

Selection of promising rhizobia to inoculate herbaceous legumes in saline soils

Selección de rizobios promisorios para la inoculación de leguminosas herbáceas en suelos salinos

I. Hernández¹, Susana L. Estévez², Maida D. Peña² and María C. Nápoles¹

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, C.P. 32 700

²Universidad de Holguín, Sede "Oscar Lucero Moya". Gaveta postal 57, Holguín, C.P. 80100

Email: ionel@inca.edu.cu

Susana L. Estévez: <https://orcid.org/0000-0001-8616-2155>

Maida D. Peña: <https://orcid.org/0000-0002-7886-0399>

María C. Nápoles: <https://orcid.org/0000-0003-1413-1717>

Salinity of soils constitutes a limiting factor for growth and development of legumes of agricultural and livestock interest. The objective of this study was to select rhizobia isolates with potentialities to improve the establishment of herbaceous legumes in saline soils. Nodulation pattern of the herbaceous legumes *Desmodium triflorum* (L.) DC., *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC. and *Crotalaria retusa* L., established in a strongly saline soil and under water deficit conditions, was studied. Possible rhizobia were isolated from the rhizosphere and from nodules of these plants, and were culturally, morphologically and physiologically characterized. In addition, nodulation tests of rhizobia isolates were carried out in siratro plants under controlled conditions. The three legumes presented small nodules and scarce nodulation. Twelve possible isolates of rhizobia were obtained. Of these, 66.7% showed cultural and physiological characteristics similar to strains of Rhizobiaceae family and 33.3 % similar to Bradyrhizobium strains. Out of these isolates, 100 % produced effective nodules for biological nitrogen fixation in siratro plants. Plants inoculated with Riz 5-1, Riz 8-11 and Riz 8-12 isolates presented higher number and dry mass of nodules, aerial dry mass and radical dry mass. These isolates survive saprophytically in soils affected by water deficit and salinity, which makes them attractive for the preparation of bio-preparations that allow the rehabilitation of pastures and forages under the previously mentioned conditions.

Key words: *Rhizobium*, salinity, forage, characterization, growth

Traditionally, herbaceous legumes of *Desmodium*, *Alysicarpus* and *Crotalaria* genera have been used in the control of soil erosion, restoration of its chemical properties, as forage and green manure (Midega *et al.* 2017 and DemLew *et al.* 2019). Furthermore, they increase the availability of macro and micronutrients for companion crops (Chidowe *et al.* 2014 and Trevisan *et al.* 2017). *Desmodium* and *Alysicarpus* have broad prospects for the development of cattle rearing, since they are non-toxic, have high palatability, high nutritional value and good digestibility of dry matter (Arango *et al.* 2016). Biopreparations made from *Crotalaria* cause mortality to pest insects populations and herbicides (Atuesta *et al.* 2017 and da Costa *et al.* 2019).

La salinidad de los suelos constituye un factor limitante del crecimiento y desarrollo de leguminosas de interés agrícola y ganadero. El objetivo de este trabajo fue seleccionar aislados de rizobios con potencialidades para mejorar el establecimiento de leguminosas herbáceas en suelos salinos. Se estudió el patrón de nodulación de las leguminosas herbáceas *Desmodium triflorum* (L.) DC., *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC. y *Crotalaria retusa* L., establecidas en un suelo fuertemente salino y en condiciones de déficit hídrico. Se aislaron posibles rizobios de la rizosfera y de nódulos de estas plantas y se caracterizaron cultural, morfológica y fisiológicamente. Además, se realizaron ensayos de nodulación de los aislados de rizobios en plantas de siratro, en condiciones controladas. Las tres leguminosas presentaron nódulos pequeños y escasa nodulación. Se obtuvieron 12 aislados posibles rizobios. De ellos, 66.7 % presentó características culturales y fisiológicas similares a cepas de la familia Rhizobiaceae y 33.3 % a cepas del género Bradyrhizobium. De estos aislados, 100 % produjo nódulos efectivos en la fijación biológica del nitrógeno en plantas de siratro. Las plantas que se inocularon con los aislados Riz 5-1, Riz 8-11 y Riz 8-12 presentaron mayor número y masa seca de los nódulos, masa seca aérea y masa seca radical. Estos aislados sobreviven saprofiticamente en suelos afectados por el déficit hídrico y la salinidad, cualidad que los hace atractivos para la elaboración de biopreparados que permitan la rehabilitación de pastos y forrajes en las condiciones citadas.

Palabras clave: *Rhizobium*, salinidad, forraje, caracterización, crecimiento.

Tradicionalmente, las leguminosas herbáceas de los géneros *Desmodium*, *Alysicarpus* y *Crotalaria* se han utilizado en el control de la erosión del suelo, en la restauración de sus propiedades químicas, y como forraje y abono verde (Midega *et al.* 2017 y DemLew *et al.* 2019). Además, incrementan la disponibilidad de macro y micronutrientes para cultivos acompañantes (Chidowe *et al.* 2014 y Trevisan *et al.* 2017). *Desmodium* y *Alysicarpus* tienen amplias perspectivas para el desarrollo de la ganadería, pues poseen elevada palatabilidad, no son tóxicos, tienen alto valor nutritivo y buena digestibilidad de su masa seca (Arango *et al.* 2016). Los biopreparados elaborados basados en *Crotalaria* causan mortalidad a poblaciones de insectos plaga y herbicidas (Atuesta *et al.* 2017 y da Costa *et al.* 2019).

Much of the benefits of these legumes in soils dedicated to cattle rearing are due to the symbiotic association they establish with nitrogen-fixing bacteria, called rhizobia (García *et al.* 2018). However, many of these soils are affected by factors such as water deficit and salinity, which explain the low quality of grasslands and their high degradation level, leading to insufficient livestock productivity (Machado 2009). Previous studies found that water deficits and salinity affect legumes, rhizobia and, more drastically, the symbiosis between both organisms (Yamal *et al.* 2016 and Fushkha *et al.* 2019).

The multiple experiences in the use of legumes to reforest degraded areas, soils lacking organic matter and affected by salinity, serve as an indication of the potential of this group of plants in the sustainability of agricultural and livestock production systems (Castro *et al.* 2017). One way of making this possible is to inoculate forage legumes with previously selected rhizobia strains, which are adapted to soil stress conditions and have the ability to colonize and form effective nodules for biological nitrogen fixation (BNF) (Franzini *et al.* 2019 and Tewari and Sharma 2020).

Recent research has shown that inoculation of legumes with rhizobia under salinity and water deficit conditions produces a decrease of ethylene, increases tolerance of plants to stress and increases nodulation and photosynthesis (Khaitov *et al.* 2020). Therefore, the objective of this research was to select rhizobia isolates with potentialities to improve the establishment of herbaceous legumes in saline soils.

Materials and Methods

The study was carried out with nodules and rhizospheric soil of three herbaceous legumes genera, taxonomically identified as *Desmodium triflorum* (L.) DC., *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC. and *Crotalaria retusa* L., belonging to Fabaceae family (Romero *et al.* 2015 and Almaguer *et al.* 2017). These plants were established in a strongly saline Solonchak soil (Hernández *et al.* 2015), from the Unidad Empresarial de Base (UEB) Ganadera "Rafael Quintana", in Sabanazo popular council, Calixto García municipality, Holguín province. The taxonomic study was developed during drought period, between January and February, 2014. Although permanence time of legumes in this ecosystem is not known, it is suggested that they were subjected to moderate-severe drought, with accumulated mean precipitations of only 200 mm (Romero *et al.* 2015).

Characterization of herbaceous leguminous nodules established in saline soil. Three healthy plants of each species were selected, with no signs of pest attack or presence of diseases, from six sampling points of the UEB Ganadera "Rafael Quintana". Variables related to nodulation were determined: density of total nodulation

Gran parte de las bondades de estas leguminosas en los suelos dedicados a la ganadería se deben a la asociación simbiótica que establecen con bacterias fijadoras de nitrógeno, denominadas rizobios (García *et al.* 2018). Sin embargo, muchos de estos suelos se encuentran afectados por factores como el déficit hídrico y la salinidad, que explican la baja calidad de los pastizales y su alto nivel de degradación, fenómeno que se traduce en insuficiente productividad ganadera (Machado 2009). Estudios previos constataron que el déficit hídrico como la salinidad afectan a la leguminosa, al rizobio y, de manera más drástica, a la simbiosis entre ambos organismos (Yamal *et al.* 2016 y Fushkha *et al.* 2019).

Las múltiples experiencias en el uso de las leguminosas para reforestar áreas degradadas, suelos carentes de materia orgánica y afectados por la salinidad, sirven como indicativo del potencial de este grupo de plantas en la sostenibilidad de los sistemas de producción agrícola y ganadera (Castro *et al.* 2017). Una manera de hacer esto posible es inocular leguminosas forrajeras con cepas de rizobios previamente seleccionadas, que se encuentren adaptadas a las condiciones de estrés del suelo, y que tengan la capacidad de colonizar y formar nódulos efectivos en la fijación biológica del nitrógeno (FBN) (Franzini *et al.* 2019 y Tewari y Sharma 2020).

En investigaciones recientes se ha demostrado que la inoculación de leguminosas con rizobios en condiciones de estrés hídrico y salino produce disminución de la producción de etileno, aumenta la tolerancia de las plantas al estrés e incrementa la nodulación y la fotosíntesis (Khaitov *et al.* 2020). A partir de lo anterior, el objetivo de esta investigación fue seleccionar aislados de rizobios con potencialidades para mejorar el establecimiento de leguminosas herbáceas en suelos salinos.

Materiales y Métodos

El estudio se realizó a partir de nódulos y suelo rizosférico de tres géneros de leguminosas herbáceas, identificadas taxonómicamente: *Desmodium triflorum* (L.) DC., *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC., y *Crotalaria retusa* L., pertenecientes a la familia Fabaceae (Romero *et al.* 2015 y Almaguer *et al.* 2017). Las plantas se encontraban establecidas en un suelo Solonchak, fuertemente salino (Hernández *et al.* 2015), de la Unidad Empresarial de Base (UEB) Ganadera "Rafael Quintana", en el consejo popular Sabanazo, municipio Calixto García, provincia Holguín. El estudio taxonómico se desarrolló en el período de sequía, entre enero y febrero de 2014. Aunque no se conoce el tiempo de permanencia de las leguminosas en este ecosistema, se plantea que estuvieron sometidas a sequía moderada-severa, con acumulados promedio de lluvias, de solo 200 mm (Romero *et al.* 2015).

