in the Petri dish (pH 4.5 and 6.8) during 10 d of incubation.

In the medium with pH 4.5, isolate 2\_4 grew to the third growth area after four days of incubation. The remaining two isolates grew to the second area in the same interval. The K2 isolate took longer to occupy up to the fourth growth zone in the MY medium, with pH 6.8 (8 d) than in the medium with pH 4.5 (6 d).

The three rhizobia isolates produced small colonies, smaller than 1 mm, in MY medium (pH 4.5 and 6.8) at 10 d of incubation (figure 3).

There were no significant differences between the diameter of the colonies produced by the isolate 1\_2 in the medium with pH 4.5 with respect to those formed with pH 6.8, at six and 10 d of incubation. At six days, the rest of the isolates formed colonies that were

se tuvieron en cuenta los factores cepa con tres niveles (1\_2, 2\_4 y K2) y pH con dos (6.8 y 4.5). Los datos se procesaron de manera similar a lo descrito anteriormente, en cuanto a la prueba de normalidad y homogeneidad de varianza. El programa SPSS 21 se empleó para el procesamiento estadístico (Gray y Kinnear 2012)

Los resultados del experimento en condiciones de campo se procesaron igualmente mediante un análisis de varianza. Se utilizó la d6cima de comparaci6n m6ltiple de Tukey (Sigarroat 1985) en los casos en que hubo diferencias significativas entre tratamientos.

A los valores promedio de los an6lisis del suelo Gleysol nodular ferruginoso petroférrico de la EEPF de Cascajal, Villa Clara, se le estimó el intervalo de confianza de las medias a  $\alpha=0,05$  (Payton *et al.* 2000). Todos los resultados se graficaron en el programa SigmaPlot (2001).

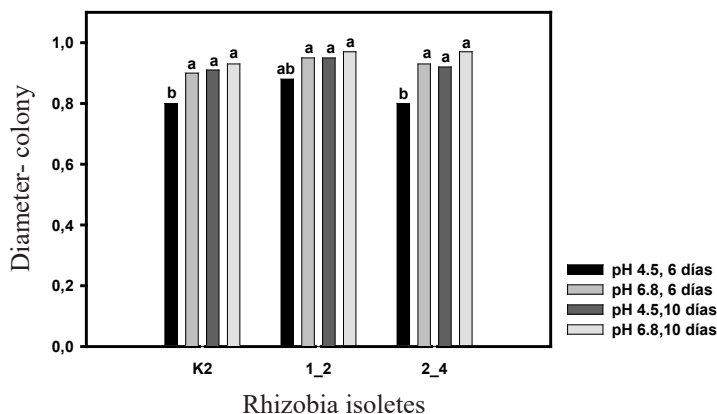
## Resultados

*Tolerancia y multiplicaci6n de los aislados de rizobios en condiciones de acidez.* Los aislados de rizobios ocuparon hasta la cuarta zona de crecimiento en el medio LM s6lido, con pH 4,5, a los seis d6as de incubaci6n, por lo que son microorganismos tolerantes a esta condici6n de acidez (dos Santos Hara y Oliveira 2005). Este comportamiento se produjo a los cuatro d6as para el aislado 2\_4, a los seis para 1\_2, y a los ocho d6as para K2. Tuvo lugar en el mismo medio de cultivo con pH 6.8 (figura 2).

En el medio con pH 4,5, el aislado 2\_4 creci6 hasta la tercera zona de crecimiento a los cuatro d6as de incubaci6n. Los dos aislados restantes crecieron hasta la segunda zona en el mismo intervalo. El aislado K2 demor6 m6s tiempo en ocupar hasta la cuarta zona de crecimiento en el medio LM, con pH 6.8 (8 d) que en el medio con pH 4.5 (6 d).

Los tres aislados de rizobios produjeron colonias peque1as, menores de 1 mm, en medio LM (pH 4,5 y 6,8) a los 10 d de incubaci6n (figura 3).

No se evidenciaron diferencias significativas entre el di6metro de las colonias que produjo el aislado 1\_2 en el medio con pH 4.5 con respecto a las que form6 con pH 6.8, a los seis y a los 10 d de incubaci6n. A los seis d6as, el resto de los aislados formaron colonias que



Common letters do not significantly differ (Tukey, P <0.05)

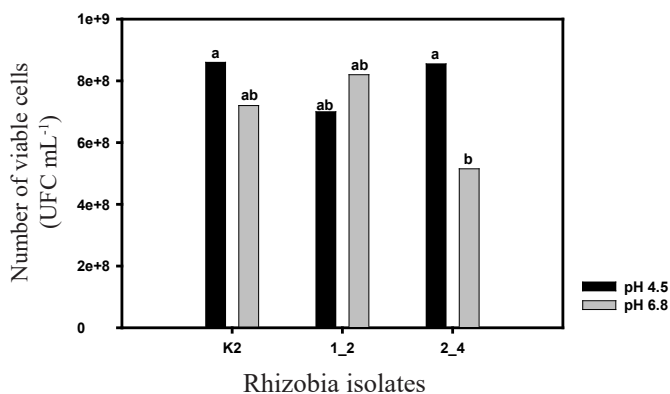
Figure 3. Colony diameter (mm) of rhizobia isolates at 6 and 10 d of incubation (pH 4.5 and 6.8).

significantly higher at pH 6.8 than at pH 4.5. However, at 10 d, there were no significant differences between the isolates, nor between the colonies of the same isolate under different pH conditions.

