



## Coinoculação de bactérias promotoras de crescimento em feijão comum <sup>(1)</sup>

Linnajara de Vasconcelos Martins Ferreira<sup>(2)</sup>; Fernanda de Carvalho<sup>(3)</sup>; Júlia Fonseca Colombo Andrade<sup>(4)</sup>; Fatima Maria de Sousa Moreira<sup>(5)</sup>.

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do CNPQ, CAPES e FAPEMIG

<sup>(2)</sup> Doutoranda em Ciência do Solo, Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras-UFLA; Lavras, Minas Gerais; E-mail: Linnajarasvasconcelos@hotmail.com; <sup>(3)</sup> Pós doutoranda, Bolsista CNPq/PNPD, DCS/UFLA, fernandacarva@hotmail.com; <sup>(4)</sup> Acadêmicas de Engenharia Ambiental, Bolsista PIBIC/FAPEMIG, UFLA jota-martin@hotmail.com; <sup>(5)</sup> Professora titular, DSC/UFLA, bolsista de produtividade nível 1A do CNPq, fmoreira@dcs.ufla.br.

**RESUMO:** A região Amazônica mostra-se de grande interesse por ser conhecida em todo o mundo pela sua alta diversidade de espécies vegetais e animais. Esta região ainda se destaca pela alta diversidade de organismos que habitam o solo incluindo os microrganismos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar, a capacidade de bactérias oriundas de solos amazônicos em formar nódulos e promover o crescimento do feijão comum bem como identifica-las geneticamente. Realizou-se o sequenciamento do gene 16S rRNA de 29 estirpes bacterianas oriundas do sistema de pastagens de áreas da Amazônia. Sete estirpes de bactérias promotoras do crescimento vegetal foram avaliadas individualmente e coinoculadas com estirpe CIAT 899 (*Rhizobium tropici*). As estirpes dos gêneros *Pseudomonas* (UFLA UFLA 02-286), *Bacillus* (UFLA 02-290) e *Xantomonas* (UFLA 02-274) aumentaram a produção de matéria seca total de plantas de feijão-comum quando inoculadas individualmente na presença de alta concentração de nitrogênio na solução nutritiva, já quando coinoculadas com a CIAT 899 promoveram aumentos significativos no número de nódulos.

**Termos de indexação:** bactérias endofíticas, *Phaseolus vulgaris*, rizóbio.

### INTRODUÇÃO

Na busca de isolados promissores quanto à promoção de crescimento vegetal, a região Amazônica mostra-se de grande interesse por ser conhecida em todo o mundo pela sua alta diversidade de espécies vegetais e animais. Esta região ainda se destaca pela alta diversidade de organismos que habitam o solo incluindo os microrganismos. Estudos tem demonstrado que estirpes de bactérias isoladas desta região apresentam potencial para atuarem como promotoras do crescimento vegetal seja pelo processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Ferreira et al., 2009; Almeida et al., 2010; Fonseca et al., 2013) quanto por outros, tais como: inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos, FBN de vida livre, solubilização de fosfato de cálcio e produção de ácidos indolacético (Oliveira-Longatti et al., 2013; Oliveira-Longatti et al., 2014) e indução de

tolerância a acidez do solo e outros estresses abióticos (Soares et al., 2014; Ferreira et al., 2012). Portanto, estudos utilizando bactérias isoladas da região amazônica, além de contribuir para o maior conhecimento da diversidade deste importante grupo de microrganismos nesta região, ainda podem ser promissores na descobertas de novas estirpes capazes de promover o crescimento vegetal de diversas culturas de importância social e econômica incluindo a do feijoeiro. O objetivo do presente trabalho foi identificar geneticamente 29 isolados de nódulos de feijão comum oriundas de solos de pastagem da Amazônia, e verificar sua capacidade de nodular e de promover o crescimento do feijoeiro quando inoculadas ou co-inoculadas com a CIAT 899.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Origem das estirpes

Foram avaliados 29 isolados de nódulos de feijão-comum, cultivados em solos oriundos da região Amazônica sob sistemas de pastagem (Barberi, 2007).