Caracterización de nódulos de leguminosas herbáceas establecidas en un suelo salino. Se seleccionaron tres plantas sanas de cada una de las especies, sin indicios de ataque de plagas o presencia de enfermedades, provenientes de seis puntos de muestreo de la UEB

and of nodulation in the main root, size and shape of nodules.

Regarding density of total nodulation and in the main root, plants presenting from 0 to 10 nodules were classified as scarce, medium for those from 11 to 50, and abundant for plants with more than 50 nodules. Nodules with a diameter between 1.0 and 1.5 mm were considered small; from 1.5 to 3.0 mm medium, and large those over 3.0 mm of diameter. They were also classified as spherical or polymorphic, according to their external morphology (Bécquer *et al.* 2016). At the time of sampling, they were placed in closed containers that contained calcium chloride (CaCl₂) and were kept at 4 °C until they were transferred to the Microbiology Laboratory of the Department of Physiology and Biochemistry of the National Institute of Agricultural Sciences (INCA, initials in Spanish).

Isolation and characterization of possible rhizobia associated with herbaceous legumes established in saline soil. The possible rhizobia were isolated from the rhizospheric soil and from nodules of the three species of legume. For isolation from rhizospheric soil, serial decimal dilutions were made from 1 g of soil. Dilutions were cultivated by dissemination in Petri dishes, containing mannitol yeast (MY) solid medium (Vincent 1970) and incubated at 30 °C for 10 d.

Isolation from the nodules began with their hydration in distilled water, for 5 min. Then, they were superficially disinfected with 95 % ethanol, for 45 sec. and with 0.1 % (w/v) sodium hypochlorite for 4 min. Then, nodules were washed six times with sterile distilled water under aseptic conditions. They were transferred to hemolysis tubes with sterile forceps, containing 500 µL of saline solution (NaCl 8.5 g L⁻¹). Nodules were macerated and 0.1 mL of the suspension was cultivated by dissemination in plates containing MY solid medium, which were incubated at 30 °C for ten days (Sosa *et al.* 2004).

From the bacterial colonies resulting from both processes, those with similar cultivation characteristics to those described in the literature for rhizobia group were selected (Wang and Martínez-Romero 2001). Successive cultures of isolates were carried out in MY solid medium to guarantee their purity, and they were stored at 4 °C in test tubes containing the same culture medium.

Later, a cultural, morphological and physiological characterization of the previously selected bacterial isolates was carried out, in order to identify them as possible rhizobia. Isolates that did not present similar characteristics to those described above for this group of bacteria (Wang and Martínez-Romero 2001) were discarded from the following determinations.

For cultural characterization, isolates were grown by triplicate, in MY solid medium, and incubated at 30 °C for 10 d. Color, mucus and size of colonies were

Ganadera “Rafael Quintana”. Se determinaron variables relacionadas con la nodulación: densidad de la nodulación total y de la nodulación en la raíz principal, tamaño y forma de los nódulos.

En cuanto a la densidad de la nodulación total y en la raíz principal, se calificó de escasa la de plantas que presentaron de 0 a 10 nódulos; media para las de 11 a 50, y abundante para las plantas de más de 50 nódulos. Los nódulos con diámetro de 1.0 a 1.5 mm se consideraron pequeños; de 1.5 a 3.0 mm medianos, y grandes los de más de 3.0 mm de diámetro. Se catalogaron además, como esféricos o polimórficos, según su morfología externa (Bécquer *et al.* 2016). En el momento del muestreo, se colocaron en recipientes cerrados, que contenían cloruro de calcio (CaCl₂) y se conservaron a 4 °C hasta su traslado al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Fisiología y Bioquímica, del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA).

Aislamiento y caracterización de posibles rizobios asociados a leguminosas herbáceas establecidas en un suelo salino. El aislamiento de los posibles rizobios se realizó a partir del suelo rizosférico y de nódulos de las tres especies de leguminosas. Para el aislamiento a partir del suelo rizosférico, se realizaron diluciones decimales seriadas a partir de 1 g de suelo. Las diluciones se cultivaron por diseminación en placas Petri, que contenían medio sólido levadura manitol (LM) (Vincent 1970) y se incubaron a 30 °C durante 10 d.

El aislamiento a partir de los nódulos comenzó con su hidratación en agua destilada, durante 5 min. Luego, se desinfectaron superficialmente con etanol al 95 %, durante 45 seg. y con hipoclorito de sodio al 0.1 % (p/v) por 4 min. Seguidamente, los nódulos se lavaron seis veces con agua destilada estéril en condiciones de asepsia. Con pinzas estériles se transfirieron a tubos de hemólisis, que contenían 500 µL de solución salina (NaCl 8.5 g L⁻¹). Los nódulos se maceraron y 0.1 mL de la suspensión se cultivó por diseminación en placas que contenían medio LM sólido, las que se incubaron a 30 °C durante diez días (Sosa *et al.* 2004).

De las colonias bacterianas resultantes de ambos procesamientos, se seleccionaron las que presentaron características culturales similares a las descritas en la literatura para el grupo de los rizobios (Wang y Martínez-Romero 2001). Se realizaron cultivos sucesivos de los aislados en medio LM sólido para garantizar su pureza, y se conservaron a 4 °C en tubos de ensayo que contenían el mismo medio de cultivo.

Posteriormente, se realizó la caracterización cultural, morfológica y fisiológica de los aislados bacterianos antes seleccionados, con el propósito de un acercamiento a su identificación como posibles rizobios. Los aislados que no presentaron características similares a las antes descritas para este grupo de bacterias (Wang y Martínez Romero 2001) se descartaron de las determinaciones sucesivas.

Para la caracterización cultural, los aislados se cultivaron por triplicado en el medio LM sólido, y se

considered as cultural aspects. Regarding diameter, those with a diameter greater than 2.0 mm were considered as large colonies, between 1 and 2 mm as medium, and less than 1 mm as small. Gram staining was used for the morphological characterization of isolates, which took into account cell morphology, staining response and endospore presence.

From the physiological point of view, time of colony appearance, acid or base production and capacity to produce nodules in a model legume were determined. For the first case, isolates were cultivated in the MY solid medium and the moment when they became visible was recorded. Bacterial colonies could be observed every 24 h, during 10 d of incubation, at 30 °C. Isolates, which colonies could be seen in the medium after two or three days, were considered as fast growing. Isolates with colonies that appeared after four and five days, were classified as moderate growth, and those that were observed after seven days, were classified as slow growing microorganisms (Wang and Martínez-Romero 2001).

To determine the capacity of bacterial isolates to produce acid or base, they were cultivated by triplicate and by exhaustion in the MY solid medium, which was supplemented with bromothymol blue indicator (0.5 b% in 0.016 N NaOH). Dishes were incubated at 30 °C, for 10 d. The change of coloration of the medium, from green to yellow, was interpreted as the production of organic acids, and the change from green to blue as the production of bases (Sosa *et al.* 2004).

As part of the physiological characterization, the ability of bacterial isolates to form nodules in plants of *Macroptillium atropurpureum* (Moc. and Sessé ex DC.) Urb. (siratro) was also evaluated. Firstly, inocula of isolates were prepared from the inoculation of a loop of these in 100 mL Erlenmeyers, containing 20 mL of MY medium. Flasks were kept shaking, in an orbital shaker at 150 rpm. and 30 °C, between 18 and 20 h for fast growing isolates, and from 56 to 58 h for slow growing isolates. Purity of cultures was determined by Gram staining. Finally, absorbance of the bacterial cultures was adjusted to an OD=0.1 ($\lambda=600$ nm), in a UV-Visible Light Spectrophotometer (GENESYS 6).

At the same time, surface disinfection and pre-germination of siratro seeds were carried out. The seeds were disinfected with 70 % ethanol, for 5 min. Then, they were washed with distilled water and immersed in concentrated sulfuric acid for 10 min. Then, seeds were kept in a 25 % (v/v) sodium hypochlorite solution for 15 min. and washed ten times with sterile distilled water. Finally, they were placed on dishes with water-agar (0.75 % v/v) and incubated at 30 °C in a dark place for 24 h, to favor their germination (Pérez *et al.* 2008).

Pregerminated seeds with approximately 1 cm of emerging root were placed in 70 mL volume bottles,

incubaron a 30 °C durante 10 d. Como aspectos culturales se tuvieron en cuenta el color, la mucosidad y el tamaño de las colonias. Con respecto al diámetro, se consideraron colonias grandes las de diámetro mayor de 2.0 mm; medianas las que tuvieron entre 1-2 mm, y pequeñas las de menos de 1 mm de diámetro. Se utilizó la tinción de Gram para la caracterización morfológica de los aislados, en la que se tuvo en cuenta la morfología de la célula, respuesta a la tinción y presencia de endoesporas.

Desde el punto de vista fisiológico, se determinó el tiempo de aparición de la colonia, producción de ácido o base y capacidad para producir nódulos en una leguminosa modelo. Para el primer caso, los aislados se sembraron en el medio LM sólido y se registró el momento en que se hicieron visibles a simple vista. Las colonias bacterianas se pudieron observar cada 24 h, durante 10 d de incubación, a 30 °C. Los aislados, cuyas colonias se pudieron ver en el medio a los dos o tres días, se consideraron de crecimiento rápido. Los aislados con colonias, que aparecieron de cuatro a cinco días, se catalogaron de crecimiento moderado, y aquellas que se observaron a partir de los siete, se clasificaron como microorganismos de crecimiento lento (Wang y Martínez-Romero 2001).

Para determinar la capacidad de los aislados bacterianos para producir ácido o base, se cultivaron por triplicado y por agotamiento en el medio LM sólido, que se suplementó con el indicador azul de bromotimol (0.5 % en NaOH 0.016 N). Las placas se incubaron a 30 °C, durante 10 d. El cambio de coloración del medio, de verde a amarillo, se interpretó como la producción de ácidos orgánicos, y el cambio de verde a azul como la producción de bases (Sosa *et al.* 2004).