In the effect of the pH of the medium on the multiplication of the three rhizobia isolates (figure 4), isolate 2\_4 had a CFU number mL<sup>-1</sup> at pH 4.5, which was significantly higher compared to those quantified at pH 6.8. The two remaining isolates showed a similar amount of viable cells under both pH conditions. There were no significant differences between the three isolates in each of the pH conditions studied.

fueron significativamente mayores en pH 6.8 que en pH 4.5. Sin embargo, a los 10 d, no hubo diferencias significativas entre los aislados, ni entre las colonias del mismo aislado en las diferentes condiciones de pH.

En el efecto del pH del medio en la multiplicación de los tres aislados de rizobios (figura 4), el aislado 2\_4 tuvo un número de UFC mL<sup>-1</sup> en pH 4.5, que resultó significativamente superior con respecto a las que se cuantificaron en pH 6.8. Los dos aislados de rizobios restantes presentaron similar cantidad de células viables en las dos condiciones de pH. No se observaron diferencias significativas entre los tres aislados en cada



Same letters do not significantly differ (Tukey P <0.05, n = 3)

Figure 4. Number of viable cells of rhizobia isolates in MY medium (pH 4.5 and 6.8)

Positive effect of rhizobia isolates on the nodulation, growth and yield of tropical kudzu plants, grown under acidity conditions. The analysis of the data from the inoculation test under controlled conditions allowed to detect the influence of each factor separately (strain and pH) (table 2) and the interaction of both factors together, on the nodulation and growth of tropical kudzu plants (table 3).

The strain factor influenced all the variables that were evaluated for nodulation and growth of tropical kudzu

una de las condiciones de pH estudiadas.

Efectos positivos de los aislados de rizobios en la nodulación, crecimiento y rendimiento de plantas de kudzu tropical, cultivadas en condiciones de acidez. El análisis de los datos provenientes del ensayo de inoculación en condiciones controladas permitió detectar la influencia de cada factor por separado (cepa y pH) (tabla 2) y la interacción de ambos factores de manera conjunta, en la nodulación y crecimiento de las plantas de kudzu tropical (tabla 3).

Table 2. Independent effect of strain and pH factors on the nodulation and growth of tropical kudzu plants

Treatments	Nten	DMtN	Root length (cm)	ADM (g)	RDM (g)
Strain					
K2	3.65 <sup>a</sup>	0.0044 <sup>a</sup>	8.02 <sup>c</sup>	0.0411 <sup>b</sup>	0.0061 <sup>a</sup>
1_2	3.15 <sup>b</sup>	0.0037 <sup>b</sup>	9.09 <sup>a</sup>	0.0383 <sup>c</sup>	0.0058 <sup>b</sup>
2_4	2.95 <sup>c</sup>	0.0036 <sup>c</sup>	8.86 <sup>b</sup>	0.0424 <sup>a</sup>	0.0054 <sup>c</sup>
F-Test	*	***	*	***	***
SE+	0.42	0.0005	0.38	0.0025	0.0003
pH					
6.8	3.67 <sup>a</sup>	0.0041 <sup>a</sup>	8.98 <sup>a</sup>	0.042 <sup>a</sup>	0.0059 <sup>a</sup>
4.5	2.84 <sup>b</sup>	0.0038 <sup>b</sup>	8.33 <sup>b</sup>	0.040 <sup>b</sup>	0.0056 <sup>b</sup>
F-Test	*	***	*	***	***
SE+	0.33	0.0004	0.31	0.0021	0.0003

NteN, number of total effective nodules; DMtN, dry mass of total nodules; ADM, aerial dry mass; RDM, root dry mass, Same letters do not significantly differ (Tukey P < 0.05, n=10)

Table 3. Combined effect of strain and pH factors on the nodulation of tropical kudzu.

(Strain*pH)	NNmr	NtN	NeNmr
K2, pH 6,8	3.30 <sup>a</sup>	3.80 <sup>a</sup>	3.00 <sup>ab</sup>
K2, pH 4,5	3.44 <sup>a</sup>	4.11 <sup>a</sup>	3.33 <sup>ab</sup>
1_2, pH 6.8	3.50 <sup>a</sup>	4.00 <sup>a</sup>	3.40 <sup>a</sup>
1_2, pH 4.5	2.10 <sup>ab</sup>	2.60 <sup>ab</sup>	1.90 <sup>ab</sup>
2_4, pH 6.8	3.30 <sup>a</sup>	4.10 <sup>a</sup>	3.20 <sup>ab</sup>
2_4, pH 4.5	0.90 <sup>b</sup>	1.40 <sup>b</sup>	1.50 <sup>b</sup>
SE+	0.61*	0.76*	0.64*

NNmr number of nodules in main root, NtN number of total nodules, NeNmr number of effective nodules in the main root.

Same letters do not significantly differ (Tukey P < 0.05 n=10),

plants (table 2). The strain K2 stands out, with significant differences with respect to the rest of the strains, except in the root length and the ADM, variables where 1\_2 and 2\_4 highlight, respectively.