#### Identificação genética das estirpes

O DNA das estirpes bacterianas foi extraído pelo método da lise alcalina (Niemann et al., 1997). Para a amplificação parcial do gene 16S rRNA foi utilizado os pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTACGACTT) (Lane, 1991) de culturas na fase logarítmica em meio 79. Alíquotas de 10 µL do *template* dos DNA extraídos das estirpes foram utilizadas para 50 µL de reação de PCR. A concentração final dos reagentes por reação foi de 5 µL tampão 10X para PCR, 5 µL dNTP Mix (0,2 mM de cada), 4 µL (2,5 mM) de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de cada iniciador (10 mmol L<sup>-1</sup>) - 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'), 0,4 µL Taq DNA polimerase (5U µL<sup>-1</sup>) e água milli-Q estéril. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup> nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94 °C por 5 min., 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 40 s), anelamento (55 °C por 40 s), extensão (72 °C por 1 min e 30 s) e



uma extensão final de 72 °C por 7 min. Os produtos amplificados foi separados em gel de agarose 1% e visualizados sob luz UV. Os produtos de PCR foram enviados para o Laboratório da Macrogen (Coréia), para sequenciamento e purificação.

#### Autenticação e eficiência simbiótica em feijão comum

As 29 estirpes foram testadas quanto sua capacidade nodulífera e de promoção de crescimento em condições axênicas em solução nitritica (dados não apresentados). Destas, cinco apresentaram nodulação (UFLA 02-09, UFLA 02-287, UFLA 02-279, UFLA 02-280 UFLA 02-285), no entanto, não promoveram crescimento. De acordo com os resultados desse teste selecionaram-se sete estirpes (UFLA 02-274, UFLA 02-276, UFLA 02-281, UFLA 02-282, UFLA 02-286, UFLA 02-290, UFLA 02-933) que mais se destacaram quanto produção de matéria seca da parte aérea e raiz para avaliar o potencial de promoção do crescimento quando submetida a inoculação e a coinoculação com estirpe de rizóbio inoculante do feijão, CIAT 899.

O experimento foi conduzido durante os meses de outubro a novembro de 2014 em vasos de Leonard (Vincent, 1970) contendo solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950). Os tratamentos foram constituídos da inoculação individual das oito estirpes de bactérias, na presença de baixa (5,25 mg L<sup>-1</sup>) e alta (52,5 mg L<sup>-1</sup>) concentração de nitrogênio mineral na solução nutritiva; coinoculação das sete estirpes com a CIAT899, um controle positivo, referente a inoculação individual com estirpe CIAT899 e dois controles negativos sem inoculação, um com alta concentração de N mineral (52,5 mg L<sup>-1</sup>) e o outro com baixa concentração de N mineral (5,25 mg L<sup>-1</sup>), totalizado 27 tratamentos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições.

Antes da semeadura, as sementes de feijão cultivar Talismã foram desinfestadas superficialmente utilizando-se álcool etílico a 98% (30 segundos), hipoclorito de sódio a 2% (2 minutos) e, em seguida, submetidas a lavagens sucessivas em água destilada estéril. Após a desinfestação, as sementes foram colocadas em placas de petri esterilizadas contendo papel filtro e algodão umedecido, onde permaneceram durante 48 horas, em câmara de crescimento a 28 °C, para emissão das radículas. Em cada vaso foram semeadas quatro sementes e inoculadas com 1 ml da cultura crescida em meio 79 líquido com as estirpes na fase log de crescimento (10<sup>9</sup> células mL<sup>-1</sup>). Nos tratamentos sem inoculação foi adicionado apenas 1 mL de meio 79 líquido sem inóculo.

Após a semeadura e a inoculação, os vasos foram recobertos com uma camada de areia parafinada (10 kg de areia, 1 L de clorofórmio e 10 g de parafina). O desbaste foi realizado cinco dias após a emergência, deixando-se uma planta por vaso. Durante a condução do experimento, a solução nutritiva foi preparada, autoclavada e

reposta nos vasos periodicamente, de acordo com a taxa de absorção das plantas.