Como parte de la caracterización fisiológica, también se evaluó la capacidad de los aislados bacterianos para formar nódulos en plantas de *Macroptillium atropurpureum* (Moc. y Sessé ex DC.) Urb. (siratro). Primeramente, se prepararon los inóculos de los aislados a partir de la inoculación de una asada de estos en Erlenmeyers de 100 mL, que contenían 20 mL de medio LM. Los frascos se mantuvieron en agitación, en zaranda orbital a 150 r.p.m. y 30 °C, de 18-20 h para los aislados de crecimiento rápido, y de 56-58 h para los de crecimiento lento. La pureza de los cultivos se determinó mediante la tinción de Gram. Por último, se ajustó la absorbancia de los cultivos bacterianos a una DO = 0.1 ($\lambda=600$ nm), en un espectrofotómetro luz visible/luz ultravioleta (GENESYS 6).

Paralelamente, se realizó la desinfección superficial y la pregerminación de las semillas de siratro. Las semillas se desinfectaron con etanol a 70 %, durante 5 min. Luego, se lavaron con agua destilada y se sumergieron en ácido sulfúrico concentrado por 10 min. Después, las semillas se mantuvieron en una solución de hipoclorito de sodio al 25 % (v/v), durante 15 min. y se lavaron diez veces con agua destilada estéril. Por último, se colocaron en placas con agar-agua (0.75 % v/v) y se incubaron a 30 °C en la oscuridad, durante 24 h, para favorecer su germinación (Pérez *et al.* 2008).

containing 50 mL of Norris and Date semi-solid medium (Norris and Date 1967), at a rate of one seed per bottle, and inoculated with 1 mL of bacterial inocula. Seedlings inoculated with 1 mL of sterile MY medium were considered as a negative control of the experiment. Plants were kept under controlled growth conditions, with a photoperiod of 16 h light/8 h dark, at a day/night temperature of 26 °C/22 °C and relative humidity of 70 %. Four weeks after inoculation, the number of nodules in the main root (NNRP), number of total nodules (NNT), effectiveness of nodules and dry mass of total nodules (MSNT) were determined. In addition, aerial dry mass (MSA) (g) and radical dry mass (MSR) (g) of siratro plants were determined.

Statistical design and analysis. Inoculation test of bacterial isolates in siratro plants was carried out using a completely randomized design. Seven replicates per treatment were used. Resulting data was subjected to normality test (Babtlest test, Babtlest 1937) and homogeneity of variance (Kormogorov-Smirnov test. Kolmogorov 1933). One way classification analysis of variance was applied by Tukey test, for $P < 0.05$, in order to determine differences between means (Sigarroa 1985). Statgraphic plus, version 5.0 was used for statistical data processing. These were plotted in Sigmaplot for Windows, version 11.0.

Results

The three herbaceous legumes, established in a strongly saline soils and under water deficit conditions, have scarce nodulation. Results showed that all plants had scarce total nodulation. This performance was also seen in the main root. Even at collection point number 5 (p5), *A. vaginalis* (L.) DC. plants lacked nodules. *D. triflorum* (L.) DC. and *A. vaginalis* (L.) DC. presented small and spherical nodules. However, medium and polymorphic nodules appeared in the roots of *C. retusa* L. (table 1).

Las semillas pregerminadas con aproximadamente 1 cm de raíz emergente se colocaron en frascos de 70 mL de volumen, que contenían 50 mL de medio semisólido Norris y Date (Norris y Date 1967), a razón de una semilla por frasco, y se inocularon con 1 mL de los inóculos bacterianos. Las plántulas que se inocularon con 1 mL de medio LM estéril, se consideraron como control negativo del experimento. Las plantas se mantuvieron en condiciones controladas de crecimiento, con fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad, a temperatura día/noche de 26 °C/22 °C y humedad relativa de 70 %. Cuatro semanas después de la inoculación, se determinó el número de nódulos en la raíz principal (NNRP), número de nódulos totales (NNT), efectividad de los nódulos y masa seca de los nódulos totales (MSNT). Se determinó, además, la masa seca aérea (MSA) (g) y la masa seca radical (MSR) (g) de las plantas de siratro.

Diseño y análisis estadístico. El ensayo de inoculación de los aislados bacterianos en plantas de siratro se realizó mediante un diseño completamente aleatorizado. Se utilizaron siete réplicas por tratamiento. Los datos resultantes se sometieron a la prueba de normalidad (prueba de Babtlest, Babtlest 1937) y a homogeneidad de varianza (prueba de Kormogorov-Smirnov, Kolmogorov 1933). Se aplicó análisis de varianza de clasificación simple mediante la comparación de medias de Tukey, para $P < 0.05$, con el objetivo de determinar diferencias entre medias (Sigarroa 1985). Se utilizó el programa Statgraphic plus, versión 5.0 para el procesamiento estadístico de los datos. Estos se graficaron en el programa Sigmaplot para Windows, versión 11.0.

Resultados

Las tres leguminosas herbáceas, establecidas en suelos fuertemente salinos y en condiciones de déficit hídrico, tienen nodulación escasa. Los resultados mostraron que todas las plantas tuvieron una nodulación total escasa, comportamiento que también se visualizó en

Table 1. Nodulation pattern of herbaceous legumes *Desmodium triflorum* (L.) DC., *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC. and *Crotalaria retusa* L. established under water deficit conditions in a strongly saline soil

Sampling points	Herbaceous legumes	Nodulation			
		Total	Main root	Nodule size	Nodule shape
P1	<i>Desmodium triflorum</i> (L.) DC.	Scarce	Scarce	Small	Spherical
P2	<i>Desmodium triflorum</i> (L.) DC.				
P3	<i>Alysicarpus vaginalis</i> (L.) DC.		Scarce	Small	Spherical
P4	<i>Alysicarpus vaginalis</i> (L.) DC.		Scarce	Small	Spherical
P5	<i>Alysicarpus vaginalis</i> (L.) DC.		Without nodules	Small	Spherical
P6	<i>Crotalaria retusa</i> L.		Scarce	Medium	Polymorphic

Populations of possible rhizobia inhabit the rhizosphere and interior of nodules of the three herbaceous legumes.

A total of 15 possible rhizobia isolates were obtained from the rhizosphere and from the nodules of the three

la raíz principal. Incluso, en el punto de colecta número 5 (p5), las plantas de *A. vaginalis* (L.) DC. carecieron de nódulos. *D. triflorum* (L.) DC. y *A. vaginalis* (L.) DC. presentaron nódulos pequeños y esféricos. Sin embargo, en las raíces de *C. retusa* L. se visualizaron medianos y

studied herbaceous legumes. Out of these, 20% came from *D. triflorum* (L.) DC., 53.3 % from *A. vaginalis* (L.) DC. and 26.7 % from *C. retusa* L. Most of isolates from *Alysicarpus* were obtained from their nodules, while it was 100 % in *C. retusa* L. (table 2).

Most of the isolates were characterized by forming

polimórficos (tabla 1).

En la rizosfera e interior de los nódulos de las tres leguminosas herbáceas habitan poblaciones de posibles rizobios.

Un total de 15 aislados posibles rizobios se obtuvieron de la rizosfera y de los nódulos de las tres leguminosas

Tabla 2. Caracterización y posible identificación de aislados bacterianos, provenientes de la rizosfera y nódulos de las leguminosas herbáceas *Desmodium triflorum* (L.) DC., *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC. y *Crotalaria retusa* L., establecidas en suelos salinos

Isolation place	Isolates	Characterization			Possible identification	
		Cultural	Morphological	Physiological Type of growth Acid or base		
<i>Desmodium triflorum</i> (L.) DC.						
Nodules	Riz 1-1	Semi-translucent, mucus, large	Bacilli, G -, not sporulated	Fast	Acid	<i>Rhizobaceae</i>
Rhizospheric soil	Riz 1-2	Semi-translucent, mucus, large	Bacilli, G -, not sporulated	Fast	Acid	<i>Rhizobaceae</i>
	Riz 2-1	Semi-translucent, mucus, large	Cocobacilli, G -, sporulated	-	-	-
<i>Alysicarpus vaginalis</i> (L.) DC.						
Nodules	Riz 5	Semi-translucent, mucus, large	Bacilli, G -, not sporulated	Fast	Acid	<i>Rhizobaceae</i>
	Riz 5-1	Pale pink, dry, small	Bacilli, G -, not sporulated	Slow	Basic	<i>Bradyrhizobium</i>
	Riz 5-2	Semi-translucent, mucus, large	Bacilli, G -, not sporulated	Fast	Acid	<i>Rhizobaceae</i>
	Riz 6	Semi-translucent, mucus, large	Bacilli, G -, not sporulated	Fast	Acid	<i>Rhizobaceae</i>
	Riz 6-1	Semi-translucent, mucus, large	Bacilli, G -, not sporulated	Fast	Acid	<i>Rhizobaceae</i>
	Riz 7-1	Semi-translucent, mucus, large	Bacilli, G -, not sporulated	Fast	Acid	<i>Rhizobaceae</i>
	Riz 7-2	Semi-translucent, mucus, large	Bacilli, G -, not sporulated	Fast	Acid	<i>Rhizobaceae</i>
Rhizospheric soil	Riz 5-0	Beige, dry, large	-	-	-	-
<i>Crotalaria retusa</i> L.						
Nodules	Riz 8-11	Pale pink, dry, small	Bacilli, G -, not sporulated	Slow	Basic	<i>Bradyrhizobium</i>
	Riz 8-12	Pale pink, dry, small	Bacilli, G -, not sporulated	Slow	Basic	<i>Bradyrhizobium</i>
	Riz 8-13	Beige, dry, large	-	-	-	-
	Riz 8-14	Beige, dry, large	-	-	-	-

G:Gram positive

large, mucus, semi-translucent colonies in the MY solid culture medium. However, isolates Riz 5-1, Riz 8-11, and Riz 8-12 formed small, dry, pale pink colonies. Isolates Riz 8-13 and Riz 8-14 presented a third pattern from a cultural point of view, as they formed large, dry, and beige colonies.

Gram staining showed that the majority of the isolates were Gram negative bacilli, not sporulated. Only Riz 2-1 isolate was observed as sporulated Gram negative

herbáceas estudiadas. De ellos, 20 % provino de *D. triflorum* (L.) DC., 53.3 % de *A. vaginalis* (L.) DC. y 26.7 % de *C. retusa* L. La mayoría de los aislados procedentes de *Alysicarpus* se obtuvieron de sus nódulos, mientras que en *C. retusa* L. fue 100 % (tabla 2).