The pH factor, when was independently analyzed (table 2), allowed to identify the negative effect of the acidity of the medium on the nodulation and growth of kudzu plants. However, in the analysis of the influence of both factors (pH and strain) (table 3) on the NNmr, TN and NENmr there were no significant differences between the plants inoculated with K2 and with 1\_2 in pH 4.5 and 6.8. In the rest of variables there was no interaction between both factors.

The field condition test showed that rhizobia isolates produced a significant increase in the number of total nodules, ADM and nitrogen content in the aerial biomass of kudzu plants, grown in an acid petroferric ferruginous nodular Gleysol soil, in Cascajal, Villa Clara (table 4).

More than 60 % of total nodules were effective in BNF in plants inoculated with rhizobia isolates. K2 and

El factor cepa influyó en todas las variables que se evaluaron de nodulación y crecimiento de las plantas de kudzu tropical (tabla 2). Se destaca la cepa K2, con diferencias significativas con respecto al resto de las cepas, excepto en el largo de raíz y la MSA, variables donde sobresalen 1\_2 y 2\_4, respectivamente.

El factor pH, cuando se analizó de manera independiente (tabla 2), permitió identificar el efecto negativo de la acidez del medio en la nodulación y crecimiento de las plantas de kudzu. Sin embargo, en el análisis de la influencia de ambos factores (pH y cepa) (tabla 3) en el NNrp, NNt y NNerp no se identificaron diferencias significativas entre las plantas inoculadas con K2 y con 1\_2 en pH 4.5 y 6.8. En el resto de las variables no hubo interacción entre ambos factores.

En el ensayo en condiciones de campo se constató que los aislados de rizobios produjeron incremento significativo en el número de nódulos totales, MSA y contenido de nitrógeno en la biomasa aérea de las plantas de kudzu, cultivadas en un suelo Gleysol nodular ferruginoso petroférico ácido, en Cascajal, Villa Clara (tabla 4).

Table 4. Effect of rhizobia isolates on the nodulation and growth of tropical kudzu plants, grown in acid petroferic ferruginous nodular Gleysol soil, in Cascajal, Villa Clara.

Treatments	Nodulation		ADM (t ha <sup>-1</sup> )	% increase in ADM (t ha <sup>-1</sup> )	Nitrogen content in aerial biomass (%)	% increase in nitrogen content in aerial biomass
	TN	NteN (%)				
Control without inoculation	21 <sup>c</sup>	31	4.03 <sup>c</sup>	-	2.19 <sup>b</sup>	-
K2	53 <sup>a</sup>	93	7.27 <sup>a</sup>	80.4	3.28 <sup>a</sup>	49.77
1_2	50 <sup>a</sup>	95	7.11 <sup>a</sup>	76.43	3.33 <sup>a</sup>	52.05
2_4	32 <sup>b</sup>	68	5.19 <sup>b</sup>	28.78	2.52 <sup>b</sup>	15.07
SE±	2**	-	0.23**	-	0.04**	-

NtN number of total nodules, NteN number of total effective nodules, ADM aerial dry mass.

Same letters do not significantly differ (Tukey P < 0.05, n=10).

1\_2 highlighted with more than 90 %. Both isolates also produced an increase of more than 75 % of the yield of the aerial dry mass, and more than 45 % of the nitrogen content of the aerial biomass of the kudzu plants.

### Discussion

The use of biofertilizers based on rhizobia strains, adapted to stressful conditions in the soil, such as acidity, is a biotechnological practice that offers a solution to improve agricultural production. The isolation, characterization and use of these bacteria in cultures of economic importance, especially those affected by abiotic factors as aggressive as the acidity of the soil, is increasingly important. This research allowed identifying potentialities in rhizobia strains, such as promising microorganisms for the inoculation of tropical kudzu in Cuban acid soils.

The three isolates, *Bradyrhizobium* K2, 1\_2 and 2\_4, showed slow growth in the culture medium (figure 2) and formed colonies smaller than 1 mm in diameter (figure 3). These characteristics have been previously reported for the *Bradyrhizobium* genus (Wang and Martínez-Romero 2001 and da Costa *et al.* 2017).

The soils acidity constitutes a factor that limits bacterial growth (Turan *et al.* 2017). However, the three isolates studied in this research showed tolerance to acidic pH. The isolates grew in all areas of the Petri dishes where they were inoculated (figure 2). The acidity condition did not affect the diameter of their colonies (figure 3) and the number of viable cells during the exponential growth phase either (figure 4). *Bradyrhizobium* strains, equally tolerant to acid pH, have been recently identified (Helene *et al.* 2017 and Jang *et al.* 2018).

The three bacterial isolates excrete base to the culture medium (Hernández *et al.* 2013). This characteristic is also representative of the *Bradyrhizobium* genus (Wang and Martínez-Romero 2001) and has been interpreted as one of the acidity tolerance strategies (Graham *et al.* 1994), which allows neutralizing the acidic pH and consuming nutrients from the medium. The production of bases could explain the

Más del 60 % de los nódulos totales fueron efectivos en la FBN en las plantas inoculadas con los aislados de rizobios. Se destacaron K2 y 1\_2 con más del 90 %. Ambos aislados además, produjeron incremento de más del 75 % del rendimiento de la masa seca aérea, y más del 45 % del contenido de nitrógeno de la biomasa aérea de las plantas de kudzú.