Aos 45 dias, após a semeadura, as plantas foram coletadas para determinação do número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR) e matéria seca total (MST).

Os dados do ensaio foram submetidos à análise de variância, empregando-se o programa de análise estatística SISVAR, versão 5.3 (Ferreira, 2011). Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os valores de NN e MSN foram transformados previamente para raiz quadrada de Y+0,5.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação das seqüências 16S rRNA das 29 estirpes testadas utilizando os dados disponíveis no GenBank revelaram que elas são filogeneticamente semelhante a sequencias dos gêneros: *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Xanthomonas* e *Bacillus* (Tabela 1). A maioria das estirpes identificadas é pertencente ao gênero *Pseudomonas* seguido dos gêneros *Burkholderia* e *Rhizobium*.

Tabela 1. Identificações genéticas das estirpes.

Estirpe	NPB <sup>1</sup>	S% <sup>2</sup>	Código	Espécie
UFLA 02-267	612	99	KF295815	<i>Burkholderia fungorum</i>
UFLA 02-268	714	100	FJ534682	<i>Burkholderia</i> sp.
UFLA 02-269	681	100	KC879711	<i>Pseudomonas koreensis</i>
UFLA 02-09	453	99	KC113610	<i>Rhizobium etli</i>
UFLA 02-270	546	100	AJ746111	<i>Variovorax</i> sp.
UFLA 02-271	369	100	HM584286	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-272	374	100	KC294113	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-273	501	100	EU853182	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-274*	649	100	KF923840	<i>Xanthomonas</i> sp.
UFLA 02-275	374	100	KM088025	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-276*	369	100	KF733335	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-277	601	100	KF053343	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-278	403	100	KF767887	<i>Pseudomonas putida</i>
UFLA 02-279	761	100	KM373191	<i>Rhizobium</i> sp.
UFLA 02-280	988	99	KJ632048	<i>Rhizobium</i> sp.
UFLA 02-281*	685	99	KF769969	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-282*	738	100	HM35242	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-283	584	100	JX827617	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-284	498	100	KP067092	<i>Pseudomonas</i> sp.
UFLA 02-285	651	99	KJ513849	<i>Rhizobium</i> sp.
UFLA 02-286*	465	100	KF184018	<i>Bacillus</i> sp.
UFLA 02-287	704	100	KJ734011	<i>Rhizobium</i> sp.
UFLA 02-288	783	100	HG794272	<i>Burkholderia fungorum</i>
UFLA 02-15	792	100	AY822513	<i>Bacterium RSD-1-2</i>
UFLA 02-289	358	100	KC894165	<i>Burkholderia fungorum</i>
UFLA 02-290*	985	100	NR116873	<i>Bacillus magaterium</i>
UFLA 02-291	662	100	NR113168	<i>Xanthomonas heicola</i>
UFLA 02-292	904	100	NR113168	<i>Xanthomonas heicola</i>
UFLA 02-293*	654	100	NR1028541	<i>Pseudomonas entomophila</i>

<sup>1</sup>números pares de bases; <sup>2</sup>similaridade. \*Estirpes avaliadas quanto ao potencial de promoção do crescimento quando submetida a inoculação e a coinoculação com estirpe CIAT 899.

As semelhanças das seqüências obtidas a partir da espécies estudadas com os acessos Genbank variou de 99 a 100% (Tabela 1).



O feijoeiro é considerado uma planta promíscua, com capacidade de estabelecer simbiose com vários gêneros de rizóbios: (Chen et al., 1991; Moreira et al., 2006; Ferreira et al., 2012). Apesar de sua alta capacidade de nodulação, nem todos os gêneros de rizóbios são capazes de fornecer nitrogênio de forma satisfatória à esta cultura (Moreira; Siqueira, 2006).