La mayoría de los aislados se caracterizaron por formar colonias semitraslúcidas, mucosas y grandes en el medio de cultivo LM sólido. Sin embargo, los aislados Riz 5-1, Riz 8-11 y Riz 8-12 formaron colonias rosado

cocobacilli. Results also showed two patterns regarding the time of appearance of colonies in the MY solid medium and acid and base production. Eight isolates showed fast growth and produced acid, while another group grew slowly and produced base.

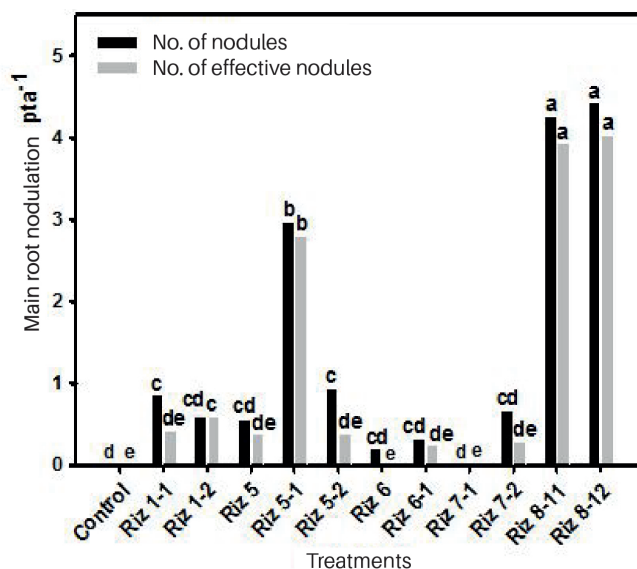
Taking into account the results of the cultural, morphological and physiological characterization of the bacterial isolates, only those with similar characteristics to those described for rhizobia group were selected, with which inoculation tests with siratro plants would be carried out. Results showed that, except Riz 7-1, all isolates produced nodules in the main root of the plants. In addition, effective nodules were visualized in the BNF in all the plants, except for those inoculated with Riz 7-1 and Riz 6 isolates (figure 1).

Plants inoculated with Riz 5-1, Riz 8-11 and Riz

pálido, secas y pequeñas. Los aislados Riz 8-13 y Riz 8-14 presentaron un tercer patrón desde el punto de vista cultural, pues formaron colonias beige, secas y grandes.

La tinción de Gram mostró que la mayoría de los aislados fueron bacilos Gram negativos, no esporulados. Solo el aislado Riz 2-1 se observó como cocobacilos Gram negativos esporulados. Los resultados mostraron además, dos patrones en cuanto al tiempo de aparición de las colonias en el medio LM sólido y la producción de ácido y base. Ocho aislados presentaron crecimiento rápido y produjeron ácido, mientras que otro grupo creció lento y produjo base.

Al tener en cuenta los resultados de la caracterización cultural, morfológica y fisiológica de los aislados bacterianos, se seleccionaron solo aquellos que presentaran características similares a las descritas para el grupo de los rizobios, con los cuales se realizarían



Mean with equal letters have no statistical difference
 sex (number of nodules in the main root) = 0.29*;
 sex (number of effective nodules in the main root) = 0.21*
 (Tukey P = 0.012, N=7)

Figure 1. Number and effectiveness of nodules in the main root of siratro plants, inoculated with bacterial isolates from a rhizospheric soil and from nodules of the herbaceous legumes *Desmodium triflorum* (L.) DC., *Alysicarpus vaginalis* (L.) D.C. and *Crotalaria retusa* L., at 30 d of cultivation under controlled conditions

8-12 isolates presented the highest values of number of nodules in the main root and number of effective nodules in the BNF. In these variables, no significant differences were observed between plants treated with Riz 8-11 isolate and those that used Riz 8-12.

When analyzing total nodulation of siratro plants, results showed a similar performance to that found for the nodulation in the main root. Plants inoculated with Riz 5-1, Riz 8-11, and Riz 8-12 isolates produced the highest number of total and total effective nodules. No significant differences in these variables were observed among the plants treated with Riz 8-11 and Riz 8-12 isolates. There were differences between the

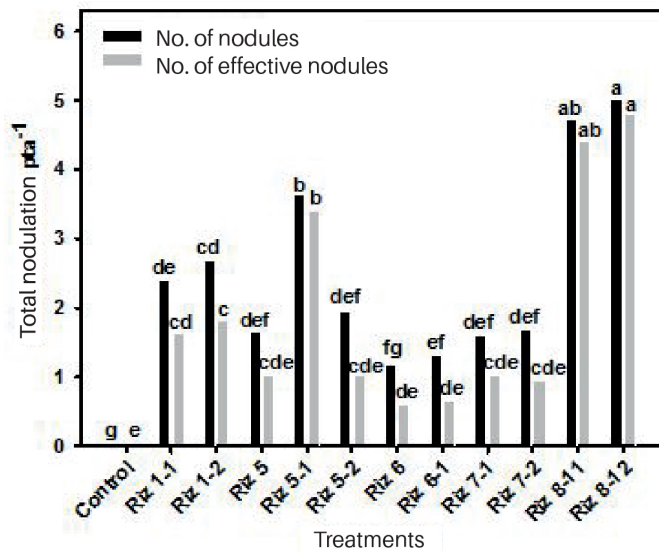
ensayos de inoculación con plantas de siratro. Los resultados mostraron que, excepto Riz 7-1, todos los aislados produjeron nódulos en la raíz principal de las plantas. Además, se visualizaron nódulos efectivos en la FBN en todas las plantas, excepto en aquellas que se inocularon con los aislados Riz 7-1 y Riz 6 (figura 1).

Las plantas que se inocularon con los aislados Riz 5-1, Riz 8-11 y Riz 8-12 presentaron los valores más elevados de número de nódulos en la raíz principal y número de nódulos efectivos en la FBN. En estas variables, no se observaron diferencias significativas entre las plantas tratadas con el aislado Riz 8-11, y las que utilizaron Riz 8-12.

latter and those where Riz 5-1 isolate was inoculated (figure 2).

Regarding dry mass of nodules, results demonstrated

Al analizar la nodulación total de las plantas de siratro, los resultados mostraron un comportamiento similar al que se constató en la nodulación en la raíz



Mean with equal letters have no statistical difference
 sex (number of total nodules) = 0.43*;
 sex (number of effective total nodules) = 0.38*
 (Tukey P=0.015, n=7)

Figure 2. Number and effectiveness of total nodules in siratro plants, inoculated with bacterial isolates from a rhizospheric soil and from nodules of the herbaceous legumes *Desmodium triflorum* (L.) DC., *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC. and *Crotalaria retusa* L, at 30 d of cultivation under controlled conditions

that the use of Riz 5-1, Riz 8-11 and Riz 8-12 isolates produced the highest dry mass values of nodules in the main root and total nodulation (table 3).

Something similar was found with the aerial and

principal. Las plantas que se inocularon con los aislados Riz 5-1, Riz 8-11 y Riz 8-12 produjeron el mayor número de nódulos totales y efectivos totales. No se observaron diferencias significativas en estas variables entre las

Tabla 3. Dry mass of nodules in the main root and total nodules, and dry mass of the aerial part and of roots of siratro plants, inoculated with possible isolates of rhizobia from rhizosphere and nodules from the herbaceous legumes *Desmodium triflorum* (L.) DC., *Alysicarpus vaginalis* (L.) DC. and *Crotalaria retusa* L. at 30 d of cultivation under controlled conditions

Treatments	DMNMR (g)	DMTN (g)	ADM (g)	RDM (g)
Control	0.0000 ^e	0.0005 ^f	0.022 ^{de}	0.020 ^{cd}
Riz 1-1	0.0013 ^d	0.0024 ^{de}	0.028 ^d	0.024 ^c
Riz 1-2	0.0006 ^{de}	0.0028 ^d	0.021 ^{de}	0.020 ^{cd}
Riz 5	0.0009 ^{de}	0.0020 ^{def}	0.020 ^{de}	0.016 ^d
Riz 5-1	0.0196 ^c	0.0196 ^c	0.156 ^c	0.039 ^b
Riz 5-2	0.0007 ^{de}	0.0014 ^{def}	0.017 ^e	0.017 ^d
Riz 6	0.0002 ^{de}	0.0010 ^{ef}	0.021 ^{de}	0.019 ^{cd}
Riz 6-1	0.0003 ^{de}	0.0010 ^{ef}	0.014 ^e	0.016 ^d
Riz 7-1	0.0000 ^e	0.0006 ^f	0.020 ^{de}	0.020 ^{cd}
Riz 7-2	0.0009 ^{de}	0.0016 ^{def}	0.015 ^e	0.017 ^d
Riz 8-11	0.0238 ^a	0.0248 ^a	0.212 ^a	0.054 ^a
Riz 8-12	0.0214 ^b	0.0229 ^b	0.184 ^b	0.038 ^b
sex	0.0004 [*]	0.0006 [*]	0.003 [*]	0.002 [*]

^{abcddef}Mean with equal letters have no statistical difference (Tukey P = 0.034, n = 7)

DMNMR: dry mass of nodules in the main root. DMTN: dry mass of total nodules. ADM: aerial dry mass. RDM: root dry mass

radical dry mass of plants, since those that were inoculated with these three isolates significantly increased both variables. Those inoculated with Riz 8-11 isolate were highlighted, with the highest values of ADM and RDM.

Discussion

In this investigation, a study of nodulation pattern and rhizobia populations associated with three herbaceous legumes established in a very strongly saline Solonchak soil was carried out. The use of rhizobia-based inoculants could form part of the integrated management of these ecosystems to increase the establishment of legumes, even under salinity limiting conditions, and thereby increase availability of pasture for cattle rearing.

At the time of sampling, the studied plants were established under conditions of water deficit and soil salinity, factors that can limit growth and development of legumes and the microorganisms associated with it. It is known that water deficit limits the mobility, viability and concentration of rhizobia in the rhizosphere of legumes (Hussain *et al.* 2014 and Gopalakrishnan *et al.* 2015). Previous studies show a decrease of nodulation in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.), grown under water deficit conditions (Estrada *et al.* 2017). This condition causes hormonal (abscisic acid) and enzymatic changes (sucrose synthase) in the legume, which brings about photosynthetic effects and ensures the survival of bacteroids inside the nodule. As a result, rhizobia multiplication rate decreases and, therefore, inhibition of nodule growth occurs (Liu *et al.* 2005, Ladrera *et al.* 2007 and Azcón-Bieto and Tolón, 2010).