### Discusión

El empleo de biofertilizantes basados en cepas de rizobios, adaptadas a condiciones estresantes en el suelo, como la acidez, es una práctica biotecnológica que ofrece una solución para mejorar la producción agrícola. El aislamiento, caracterización y empleo de estas bacterias en cultivos de importancia económica, sobre todo de aquellos afectados por factores abióticos tan agresivos, como la acidez de los suelos, es cada vez de mayor importancia. Esta investigación permitió identificar potencialidades en cepas de rizobios, como microorganismos promisorios para la inoculación del kudzú tropical en suelos ácidos cubanos.

Los tres aislados, *Bradyrhizobium* K2, 1\_2 y 2\_4, presentaron lento crecimiento en el medio de cultivo (figura 2) y formaron colonias menores de 1 mm de diámetro (figura 3). Estas características se han informado anteriormente para el género *Bradyrhizobium* (Wang y Martínez-Romero 2001 y da Costa *et al.* 2017).

La acidez de los suelos constituye un factor que limita el crecimiento bacteriano (Turan *et al.* 2017). Sin embargo, los tres aislados que se estudiaron en este trabajo mostraron tolerancia a pH ácido. Los aislados crecieron en todas las zonas de las placas Petri donde se inocularon (figura 2). La condición de acidez no afectó el diámetro de sus colonias (figura 3) y el número de células viables durante la fase de crecimiento exponencial tampoco (figura 4). Cepas de *Bradyrhizobium*, igualmente tolerantes a pH ácidos, han sido identificadas recientemente (Helene *et al.* 2017 y Jang *et al.* 2018).

Los tres aislados bacterianos excretan base al medio de cultivo (Hernández *et al.* 2013). Esta característica también es representativa del género *Bradyrhizobium* (Wang y Martínez-Romero 2001) y se ha interpretado como una de las estrategias de tolerancia a la acidez



performance of the three rhizobia isolates in the MY medium with pH 4.5.

The isolates 2\_4 and K2 showed performances that suggest greater adaptation to acidity conditions (pH 4.5) than in mediums close to neutrality (pH 6.8). In general, they occupied more areas in the Petri dishes under acidic conditions than at pH 6.8. In addition, 2\_4 had a higher concentration of viable cells at pH 4.5. Similar results with the K2 isolate were previously obtained (Pérez 2010). Both isolates, in addition to the basic excretion, could have other mechanisms that allow them to remain viable and multiply in acidity conditions in the medium. These mechanisms could be the accumulation of internal buffers, the synthesis of proteins of acid shock, the exclusion of protons, the synthesis of surface lipopolysaccharides and the decrease in the permeability of the cytoplasmic membrane (Geddes *et al.* 2014).

The physicochemical characteristics of the soils of Cascajal in Villa Clara, mainly its acidity, constitute a decisive factor in the selection of rhizobia populations that reside there (Morón *et al.* 2005). The mechanisms of tolerance to this condition allow them to maintain intracellular pH between 7.2 and 7.5 to survive in free life way (Madigan *et al.* 2011) and establish symbiosis with the legumes resident in these soils. The adaptation of rhizobia to acidity requires the joint collaboration of various central functions of metabolism, such as the expression of membrane proteins, related to respiration and changes in the central metabolism of carbon and lipids (Draghi *et al.* 2016).

As part of this research, inoculation tests of rhizobia isolates were carried out in tropical kudzu seeds under acidity conditions. In the experiment, under controlled conditions, the analysis of the pH factor separately allowed to conclude that acidity decreased nodulation and plant growth. Plá and Cobos-Porras (2015) reported the negative effect of acidity on the formation of nodules. However, the joint analysis of the strain and pH factors allowed concluding that K2 and 1\_2, when inoculated under acidity conditions, managed to counteract the negative effect of acidity on the nodulation of plants (table 3). The acid tolerance of both isolates (figures 2, 3 and 4), perhaps due to their ability to produce base to the medium (Hernández *et al.* 2013), would neutralize the acidity in the rhizosphere environment of kudzu plants.

This mechanism would allow adequate colonization, nodule formation and subsequent BNF, and would favor N to the kudzu plant for their growth. Therefore, the plant would be better prepared to be establishing under acidity conditions. There were no significant differences in any of the plant growth variables, when the pH and strain factors were analyzed together. These results could support the proposed hypothesis.

(Graham *et al.* 1994), la cual permite neutralizar el pH ácido y consumir los nutrientes del medio. La producción de bases pudiera explicar el comportamiento de los tres aislados de rizobios en el medio LM con pH 4.5.

Los aislados 2\_4 y K2 presentaron comportamientos que sugieren mayor adaptación a las condiciones de acidez (pH 4.5) que en medios cercanos a la neutralidad (pH 6.8). De manera general, ocuparon mayor cantidad de zonas en las placas Petri en condiciones ácidas que en pH 6,8. Además, 2\_4 presentó mayor concentración de células viables en pH 4.5. Resultados similares con el aislado K2 se obtuvieron anteriormente (Pérez 2010). Ambos aislados, además de la excreción de base, pudieran contar con otros mecanismos que les permiten mantenerse viables y multiplicarse en condiciones de acidez en el medio. Estos mecanismos pudieran ser la acumulación de buffer internos, la síntesis de proteínas de shock ácido, la exclusión de protones, la síntesis de lipopolisacáridos de superficie y la disminución de la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Geddes *et al.* 2014).

Las características físico-químicas de los suelos de Cascajal en Villa Clara, fundamentalmente su acidez, constituyen un factor decisivo en la selección de las poblaciones de rizobios que residen en él (Morón *et al.* 2005). Los mecanismos de tolerancia a esta condición les permiten mantener pH intracelular entre 7.2 y 7.5 para sobrevivir en forma de vida libre (Madigan *et al.* 2011) y establecer la simbiosis con las leguminosas residentes en estos suelos. La adaptación de los rizobios a la acidez requiere la colaboración conjunta de diversas funciones centrales del metabolismo, como la expresión de proteínas de membrana, relacionadas con la respiración y cambios en el metabolismo central del carbono y los lípidos (Draghi *et al.* 2016).

Como parte de esta investigación, se realizaron ensayos de inoculación de los aislados de rizobios en semillas de kudzú tropical en condiciones de acidez. En el experimento, en condiciones controladas, el análisis del factor pH por separado permitió concluir que la acidez disminuyó la nodulación y el crecimiento de las plantas. Plá y Cobos-Porras (2015) refirieron el efecto negativo de la acidez en la formación de los nódulos. Sin embargo, el análisis conjunto de los factores cepa y pH permitió concluir que K2 y 1\_2, cuando se inoculan en condiciones de acidez, lograron contrarrestar el efecto negativo de la acidez en la nodulación de las plantas (tabla 3). La ácido tolerancia de ambos aislados (figuras 2, 3 y 4), quizás producto de su capacidad de producir base al medio (Hernández *et al.* 2013), neutralizaría la acidez en el entorno de la rizosfera de las plantas de kudzú.

Este mecanismo permitiría la adecuada colonización, formación del nódulo y posterior FBN, y propiciaría el N a la planta de kudzú para su crecimiento adecuado. Por lo tanto, la planta se encontraría mejor preparada para establecerse en condiciones de acidez. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables de crecimiento de las plantas, cuando se analizaron

The field inoculation test showed the positive effect of rhizobia isolates on effective nodulation, BNF and ADM, as well as on the nitrogen content of the aerial biomass of kudzu plants. Similar results were obtained in this same crop (González *et al.* 2016) and in canavalia (Martín *et al.* 2015).

Many legumes require neutral or slightly acidic pH for growth and nodulation. pH values, less than 5.5, generally causes problems in the plant establishment and, consequently, in the BNF (Bordeleau and Prévost 1994). However, the inoculation of kudzu plants with the three rhizobia isolates considerably increased the number of total effective nodules in the acidic petroferic ferruginous nodular Gleysol soil, in Cascajal area (table 4). The acidity tolerance of rhizobia isolates that were used in this test could have been a determining factor for the establishment of an effective symbiosis between the kudzu plants and the bacteria.

A greater number of effective nodules for BNF in leguminous plants allow the increase of nitrogen content. This element is used for the formation of new structures that, in turn, it is an increase in plant growth (Gardner *et al.* 2017). The increase in the percentages of the nitrogen content in the aerial biomass and of the aerial dry mass of the plants inoculated with the isolates, is clear evidence of this phenomenon

There were nodes in the roots of the plants that were used as a negative control of the experiment. This suggests the presence of compatible rhizobia on the soil in the Cascajal area. However, this nodulation, and the effects that were found in the growth of the plants, were lower to that found in the inoculated plants. The use of more efficient strains and the application of higher concentration of bacteria offer advantages in colonization during root emission.

The rhizobia isolates used in this research were selected in previous researches, as promising for the inoculation of tropical kudzu. This selection was based on some physiological characteristics, such as the use of various carbon sources, the production of polyhydroxybutyrates (PHB) and the nodulation of this forage legume (Hernández *et al.* 2013).

These strains, in addition to the advantages they have for the form of application on the seed and its tolerance to acidity, have several characteristics that allow them to compete with other soil bacteria during the process of colonization and formation of nodules in kudzu plants. The inoculation of legumes with competitive and specific strains considerably increases the efficiency of rhizobia-legume symbiosis and BNF (Andrews and Andrews 2017).

It is concluded that the use of tolerant acid rhizobia for the inoculation of tropical kudzu, grown under acidity conditions, guarantees the successful establishment of symbiosis. The isolates of *Bradyrhizobium* K2, 1\_2 and 2\_4, not only allow an effective nodulation in the BNF,

conjuntamente los factores pH y cepa. Estos resultados pudieran avalar, en alguna medida, la hipótesis propuesta.

El ensayo de inoculación en campo demostró el efecto positivo de los aislados de rizobios en la nodulación efectiva, FBN y MSA, así como en el contenido de nitrógeno de la biomasa aérea de plantas de kudzú. Resultados similares se obtuvieron en este mismo cultivo (González *et al.* 2016) y en canavalia (Martín *et al.* 2015).