Salinity also causes negative effects on legume growth and on rhizobia multiplication. Previous research showed a decrease of number and size of nodules in cowpea plants (*Vigna unguiculata*), with the increase of salinity in the substrate (Al-Saedi *et al.* 2016). This factor decreases the colonization of rhizosphere by rhizobia, since it inhibits the synthesis of glucans, lipopolysaccharides (LPS) and exopolysaccharides, which are superficial molecules of the bacterium that are essential for its interaction with the plant (Tewari and Sharma 2020). These events cause a decrease of number and mass of nodules, of leghemoglobin synthesis and of nitrogenase activity (Ballhorn *et al.* 2018 and Sunita *et al.* 2019).

This research also found differences in the shape and size of nodules found in *C. retusa* (L.) with respect to *D. triflorum* (L.) DC. and *A. vaginalis* (L.) DC. *Crotalaria* produces indeterminate and polymorphic nodules that present a permanent meristem, tissue that allows constant growth of the organ (Renier *et al.* 2011). This capacity, maintained even under limiting conditions of drought and salinity, suggests greater osmotolerance of indeterminate nodules with respect to the determined

plantas que se trataron con los aislados Riz 8-11 y Riz 8-12. Sí las hubo entre estas últimas y aquellas donde se inoculó el aislado Riz 5-1 (figura 2).

En cuanto a la masa seca de los nódulos, los resultados mostraron que nuevamente la utilización de los aislados Riz 5-1, Riz 8-11 y Riz 8-12 produjo los mayores valores de masa seca de nódulos en la raíz principal y nodulación total (tabla 3).

Algo similar se constató con la masa seca aérea y radical de las plantas, pues las que se inocularon con estos tres aislados incrementaron significativamente ambas variables. Se destacaron las que se inocularon con el aislado Riz 8-11, con los mayores valores de MSA y MSR.

Discusión

En esta investigación se realizó un estudio del patrón de nodulación y de poblaciones de rizobios asociadas a tres leguminosas herbáceas establecidas en un suelo Solonchak muy fuertemente salino. La utilización de inoculantes basados en rizobios pudieran formar parte del manejo integrado de estos ecosistemas para incrementar el establecimiento de las leguminosas, incluso en condiciones limitantes de salinidad, y con ello aumentar la disponibilidad de pasto para el ganado.

En el momento del muestreo, las plantas estudiadas se encontraban establecidas en condiciones de déficit hídrico y salinidad del suelo, factores que pueden limitar el crecimiento y desarrollo de las leguminosas y de los microorganismos asociados a ella. Se conoce que el déficit hídrico limita la movilidad, viabilidad y concentración de los rizobios en la rizosfera de las leguminosas (Hussain *et al.* 2014 y Gopalakrishnan *et al.* 2015). Estudios previos comprueban disminución de la nodulación en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en déficit hídrico (Estrada *et al.* 2017). Esta condición provoca cambios hormonales (ácido abscísico) y enzimáticos (sacarosa sintasa) en la leguminosa, lo que trae consigo afectaciones en la fotosíntesis, proceso que asegura la sobrevivencia del bacteroide dentro del nódulo. Como resultado, disminuye la tasa de multiplicación de los rizobios y, por ende, se produce la inhibición del crecimiento del nódulo (Liu *et al.* 2005, Ladrera *et al.* 2007 y Azcón-Bieto y Tolón 2010).

La salinidad también provoca efectos negativos en el crecimiento de las leguminosas y en la multiplicación de los rizobios. Investigaciones previas demostraron disminución del número y tamaño de los nódulos en plantas de caupí (*Vigna unguiculata*), con el incremento de la salinidad en el sustrato (Al-Saedi *et al.* 2016). Este factor disminuye la colonización de la rizosfera por los rizobios, pues inhibe la síntesis de glucanos, lipopolisacáridos (LPS) y exopolisacáridos, moléculas superficiales de la bacteria que son esenciales para su interacción con la planta (Tewari y Sharma 2020). Estos eventos producen disminución del número y masa de los nódulos, de la síntesis de la leghemoglobina y de la actividad de la nitrogenasa (Ballhorn *et al.* 2018 y Sunita *et al.* 2019).

En esta investigación se constataron, además, diferencias

ones (Fernández Pascual *et al.* 2007, Selami *et al.* 2014 and Huang *et al.* 2018). These morphological and physiological characteristics could explain the large size of *Crotalaria* nodules, even under water deficit and soil salinity conditions.

Despite the negative effects of water deficit and salinity for legumes and rhizobia, situations such as these favor the natural selection of bacterial strains that establish symbiosis with legumes with which they were not compatible (Andrews and Andrews 2017). Isolating rhizobia strains adapted to stressful conditions and increasing their concentration in these soils from their inoculation, could have a positive ecological effect on ecosystems.

Considering the above, isolation of possible rhizobia was carried out from nodules and from the rhizospheric soil of three herbaceous legume genera. For this purpose, conventional taxonomy methods were applied, including the study of phenotypic characters that allow an approach to bacterial strain identification.

Nodules are structures that are formed in the symbiosis between rhizobia and legumes. Together with the rhizosphere of these plants, they constitute the most frequent habitats for rhizobia. In fact, the way to authenticate whether a bacterium belongs to rhizobia group is to confirm its ability to form nodules in legumes under aseptic conditions (Howieson and Dilworth 2016). This is explained because, in recent years, it has been demonstrated that populations of bacteria that do not have the ability to form these structures coexist, together with rhizobia, in the nodules of many legumes (Peix *et al.* 2015 and Velázquez *et al.* 2017).

As a primary criterion, cultural characteristics described for rhizobia were used, when they grow in the MY solid culture medium. According to Wang and Martínez-Romero (2001), rhizobia form two fundamental phenotypes of colonies in this medium: semi-translucent, large and mucous colonies, and semi-translucent, small and dry colonies. According to the above, Riz 8-13 and Riz 8-14 isolates were ruled out as possible rhizobia, as they formed large, dry, beige colonies (table 2) and were eliminated from subsequent determinations.

Gram staining was used as a second criterion. According to Madigan *et al.* (2019), rhizobia are Gram negative bacilli or cocobacilli, and not sporulated. Therefore, the observation of endospores in the cells of Riz 2-1 isolate (table 2) allowed to remove them as possible rhizobia, and it was not considered in the rest of the characterization either.

Determination of physiological aspects of rhizobia, such as the time of appearance of the colonies on the MY solid medium and acid or base production, also contribute to the grouping of these bacteria in different genera (Wang and Martínez-Romero 2001). In this research, two cultivation and physiological patterns

en la forma y tamaño de los nódulos que se encontraron en *C. retusa* (L) con respecto a *D. triflorum* (L.) DC. y *A. vaginalis* (L.) DC. *Crotalaria* produce nódulos indeterminados y polimórficos que presentan un meristemo permanente, tejido que permite el crecimiento constante del órgano (Renier *et al.* 2011). Esta capacidad, mantenida incluso en condiciones limitantes de sequía y salinidad, sugiere mayor osmotolerancia de los nódulos indeterminados con respecto a los determinados (Fernández Pascual *et al.* 2007, Selami *et al.* 2014 y Huang *et al.* 2018). Estas características morfológicas y fisiológicas pudieran explicar el mayor tamaño de los nódulos de *Crotalaria*, incluso en condiciones de déficit hídrico y salinidad en el suelo.

A pesar de los efectos negativos del déficit hídrico y la salinidad para la leguminosa y los rizobios, situaciones como estas favorecen la selección natural de cepas bacterianas que establecen simbiosis con leguminosas con las que no eran compatibles (Andrews y Andrews 2017). Aislar cepas de rizobios adaptadas a condiciones estresantes e incrementar su concentración en estos suelos a partir de su inoculación, pudiera tener efecto ecológico positivo en los ecosistemas.

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó el aislamiento de posibles rizobios a partir de nódulos y del suelo rizosférico de tres géneros de leguminosas herbáceas. Para ello, se aplicaron métodos de taxonomía convencional, que incluyen el estudio de caracteres fenotípicos que permiten un acercamiento a la identificación de cepas bacterianas.

Los nódulos son estructuras que se forman en la simbiosis entre los rizobios y las leguminosas. Constituyen, unido a la rizosfera de estas plantas, los hábitats más frecuentes donde se encuentran los rizobios. De hecho, la manera de autenticar si una bacteria pertenece al grupo de los rizobios es comprobar su capacidad de formar nódulos en leguminosas en condiciones de asepsia (Howieson y Dilworth 2016). Esto se explica porque en los últimos años se ha demostrado que en los nódulos de muchas leguminosas conviven, junto a los rizobios, poblaciones de bacterias que no tienen la capacidad de formar estas estructuras (Peix *et al.* 2015 y Velázquez *et al.* 2017).

Como criterio primario, se partió de las características culturales descritas para los rizobios, cuando crecen en el medio de cultivo LM sólido. Según Wang y Martínez-Romero (2001), los rizobios forman dos fenotipos fundamentales de colonias en este medio: colonias semitranslúcidas, grandes y mucosas, y colonias semitranslúcidas, pequeñas y secas. Según lo anterior, los aislados Riz 8-13 y Riz 8-14 se descartaron como posibles rizobios, pues formaron colonias beige, grandes y secas (tabla 2) y se eliminaron de las determinaciones posteriores.

Como segundo criterio, se usó la tinción de Gram. Según Madigan *et al.* (2019), los rizobios son bacilos o cocobacilos Gram negativos, y no esporulados. Por lo tanto, la observación de endosporas en las células del aislado Riz 2-1 (tabla 2) permitió descartarlo como posible rizobio, y tampoco se consideró en el resto de la caracterización.

are distinguished: the first and most numerous are the fast-growing, acid-producing isolates that form large, mucous and semi-translucent colonies (table 1). This pattern agrees with rhizobia strains that have previously been located in Rhizobiaceae family, which groups Ensifer, Rhizobium and Shinella genera (Sahgal and Jaggi 2018).

Riz 5-1, Riz 8-11 and Riz 8-12 isolates presented characteristics that agree with those of the second cultural and physiological pattern. This pattern consists of slow-growing, base-producing isolates that form small, dry and semi-translucent colonies in the MY solid medium. Strains with these characteristics have been grouped into Bradyrhizobium genus (Sahgal and Jaggi 2018).