Muchas leguminosas requieren pH neutro o ligeramente ácido para su crecimiento y nodulación. Valores de pH, inferiores a 5.5, desencadenan generalmente problemas en el establecimiento de la planta y, por consiguiente, en la FBN (Bordeleau y Prévost 1994). Sin embargo, la inoculación de las plantas de kudzú con los tres aislados de rizobios incrementó considerablemente el número de nódulos efectivos totales en el suelo Gleysol nodular ferruginoso petroférico ácido, de la zona de Cascajal (tabla 4). La tolerancia a la acidez de los aislados de rizobios que se emplearon en este ensayo pudiera haber sido el factor determinante para el establecimiento de una simbiosis efectiva entre las plantas de kudzú y la bacteria.

La mayor cantidad de nódulos efectivos para la FBN en las plantas leguminosas permite el incremento del contenido de nitrógeno. Este elemento se emplea para la formación de nuevas estructuras que, a su vez, se traduce en aumento del crecimiento vegetal (Gardner *et al.* 2017). El incremento en los porcentajes del contenido de nitrógeno de la biomasa aérea y de la masa seca aérea de las plantas inoculadas con los aislados, es clara evidencia de este fenómeno.

Se observaron nódulos en las raíces de las plantas que se emplearon como control negativo del experimento. Esto sugiere la presencia de rizobios compatibles en el suelo de la zona de Cascajal. Sin embargo, esta nodulación, y los efectos que se constataron en el crecimiento de las plantas, fueron inferiores al encontrado en las plantas inoculadas. La utilización de cepas más eficientes y la aplicación de mayor concentración de bacterias ofrecen ventajas en la colonización durante la emisión de la raíz.

Los aislados de rizobios empleados en esta investigación fueron seleccionados en investigaciones previas, como promisorias para la inoculación de kudzú tropical. Esta selección se basó en algunas características fisiológicas, como la utilización de diversas fuentes de carbono, la producción de polihidroxibutiratos (PHB) y la nodulación de esta leguminosa forrajera (Hernández *et al.* 2013).

Estas cepas, además de las ventajas que poseen por la forma de aplicación sobre la semilla y su tolerancia a la acidez, cuentan con diversas características que les permiten competir con otras bacterias del suelo durante el proceso de colonización y formación de los nódulos en las plantas de kudzú. La inoculación de las leguminosas con cepas competitivas y específicas incrementa considerablemente la eficiencia de la simbiosis rizobios-leguminosa y la FBN (Andrews y Andrews 2017).

Se concluye que la utilización de rizobios ácido tolerantes para la inoculación del kudzú tropical, cultivado en condiciones de acidez, garantiza el establecimiento

but also increase these variables and the performance of kudzu under acidity conditions in the field. These results constitute an attractive proposal to validate inoculants based on these bacterial isolates in other acidic soils of the country.

exitoso de la simbiosis. Los aislados de *Bradyrhizobium* K2, 1\_2 y 2\_4, no solo permiten una nodulación efectiva en la FBN, sino que incrementan estas variables y el rendimiento del kudzú en las condiciones de acidez en el campo. Estos resultados constituyen una propuesta atractiva para validar inoculantes basados en estos aislados bacterianos en otros suelos ácidos del país.