Regarding the results of cultural, morphological and physiological characterization, 80 % of total isolates were selected as possible rhizobia. All isolates from *D. triflorum* (L.) DC. were identified as part of Rhizobiaceae family. Previous research has shown the presence of Rhizobium genus, which belongs to this family, in *Desmodium oldhami* and *Desmodium sequax* species (Xu *et al.* 2016). In the case of the legume *C. retusa* L., all bacterial isolates were classified in the Bradyrhizobium genus. During the symbiosis, prevalence of some genera with respect to others is explained, among other aspects, by the specificity of molecular signals between legume and rhizobia (Liu and Murray 2016, Andrews and Andrews 2017 and Salas *et al.* 2017). Some chemical groups in the structure of the so-called nodulation factors, better known determinants that govern the rhizobium-legume interaction, have a very important role in this specificity (Wang and Zhu 2018).

Unlike *D. triflorum* (L.) DC. and *C. retusa* L., rhizobia of Rhizobiaceae family and Bradyrhizobium genus coexist in nodules and rhizosphere of the legume *A. vaginalis* (L.) DC. Establishing symbiosis with a wide range of rhizobia genera does not necessarily imply that an efficient BNF is performed with all microsymbionts (Terpolilli *et al.* 2008 and Chibeba *et al.* 2017). Taking into account the above, it is necessary to select and inoculate efficient strains in colonization, establishment and FBN, in order to obtain an increase of growth and yield of legumes. Native strains and the necessary concentration of them for provoking the desired effects on plants are not always found in the soil (Lodeiro 2015). In this study, inoculation tests were carried out on the twelve possible isolates of rhizobia in siratro plants, in order to determine their ability to produce effective nodules in the BNF and promote growth of this plant.

Siratro is used as a model legume to evaluate nodulation, due to its ability to establish symbiosis with a wide range of genera from rhizobia group (Lima *et al.* 2009). The ability to form nodules in legumes is one of the most widely considered criteria for classifying

La determinación de aspectos fisiológicos en los rizobios, como el tiempo de aparición de las colonias sobre el medio LM sólido y la producción de ácido o base, contribuyen también a la agrupación de estas bacterias en diferentes géneros (Wang y Martínez-Romero 2001). En esta investigación, se distinguen dos patrones culturales y fisiológicos: al primero y más numeroso pertenecen los aislados de crecimiento rápido, productores de ácido, que forman colonias semitraslúcidas, grandes y mucosas (tabla 1). Este patrón concuerda con cepas de rizobios que previamente se han ubicado en la familia Rhizobiaceae, que agrupa los géneros Ensifer, Rhizobium y Shinella (Sahgal y Jaggi 2018).

Los aislados Riz 5-1, Riz 8-11 y Riz 8-12 presentaron características que concuerdan con las del segundo patrón cultural y fisiológico. Este patrón consiste en aislados de crecimiento lento, productores de base, que forman colonias semitraslúcidas, pequeñas y secas en el medio LM sólido. Cepas con estas características se han agrupado en el género Bradyrhizobium (Sahgal y Jaggi 2018).

Teniendo en cuenta los resultados de la caracterización cultural, morfológica y fisiológica, 80 % del total de aislados se seleccionaron como posibles rizobios. Todos los aislados provenientes de *D. triflorum* (L.) DC. se identificaron como de la familia Rhizobiaceae. En investigaciones anteriores se demostró la presencia del género Rhizobium, que pertenece a esta familia, en las especies *Desmodium oldhami* y *Desmodium sequax* (Xu *et al.* 2016). En el caso de la leguminosa *C. retusa* L., todos los aislados bacterianos se clasificaron en el género Bradyrhizobium. Durante la simbiosis, la prevalencia de unos géneros con respecto a otros, se explica, entre otros aspectos, a partir de la especificidad de las señales moleculares entre la leguminosa y los rizobios (Liu y Murray 2016, Andrews y Andrews 2017 y Salas *et al.* 2017). Algunos grupos químicos en la estructura de los denominados factores de nodulación, determinantes más conocidos que rigen la interacción rizobio-leguminosa, tienen una función muy importante en dicha especificidad (Wang y Zhu 2018).

A diferencia de *D. triflorum* (L.) DC. y *C. retusa* L., en los nódulos y la rizosfera de la leguminosa *A. vaginalis* (L.) DC., coexisten rizobios de la familia Rhizobiaceae y del género Bradyrhizobium. El establecimiento de la simbiosis con un amplio rango de géneros de rizobios no implica necesariamente que se realice una FBN eficiente con todos los microsymbiontes (Terpolilli *et al.* 2008 y Chibeba *et al.* 2017). Teniendo en cuenta lo anterior, se hace necesario seleccionar e inocular cepas eficientes en la colonización, establecimiento y FBN, para obtener incremento en el crecimiento y rendimiento de las leguminosas. En el suelo no siempre se encuentran las cepas nativas ni la concentración necesaria de estas para provocar los efectos deseados en las plantas (Lodeiro 2015). En esta investigación se realizaron ensayos de inoculación de los doce posibles aislados de rizobios en plantas de siratro, con el propósito de determinar su capacidad de producir nódulos efectivos en la FBN y promover el crecimiento de esta planta.

bacteria as rhizobia (Howieson and Dilworth 2016). Therefore, the presence of nodules in siratro roots, inoculated with the twelve isolates (figures 1 and 2), constitutes an important evidence to consider these microorganisms as rhizobia.

Riz 5-1, Riz 8-11 and Riz 8-12 isolates stood out in all the evaluated variables, both in nodulation and in growth promotion of siratro plants. The ability of strains to nodulate the main root is one of the most important criteria in strain selection studies, since nodules located in this position show greater activity in the BNF (Samrudhi *et al.* 2013). The main amount of nutrients resulting from photosynthesis flows through the main root, which are used by bacteroids to obtain energy to fix nitrogen (Azcón-Bieto and Tolón 2010).

Nodule size is directly related to their mass. The presence of high concentrations of bacteroides induces the multiplication of cells from root cortex, which implies an increase of nodular size (Patriarca *et al.* 2004). This would explain the significant differences found in the dry mass of nodules of plants inoculated with Riz 8-11 and Riz 8-12 isolates (table 3), independently from similarities in the number of nodules in the main root and total (figures 1 and 2) found between these plants (table 3).

Nitrogen from BNF is used for structural protein synthesis and with a catalytic function, favoring growth and development of legumes (Azcón-Bieto and Tolón 2010). The increase of ADM and RDM of siratro plants inoculated with Riz 5-1, Riz 8-11 and Riz 8-12, isolates that stood out for causing abundant effective nodulation in these plants, suggests the positive effect of the BNF in promoting plant growth. Recent studies with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants, inoculated with different rhizobia strains, showed that the most nodular plants with the highest nodular mass show the highest values of root and aerial dry mass (Ferreira *et al.* 2018 and Menge *et al.* 2018).

Rhizobia are considered as plant growth promoting bacteria that, in addition to FNN, have other mechanisms to promote plant growth, such as the synthesis of indole-3-acetic acid (IAA) and gibberellins (Flórez *et al.* 2017 and Singha *et al.* 2017). Both hormones favor the formation of lateral roots and increase the number and size of root hairs (Azcón-Bieto and Tolón 2010). The ability of some microorganisms to produce IAA from ammonia (Chandra *et al.* 2018), which, in the case of rhizobia, would come from BNF, could also contribute to the phyto-stimulating action of these microorganisms. The combined action of these mechanisms would explain the growth promotion produced by the inoculation of rhizobia strains such as Riz 5-1, Riz 8-11 and Riz 8-12 in siratro plants.

Research aimed at finding ecologically viable

Siratro se utiliza como leguminosa modelo para evaluar la nodulación, debido a su capacidad para establecer simbiosis con un rango amplio de géneros del grupo de los rizobios (Lima *et al.* 2009). La capacidad para formar nódulos en las leguminosas es uno de los criterios que más se considera para clasificar bacterias como rizobios (Howieson y Dilworth 2016). Por tanto, la presencia de nódulos en las raíces de siratro inoculadas con los doce aislados (figura 1 y 2) constituye una evidencia importante para poder considerar estos microorganismos como rizobios.

Los aislados Riz 5-1, Riz 8-11 y Riz 8-12 se destacaron en todas las variables evaluadas, en la nodulación como en la promoción del crecimiento de las plantas de siratro. La capacidad de las cepas para nodular la raíz principal es uno de los criterios más importantes en los estudios de selección de cepas, pues los nódulos que se ubican en esta posición presentan mayor actividad en la FBN (Samrudhi *et al.* 2013). Por la raíz principal fluye la mayor cantidad de nutrientes resultantes de la fotosíntesis, los que emplean los bacteroides para obtener energía para fijar el nitrógeno (Azcón-Bieto y Tolón 2010).

El tamaño de los nódulos se relaciona directamente con su masa. La presencia de altas concentraciones de bacteroides induce la multiplicación de las células del cortex de la raíz, lo que implica un aumento del tamaño nodular (Patriarca *et al.* 2004). Esto explicaría las diferencias significativas que se encontraron en la masa seca de los nódulos de las plantas inoculadas con los aislados Riz 8-11 y Riz 8-12 (tabla 3), independientemente de las similitudes en el número de nódulos en la raíz principal y total (figuras 1 y 2) constatados entre estas plantas (tabla 3).

El nitrógeno proveniente de la FBN se emplea para la síntesis de proteínas estructurales y con función catalítica, que favorecen el crecimiento y el desarrollo de las leguminosas (Azcón-Bieto y Tolón 2010). El incremento en la MSA y la MSR de las plantas de siratro inoculadas con Riz 5-1, Riz 8-11 y Riz 8-12, aislados que se destacaron por provocar abundante nodulación efectiva en estas plantas, sugiere el efecto positivo de la FBN en la promoción del crecimiento vegetal. Investigaciones recientes con plantas de frijol común, (*Phaseolus vulgaris* L.), inoculadas con diferentes cepas de rizobios, mostraron que las plantas más noduladas y con mayor masa nodular presentan los mayores valores de masa seca de la raíz y de la parte aérea (Ferreira *et al.* 2018 y Menge *et al.* 2018).