## References

- Abd-Alla, M.H., Issa, A.A. & Ohyama, T. 2014. "Impact of harsh environmental conditions on nodule formation and dinitrogen fixation of legumes". In: *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*, Vol. 9. 1st Ed. Ohyama, T. Assiut, Egypt, p, 201. ISBN: 978-953-51-1216-7, DOI: 10.5772/56990
- Andrews, M. & Andrews, M.E. 2017. "Specificity in legume-rhizobia symbioses". *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4): 705, ISSN: 1422-0067, DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>.
- Bordeleau, L.M. & Prévost, D. 1994. "Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments". *Plant and Soil*, 161: 115–125, ISSN: 0032079X, DOI: 10.1007/BF02183092.
- da Paz, C.C., do Rêgo, A.C., Faturi, C., de Souza Rodrigues, L.F., Rodrigues Filho, J.A., de Souza, P.H. & Conceição, D.M. 2016. "Tropical kudzu as a protein source in sheep diets". *Semina: Ciências Agrárias*, 37(2): 933–945, ISSN: 1676-546X.
- Da Costa, E.M., Guimarães, A.A., Vicentin, R.P., de Almeida Ribeiro, P.R., Leão, A.C.R., Balsanelli, E., Lebbe, L., Aerts, M., Willems, A. & de Souza Moreira, F.M. 2017. "*Bradyrhizobium brasilense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils". *Archives of Microbiology*, 199(8): 1211–1221, ISSN: 0302-8933, DOI: 10.1007/s00203-017-1390-1.
- Oliveira, L.A. de & Magalhães, H.P. de 1999. "Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria". *Revista de Microbiologia*, 30(3): 203–208, ISSN: 0001-3714.
- dos Santos Hara, F.A. & de Oliveira, L.A. 2005. "Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas". *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(7): 667–672, ISSN: 1678-3921.
- Draghi, W.O., Del Papa, M.F., Hellweg, C., Watt, S.A., Watt, T.F., Barsch, A., Lozano, M.J., Lagares Jr, A., Salas, M.E. & López, J.L. 2016. "A consolidated analysis of the physiologic and molecular responses induced under acid stress in the legume-symbiont model-soil bacterium *Sinorhizobium meliloti*". *Scientific Reports*, 6: 29278, ISSN: 2045-2322, DOI: <https://doi.org/10.1038/srep29278>.
- Dubey, H., Rao, D.L.N., Akhter, S., Mehta, G. & Shahi, D.K. 2018. "Isolation of Novel Acid Soil-tolerant Isolates of Rhizobium from 'Pigeon Pea' and Proteomic Characterization by Utilizing MALDI-TOF/TOF and Peptide Mass Fingerprinting' Approach to Identify Genes Associated with Acid-soil Tolerance". *Environment and Ecology Research*, 6(1): 45–59, ISSN: 2331-6268, DOI: 10.13189/eer.2018.060104.
- Gardner, F.P., Pearce, R.B. & Mitchell, R.L. 2017. *Physiology of crop plants*. 2nd Ed. Ed. Scientific Publishers, Jodhpur, India, p. 320, ISBN: 8172336624.
- Geddes, B.A., González, J.E. & Oresnik, I.J. 2014. "Exopolysaccharide production in response to medium acidification is correlated with an increase in competition for nodule occupancy". *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(12): 1307–1317, ISSN: 0894-0282, DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-14-0168-R>.
- González Cañizarez, P.J., Pedroso, J.F.R., Espinosa, R.R., Jiménez, A.H. & Flores, G.C. 2016. "Effectiveness of inoculation of two forage legumes grown on two soil types with arbuscular mycorrhizal fungi". *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 4(2): 82–90, ISSN: 2346-3775.
- Goulding, K.W.T. 2016. "Soil acidification and the importance of liming agricultural soils with particular reference to the United Kingdom". *Soil Use and Management*, 32(3): 390–399, ISSN: 0266-0032, DOI: <https://doi.org/10.1111/sum.12270>.
- Graham, P.H. & Vance, C.P. 2003. "Legumes: Importance and constraints to greater use". *Plant Physiology*, 131(3): 872–877, ISSN: 0032-0889, DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.017004>.
- Graham, P.H., Draeger, K.J., Ferrey, M.L., Conroy, M.J., Hammer, B.E., Martinez, E., Aarons, S.R. & Quinto, C. 1994. "Acid pH tolerance in strains of Rhizobium and Bradyrhizobium, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899". *Canadian Journal of Microbiology*, 40(3): 198–207, ISSN: 0008-4166, DOI: <https://doi.org/10.1139/m94-033>.
- Gray, C.D. & Kinnear, P.R. 2012. *IBM SPSS statistics 19 made simple*. 1st Ed. Editorial Hove: Psychology Press, U.K., p. 688 p., ISBN: 1135899835.
- Helene, L.C.F., Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A. & Hungria, M. 2017. "*Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*)". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6): 1827–1834, ISSN: 1466-5034, DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001870>.
- Hernández, A., Pérez, J.M., Bosch, D. & Castro, N. 2015. *Clasificación de los suelos de Cuba*. 1st Ed. Editorial Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Mayabeque, Cuba, p. 91, ISBN: 978-959-7023-77-7.
- Hernández, I., Nápoles, M.C., Rosales, P.R., Baños, R. & Ramírez, J.F. 2013. "Selección de aislados de rizobios provenientes de nódulos de la leguminosa forrajera *Pueraria phaseoloides* (kudzú tropical)". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 47(3): 311–318, ISSN: 0034-7485.
- Jang, J., Ashida, N., Kai, A., Isobe, K., Nishizawa, T., Otsuka, S., Yokota, A., Senoo, K. & Ishii, S. 2018. "Presence of Cu-Type (NirK) and cd1-Type (NirS) Nitrite Reductase Genes in the Denitrifying Bacterium *Bradyrhizobium nitroreducens*



- sp. nov.”. *Microbes and Environments*, 33(3): 326–331, ISSN: 1342-6311, DOI: <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME18039>.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., & Parker, J. 2003. *Brock, biology of Microorganisms*. 10th Ed. Ed. Benjamin Cummings, Southern Illinois, United States of America, p. 1002, ISBN: 0130491470.
- Martín, G.M., Reyes, R. & Ramírez, J.F. 2015. “Coinoculación de *Canavalia ensiformis* (L.) DC con *Rhizobium* y Hongos micorrízicos arbusculares en dos tipos de suelos de Cuba”. *Cultivos Tropicales*, 36(2): 22–29, ISSN: 0258-5936.
- Morón, B., Soria-Díaz, M.E., Ault, J., Verroios, G., Noreen, S., Rodríguez-Navarro, D.N., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Megías, M. & Sousa, C. 2005. “Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899”. *Chemistry & Biology*, 12(9): 1029–1040, ISSN: 1074-5521, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.06.014>.
- Norris, D.O. & Dates, R.A. 1976. “Legume bacteriology”. In: *Tropical Pasture Research. Principles and Methods*. C.A.B. Bill. 51:134.
- Paneque-Pérez, V.M., Calaña, J.M., Calderón, M., Borges, Y., Hernández, T. & Caruncho, M. 2010. *Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos*. 1st Ed. Ed. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Mayabeque, Cuba, p.42, ISBN: 9597023512.
- Payton, M.E., Miller, A.E. & Raun, W.R. 2008. “Testing statistical hypotheses using standard error bars and confidence intervals”. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31(5–6): 547–551, ISSN: 0010-3624, DOI: <https://doi.org/10.1080/00103620009370458>.
- Pérez, G. 2010. Selección de aislados de rizobio provenientes de la leguminosa forrajera *Pueraria phaseoloides* (kudzu tropical), cultivada en condiciones de acidez. Master of Science Thesis. Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, La Habana, Cuba.
- Plá, C.L. & Cobos-Porras, L. 2015. “Salinity: physiological impacts on legume nitrogen fixation”. In: *Legume Nitrogen Fixation in a Changing Environment*. 1st Ed. Ed. Sulieman, S. & Tran, L. Springer Cham. Granada, Spain, p. 35–65, ISBN: 978-3-319-06212-9, DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-06212-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-06212-9_3).
- Reeve, W.G., Bräu, L., Castelli, J., Garau, G., Sohlenkamp, C., Geiger, O., Dilworth, M.J., Glenn, A.R., Howieson, J.G. & Tiwari, R.P. 2006. “The *Sinorhizobium medicae* WSM419 lpiA gene is transcriptionally activated by FsrR and required to enhance survival in lethal acid conditions”. *Microbiology*, 152(10): 3049–3059, ISSN: 1465-2080.
- Saldaña, J.M. 2017. “Aislamiento e Identificación de Cepas nativas de *Rhizobium phaseoli* de Suelo de la Presa de la Juventud de Marín, Nuevo León.”. *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*, 4(7), ISSN: 2007-8412.
- Sarr, P.S., Araki, S., Begoude, D.A., Yemefack, M., Manga, G.A., Yamakawa, T. & Htwe, A.Z. 2016. “Phylogeny and nitrogen fixation potential of Bradyrhizobium species isolated from the legume cover crop *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth. in Eastern Cameroon”. *Soil Science and Plant Nutrition*, 62(1): 13–19, ISSN: 0718-9516, DOI: <https://doi.org/10.1080/0380768.2015.1086279>.
- Sigarroa, A. 1985. *Biometría y Diseño Experimental*. 1st Ed. Editorial Pueblo y Educación, La Habana, Cuba, p. 319.
- Singh, S. & Varma, A. 2017. “Structure, function, and estimation of leghemoglobin”. In: *Rhizobium Biology and Biotechnology*. 1st Ed. Ed. Hansen A., Choudhary, D., Agrawal, P., Varma, A. Springer. Noida, India, p. 309–330, ISBN: 1613-3382, DOI: [10.1007/978-3-319-64982-5\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-64982-5_15).
- Toledo, M. 2016. *Manejo de suelos ácidos de las zonas altas de Honduras*. 1st Ed. Editorial Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Tegucigalpa, Honduras, p. 152, ISBN: 9789292486631.
- Turan, M., Kitir, N., Elkoca, E., Uras, D., Ünek, C., Nikerel, E., Özdemir, B.S., Tarhan, L., Eşitken, A. & Yildirim, E. 2010. “Nonsymbiotic and Symbiotic Bacteria Efficiency for Legume Growth Under Different Stress Conditions”. In: *Microbes for Legume Improvement*, 1st Ed. Ed. Zaidi A., Khan, M., Musarrat, J. Springer. Istanbul, Turkey, p. 387–404, ISBN 978-3-211-99753-6, DOI: [10.1007/978-3-211-99753-6](https://doi.org/10.1007/978-3-211-99753-6).
- VanLoon, G.W. & Duffy, S.J. 2017. *Environmental chemistry: a global perspective*. 4th Ed. Ed. Oxford University Press, Oxford, England, p. 573, ISBN: 978-0-19-108924-4.
- Vincent, J.M. 1970. “A manual for the practical study of the root-nodule bacteria”. In: *International Programme Handbook*. 15th Ed. Ed. Blackwele Scientific Publications. Oxford-Edinburgh, England, p. 164, DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.19720120524>
- Vitarello, V.A., Capaldi, F.R. & Stefanuto, V.A. 2005. “Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants”. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1): 129–143, ISSN: 1677-0420.
- Wang, E.T. & Martínez-Romero, J.C. 2001. “Taxonomía de rhizobium”. In: *Microbios*. 1st Ed. Eds. Martínez-Romero, E. & Martínez-Romero, J.C. Editorial Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. México, p. 501, ISBN 968-36-8879-9.
- Youseif, S., Abd El-Megeed, F. & Saleh, S. 2017. “Improvement of faba bean yield using *Rhizobium*/Agrobacterium inoculant in low-fertility sandy soil”. *Agronomy*, 7(2): 1–12, ISSN: 2073-4395, DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy7010002>.
- Zaman, A., Zaman, P., Hedayetullah, M. & Talukder, M.L. 2015. “Management of Acid Soils for Sustainable Crop Production in Eastern India”. *Research & Reviews: Journal of Crop Science and Technology*, 4(3): 22–32, ISSN: 2319-3395.

**Received: April 22, 2019**

**Accepted: October 24, 2019**