Los rizobios se consideran bacterias promotoras del crecimiento vegetal que, además de la FNN, presentan otros mecanismos para promover el crecimiento de las plantas, como la síntesis de ácido 3-indol acético (AIA) y giberelinas (Flórez *et al.* 2017 y Singha *et al.* 2017). Ambas hormonas favorecen la formación de raíces laterales e incrementan el número y tamaño de los pelos radicales (Azcón-Bieto y Tolón 2010). La capacidad de algunos microorganismos para producir AIA a partir de amonio (Chandra *et al.* 2018) que, en el caso de los rizobios, provendría de la FBN, también podría contribuir a la acción fitoestimulante de estos microorganismos. La acción combinada de estos

solutions for productive use of land dedicated to cattle rearing is insufficient in Cuba. Crop productivity in saline areas is limited, fundamentally due to the lack of nitrogen in the soil, which underlies the importance of symbiotic nitrogen fixation in affected areas. This study suggests the use of bacteria from rhizobia group for the inoculation of herbaceous legumes, which naturally establish in saline soils, and would allow the rescue of areas to increase cattle rearing and agricultural productivity in Cuba.

Conclusions

All the results of this study allow to select Riz 5-1 (from *Alysicarpus* nodules), and Riz 8-11 and Riz 8-12 (from *Crotalaria* nodules) isolates as promising for the inoculation of herbaceous legumes. These isolates saprophytically survive in soils affected by water deficit and salinity, a quality that makes them attractive for producing bio-preparations that allow the rehabilitation of pastures and forages in these soils.

mecanismos explicaría la promoción del crecimiento que produjo la inoculación de cepas de rizobios como Riz 5-1, Riz 8-11 y Riz 8-12 en las plantas de siratro.

Las investigaciones que se encaminan a la búsqueda de soluciones ecológicamente viables para el aprovechamiento productivo de suelos dedicados a la ganadería son insuficientes en Cuba. La productividad de los cultivos en áreas salinas está limitada, fundamentalmente por la falta de nitrógeno en el suelo, lo que fundamenta la importancia de la fijación simbiótica del nitrógeno en áreas afectadas. Esta investigación sugiere el empleo de bacterias del grupo de los rizobios para la inoculación de leguminosas herbáceas, que de manera natural se establecen en suelos salinos, lo que permitiría el rescate de áreas para incrementar la productividad agrícola y ganadera en Cuba.

Conclusiones

El conjunto de los resultados de esta investigación permite seleccionar a los aislados Riz 5-1 (proveniente de nódulos de *Alysicarpus*) y Riz 8-11 y Riz 8-12 (provenientes de nódulos de *Crotalaria*) como promisorios para la inoculación de leguminosas herbáceas. Estos aislados sobreviven saprofiticamente en suelos afectados por el déficit hídrico y la salinidad, cualidad que los hace atractivos para la elaboración de biopreparados que permitan la rehabilitación de pastos y forrajes en estos suelos.

References

- Almaguer, N., Peña, M. & Peña, Y. 2017. Extensión universitaria en agroecosistemas degradados del municipio Calixto García, Cuba. In: Visiones de Sostenibilidad. 1st Ed. (Aguilar, M.F.M. ed.), Holguín, Cuba, p. 21.
- Al-Saedi, S.A., Razaq, I.B. & Ali, N.A. 2016. "Utilization of 15N dilution analysis for measuring efficiency of biological nitrogen fixation under soil salinity stress". Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(1): 1468-1479, ISSN: 1482-1826, DOI: <https://doi.org/10.9734/MRJI/2018/40727>.
- 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>.
- Arango, J., Gutiérrez, J.F., Mazabel, J., Pardo, P., Enciso, K., Burkart, S., Sotelo, M., Hincapié, B., Molina, I., Herrera, Y. & Serrano, G. 2016. Estrategias tecnológicas para mejorar la productividad y competitividad de la actividad ganadera: Herramientas para enfrentar el cambio climático. 1st Ed. Ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, p.58, ISBN: 978-958-694-155-6, Available: < <https://hdl.handle.net/10568/71101>>.
- Atuesta, G.C.P. & Jaramillo, C.A.P. 2017. "Aislamiento del estigmasterol de las semillas de *Crotalaria juncea* L. (cascabelito) y su bioactividad sobre *Drosophila melanogaster*". Revista Cubana de Plantas Medicinales, 22: 3, ISSN: 1028-4796.
- Azcón-Bieto, J. & Talón, M. 2010. Fundamentos de fisiología vegetal. 2nd Ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid, España, p. 699, ISBN: 978-84-481-9293-8
- Babtle, M.S. 1937. "Properties of sufficiency and statistical test". Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, 160(901): 268-282, ISSN: 0080-4630, DOI: <https://doi.org/10.1098/rspa.1937.0109>.
- Ballhorn, D.J., Wolfe, E.R., Tyler, J., Ronan, W., Sands-Gouner, S., Shaw, C., Balkan, M.A. & Kautz, S. 2018. "Quantitative effects of soil salinity on the symbiosis of wild lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and Bradyrhizobium in Costa Rica". Journal of Applied Botany and Food Quality, 91: 304-409, ISSN: 1613-9216, DOI: <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2018.091.039>.
- Bécquer, C.J., Galdo, Y., Ramos, Y., Peña, M.D., Almaguer, N., Peña, Y.F., Mirabal, A., Quintana, M. & Puentes, A. 2016. "Rhizobia isolated from forage legumes of an arid cattle rearing ecosystem in Holguín, Cuba. Morpho-cultural evaluation and nodulation (phase I)". Cuban Journal of Agricultural Science, 50(4): 1-11, ISSN: 2079-3480.
- Castro, D., Urzúa, J., Rodríguez-Malebran, M., Inostroza-Blancheteau, C. & Ibáñez, C. 2017. "Woody leguminous trees: New uses for sustainable development of drylands". Journal of Sustainable Forestry, 36(8): 764-786, ISSN: 1054-9811, DOI: <https://doi.org/10.1080/10549811.2017.1359098>.
- Chandra, S., Askari, K. & Kumari, M. 2018. "Optimization of indole acetic acid production by isolated bacteria from *Stevia rebaudiana* rhizosphere and its effects on plant growth". Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 16(2): 581-586, ISSN: 1687-157X, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.09.001>.
- Chibeba, A.M., Kyei-Boahen, S., Guimarães, M. de F., Nogueira, M.A. & Hungria, M. 2017. "Isolation, characterization and selection of indigenous Bradyrhizobium strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique". Agriculture, Ecosystems & Environment, 246: 291-305, ISSN: 0167-8809, DOI: <https://doi.org/10.1016/j>

- agee.2017.06.017.
- Chidowe, O.A., Joshua, T.M., Sunday, A., Dawi, T.B., Oluoch, M. & Zeyaur, K. 2014. "Effect of Tillage, Fertilizer and Sorghum/Desmodium Intercrop Cultivation on Soils' Quality and Yield of Sorghum in an Alfisol of a Northern Guinea Savanna of Nigeria". *International Journal of Plant and Soil Science*, 3(1): 1490-1503, ISSN: 2320-7035, DOI: <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2014/9402>.
- da Costa, J.V.T., Junior, M.D.A.L., Candido, A., Saraiva, G., Fracetto, F.J.C. & Fracetto, G.G.M. 2019. "Decomposition and nutrient release from *Crotalaria spectabilis* with glyphosate application". *Ciencia del Suelo*, 37(2): 238-245, ISSN: 0326-3169.
- Demlew, M., Alemu, B. & Awuk, A. 2019. "Nutritive value Evaluation of Buffel grass and Silver leaf Desmodium Grown in Pure Stands and in Mixture at Different Harvesting Times in Gozamen District, East Gojjam Zone, Ethiopia". *Greener Journal of Agricultural Sciences*, 9(3): 315-321, ISSN: 2276-7770, DOI: <https://doi.org/10.15580/GJAS.2019.3.072419144>.
- Estrada, W., Chávez, L., Jérez, E., Nápoles, M.C., Sosa, A., Cordoví, C. & Celeiro, F. 2017. "Efecto del Azofert® en el rendimiento de variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de déficit hídrico". *Centro Agrícola*, 44(3): 36-42, ISSN: 2072-2001.
- Fernández Pascual, M., Pueyo, J., de Felipe, M., Golvano, M. & Lucas, M. 2007. "Singular Features of the *Bradyrhizobium lupinus* Symbiosis". *Dynamic Soil, Dynamic Plant*, 1(1): 1-16, ISSN: 1749-6500, Available: < <http://hdl.handle.net/10261/12646>>.
- Ferreira, L.D.V.M., Carvalho, F.D., Andrade, J.F.C. & Moreira, F.M.D.S. 2018. "Growth promotion of common bean and genetic diversity of bacteria from Amazon pastureland". *Scientia Agrícola*, 75(6): 461-469, ISSN: 1678-992X, DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2017-0049>.
- Flórez, J.D., Leal-Medina, G.I., Ardila-Leal, L.D. & Cárdenas-Caro, D.M. 2017. "Aislamiento y caracterización de rizobacterias asociadas a cultivos de arroz (*Oryza sativa* L.) del Norte de Santander (Colombia)". *Agrociencia*, 51(4): 373-391, ISSN: 2521-9766.
- Franzini, V.I., Azcón, R., Ruiz-Lozano, J.M. & Aroca, R. 2019. "Rhizobial symbiosis modifies root hydraulic properties in bean plants under non-stressed and salinity-stressed conditions". *Planta*, 249(4): 1207-1215, ISSN: 0032-0935, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-018-03076-0>.
- Fuskhah, E., Purbajanti, E.D. & Anwar, S. 2019. "Test of the resistance of rhizobium bacteria to salinity for the development of food legume plants in coastal areas". *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 250(1): 012044, ISSN: 1755-1315, DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/250/1/012044>.
- García, E., Siles, P., Eash, L., Van Der Hoek, R.E.I.N., Kearney, S.P., Smukler, S.M. & Fonte, S.J. 2018. "Participatory evaluation of improved grasses and forage legumes for smallholder livestock production in Central America". *Experimental Agriculture*, 55(5): 776-792, ISSN: 1469-4441, DOI: <https://doi.org/10.1017/S0014479718000364>.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R.K., Gowda, C.L.L. & Krishnamurthy, L. 2015. "Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities". *Biotech*, 5(4): 355-377, ISSN: 2190-5738, DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0241-x>.
- Hernández, A., Pérez, J.M., Bosh, D. & Castro, N. 2015. *Clasificación de los suelos de Cuba*. 1st Ed. Ed. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, González, O. (ed.), San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, p. 93.
- Howieson, J.G. & Dilworth, M.J. 2016. *Working with rhizobia*. 1st Ed. Ed. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia, ACIAR Monography No. 173, p. 314, ISBN: 978-1-925436-18-1.
- Huang, C.T., Chi-Te, L.I.U. & Wen-Yuan, K.A.O. 2018. "Rhizobia symbiosis of seven leguminous species growing along Xindian riverbank of Northern Taiwan". *Taiwania*, 63(1): 7-15, ISSN: 0372-333X, DOI: <https://doi.org/10.6165/tai.2018.63.7>.
- Hussain, M.B., Zahir, Z.A., Asghar, H.N. & Asgher, M. 2014. "Can catalase and EPS producing rhizobia ameliorate drought in wheat". *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(1): 3-13, ISSN: 1814-9596.
- Khaitov, B., Karimov, A., Abdiev, A., Farrukh, J. & Park, K. 2020. "Beneficial effect of Rhizobium inoculation on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in saline soils". *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 26(1): 96-104, ISSN: 1310-0351, Available: < <https://www.agrojournal.org/26/01-12.html>>.
- Kolmogorov, A. 1933. "Sulla determinazione empirica di una legge di distribuzione". *Giornale dell'Istituto Italiano degli Attuari*, 4: 11, ISSN: 0390-5780.
- Ladrera, R., Marino, D., Estibaliz, L., González, E.M. & Arrese-Igor, C. 2007. "Reduced carbon availability to bacteroids and elevated ureides in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation, response to early drought in soybean". *Plant Physiology*, 145(2): 539-546, ISSN: 1532-2548, DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.107.102491>.
- Lima, A.S., Nóbrega, R.S.A., Barberi, A., da Silva, K., Ferreira, D.F. & de Souza-Moreira, F.M. 2009. "Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*)". *Plant and Soil*, 319(1-2):127-145, ISSN: 1573-5036, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9855-2>.
- Liu, C.W. & Murray, J.D. 2016. "The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: An update". *Plants*, 5(3): 33, ISSN: 2223-774, DOI: <https://doi.org/10.3390/plants5030033>.
- Liu, F., Jensen, C.R., Shahanzari, A., Andersen, M.N. & Jacobsen, M.N. 2005. "ABA regulated stomatal control and photosynthetic water use efficiency of potato (*Solanum tuberosum* L.) during progressive soil drying". *Plant Science*, 168(3): 831-836, ISSN: 0168-9452, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.10.016>.
- Lodeiro, A.R. 2015. "Interrogantes en la tecnología de la inoculación de semillas de soja con *Bradyrhizobium spp.*". *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3): 261-273, ISSN: 0325-7541, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.06.006>.
- Machado, A. 2009. "Diversidad y cuantía de la flora en un pastizal disturbado y pastoreado de forma racional". *Pastos y Forrajes*, 32(3):1-1, ISSN: 0864-0394.

- Madigan, M.T., Martiniko, J.M. & Parker, J. 2019. Brock Biology of Microorganisms. 15th Ed. Ed. Pearson, New York, USA, p. 1064, ISBN: 9781292235103.
- Menge, E.M., Njeru, E.M., Koskey, G. & Maingi, J. 2018. "Rhizobial inoculation methods affect the nodulation and plant growth traits of host plant genotypes: A case study of Common bean *Phaseolus vulgaris* L. germplasms cultivated by smallholder farmers in Eastern Kenya". *Advances in Agricultural Science*, 6(3):77-94, ISSN: 2588-3801.
- Midega, C.A., Wasonga, C.J., Hooper, A.M., Pickett, J.A. & Khan, Z.R. 2017. "Drought-tolerant *Desmodium* species effectively suppress parasitic striga weed and improve cereal grain yields in western Kenya". *Crop Protection*, 98: 94-101, ISSN: 0261-2194, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.03.018>.
- Norris, D.O. & Dates, R.A. 1976. Legume bacteriology. In: *Tropical Pasture Research: Principles and Methods* (Bulletin - Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops), 51: 134-174, 1st Ed. Shaw, N.H. & Bryan, W.W. (eds). Ed. Commonwealth Agricultural Bureaux, Hurley, England, ISBN: 978-085-1983-585
- Patriarca, E.J., Tate, R., Ferraioli, S. & Iaccarino, M. 2004. "Organogenesis of legume root nodules". *International Review of Cytology*, 234: 201-262, ISSN: 0074-7696, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)34005-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)34005-2).
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E. & Bedmard, E.J. 2015. "Bacterial associations with legumes". *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3): 17-42, ISSN: 1549-7836, DOI: <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897899>.
- Pérez, G., Gómez, G., Nápoles, M.C. & Morales, B. 2008. "Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara". *Pastos y Forrajes*, 31(2): 1-1, ISSN: 0864-0394.
- Renier, A., de Faria, S.M., Jourand, P., Giraud, E., Dreyfus, B., Rapior, S. & Prin, Y. 2011. "Nodulation of *Crotalaria podocarpa* DC. by *Methylobacterium nodulans* displays very unusual features". *Journal of Experimental Botany*, 62(10): 3693-3697, ISSN: 1460-2431, DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/err083>.
- Romero, J.L., Elianni, C., Pavón, C. & Peña, M.D. 2015. "Inventario de plantas forrajeras de un ecosistema ganadero en condiciones de sequía y salinidad, municipio Calixto García, Holguín, Cuba". *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 4(1): 110-114, ISSN: 2307-695X.
- Sahgal, M. & Jaggi, V. 2018. Rhizobia: Culture Collections, Identification, and Methods of Preservation. In: *Microbial Resource Conservation. Soil Biology*, vol 54. Sharma S., Varma A. (eds). Ed. Springer Cham, Berna, Switzerland, p. 451, ISBN: 978-3-319-96971-8, DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8_6
- Salas, M.E., Lozano, M.J., López, J.L., Draghi, W.O., Serrania, J., Torres-Tejerizo, G.A., Albicoro, F.J., Nilsson, J.F., Pistorio, M., del Papa, M.F. & Parisi, G. 2017. "Specificity traits consistent with legume-rhizobia coevolution displayed by *Ensifer meliloti* rhizosphere colonization". *Environmental Microbiology*, 19(9): 3423-3438, ISSN: 1462-2920, DOI: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13820>.
- Samrudhi, R., Sharma, N., Kameswara, R., Trupti., S. & Shoab, I. 2013. "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, DOI: <https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i2.7590>.
- Selami, N., Auriac, M.C., Catrice, O., Capela, D., Kaid-Harche, M. & Timmers, T. 2014. "Morphology and anatomy of root nodules of *Retama monosperma* (L.) Boiss". *Plant and Soil*, 379(1-2): 109-119, ISSN: 1573-5036, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2045-5>.
- Sigarroa, A. 1985. *Biometría y Diseño Experimental*. 1st Ed. Ed. Editorial Pueblo y Educación, La Habana, Cuba, p.743
- Singha, B., Mazumder, P.B. & Pandey, P. 2017. "Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobia from Root Nodule of Two Legume Species Cultivated in Assam, India". *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(3): 1007-1016, ISSN: 2250-1746, DOI: <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0836-6>.
- Sosa, A., Elías, A., García, O.A. & Sarmiento, M. 2004. "Isolation and partial phenotype characterization of rhizobia strains that nodulate creeping legumes". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 38(2): 197-201, ISSN: 2079-3480.
- Sunita, K., Srivastava, M., Abbasi, P. & Muruganandam, M. 2019. "Impact of Salinity on Growth and N₂-Fixation in *Melilotus indicus*". *The Journal of Plant Science Research*, 35(1): 109-119, ISSN: 0976-3880, DOI: <https://doi.org/10.32381/JPSR.2019.35.01.10>.
- Terpolilli, J., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Dilworth, M.J. & Howieson, J.G. 2008. "The model legume *Medicago truncatula* A17 is poorly matched for N₂ fixation with the sequenced microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* 1021". *New Phytologist*, 179(1): 62-66, ISSN: 1469-8137, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02464.x>.
- Tewari, S. & Sharma, S. 2020. "Rhizobial exopolysaccharides as supplement for enhancing nodulation and growth attributes of *Cajanus cajan* under multi-stress conditions: A study from lab to field". *Soil and Tillage Research*, 198: 104545, ISSN: 0167-1987, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.still.2019.104545>.
- Trevisan, E., Partelli, F.L., Oliveira, M., Pires, F. & Braun, H. 2017. "Growth of *Piper nigrum* L. and nutrients cycling by intercropping with leguminous species". *African Journal of Agricultural Research*, 12(1): 58-62, ISSN: 1991-637X, DOI: <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11151>.
- Velázquez, E., Carro, L., Flores-Félix, J.D., Martínez-Hidalgo, P., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M.H., Mulas, R., González-Andrés, F. & Peix, A. 2017. The Legume Nodule Microbiome: A Source of Plant Growth-Promoting Bacteria. In: *Probiotics and Plant Health*. 1st Ed. Kumar, V., Kumar, M., Sharma, S., Prasad, R. (eds.), Ed. Springer, Singapore City, Singapore, p. 600, ISBN: 978-981-10-3473-2, DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-10-3473-2_3.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook No. 15. 15th Ed. Ed. International Biological Programme, by Blackwell Scientific, Oxford-Edinburgh, England, p. 164, ISBN: 063-206-410-2, DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.19720120524>.
- Wang, E.T. & Martínez-Romero, J. 2001. Taxonomía de Rhizobium. In: *Microbios*. Martínez-Romero, E. & Martínez-Romero, J.C (eds), Ed. Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno, Ciudad de México, México, p. 264, ISBN:

968-36-8879-9

- Wang, Q., Liu, J. & Zhu, H. 2018. "Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions". *Frontiers in Plant Science*, 9: 313, ISSN: 1664-462X, DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00313>.
- Xu, K.W., Zou, L., Penttinen, P., Zeng, X., Liu, M., Zhao, K., Chen, C., Chen, Y.X. & Zhang, X. 2016. "Diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Desmodium spp.* in Panxi, Sichuan, China". *Systematic and Applied Microbiology*, 39(1): 33-40, ISSN: 0723-2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.10.005>.
- Yamal, G., Bidalia, A., Vikram, K. & Rao K.S. 2016. An insight into the legume-rhizobium interaction. In: *Plant, Soil and Microbes*. Hakeem, K.R., Akhtar M.S. & Akmar, S.N. (eds), Ed. Springer Cham, Berna, Switzerland, p. 523, ISBN: 978-3-319-27455-3, DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3>.

Received: February 28, 2020

Accepted: June 22, 2020