Dentre as bactérias promotoras do crescimento vegetal, estirpes dos gêneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Paenibacillus* e até mesmo estirpes de gêneros simbióticos como *Burkholderia* e *Rhizobium* são frequentemente descritas como potenciais promotoras do crescimento de plantas devido à atuação em diferentes processos biológicos, destacando-se a solubilização de fosfatos, síntese de fitohormônios, principalmente o ácido-3-indol acético e a fixação biológica de nitrogênio (Costa et al. 2013; Oliveira-Longatti et al. 2013; 2014; Costa et al., 2014).

As sete estirpes estudadas no teste de inoculação e coinoculação pertencem ao gênero *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Xantomonas* (Tabela 1). Verificou-se efeito significativo dos tratamentos sobre todas as variáveis avaliadas (Tabela 2). A estirpe inoculante do feijoeiro (CIAT 899) nodulou eficientemente e os controles negativos não apresentaram nodulação, indicando que não houve contaminação no experimento e que as condições experimentais eram favoráveis a nodulação. Nos tratamentos inoculados individualmente com as sete estirpes previamente selecionadas (UFLA 02-274, UFLA 02-276, UFLA 02-281, UFLA 02-282, UFLA 02-286, UFLA 02-290, UFLA 02-933) também não ocorreu nodulação do feijoeiro, na presença de baixa (-N) e alta (+N) concentração de nitrogênio mineral na solução nutritiva.

A coinoculação das estirpes UFLA 02-74, UFLA 02-290 e UFLA 02-286 com a CIAT 899 resultou em maior NN (176, 120 e 187 nódulos planta<sup>-1</sup>, respectivamente) em relação à inoculação individual com a estirpe CIAT 899 (86 nódulos planta<sup>-1</sup>). Já para MSN estas foram semelhantes à estirpe de referência. Em feijoeiro-comum a coinoculação de uma estirpe de *Bacillus* com *Rhizobium tropici* aumentou o NN e a MSN (Camacho et al., 2001). O mesmo foi observado por Oliveira-Longatti et al. (2013) em que a matéria seca dos nódulos do feijoeiro-comum foi aumentada com a coinoculação de estirpes de *Burkholderia fungorum* e *Rhizobium tropici* (CIAT 899).

Verificou-se que a coinoculação da CIAT 899 com as estirpes UFLA 02-290 e UFLA 02-282 reduziram o NN e com as estirpes UFLA 02-276, UFLA 02-933, UFLA 02-281 e UFLA 02-282 reduziram a MSN. Na coinoculação de bactérias nodulíferas com endofíticas de nódulos em leguminosas pode ocorrer tanto a estimulação como inibição da nodulação e do crescimento vegetal, dependendo da interação entre os simbiotes e as estirpes de bactérias promotoras de crescimento (Camacho et al., 2001).

**Tabela 2.** Número de nódulo (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST) de plantas de feijão inoculadas e coinoculadas com estirpes isoladas de solo da Amazônia em solos de pastagem.

Fontes de N	NN	MSN	MSR	MSPA	MST
	NN planta <sup>-1</sup>	-----g planta <sup>-1</sup> -----			
UFLA 02-274 +N	0,00 d	0,00 b	1,05 b	2,13 a	3,18 a
UFLA 02-274 -N	0,00 d	0,00 b	0,50 c	0,49 d	0,99 c
UFLA 02-274 + CIAT899	176,33 a	0,10 a	0,59 c	1,67 b	2,27 b
UFLA 02-290 +N	0,00 d	0,00 b	0,57 c	1,41 b	1,98 b
UFLA 02-290 -N	0,00 d	0,00 b	0,43 c	0,33 d	0,77 c
UFLA 02-290 + CIAT899	120,33 a	0,151 a	0,42 c	0,45d	0,87 c
UFLA 02-276 +N	0,00 d	0,00 b	0,48 c	0,48 d	0,96 c
UFLA 02-276 -N	0,00 d	0,00 b	0,34 c	0,26 d	0,61 c
UFLA 02-276 + CIAT899	44,33 c	0,021 b	0,32 c	0,39 d	0,71 c
UFLA 02-286 +N	0,00 d	0,00 b	1,05 b	2,13 a	3,130 a
UFLA 02-286 -N	0,00 d	0,00 b	0,64 c	0,87 c	1,51 c
UFLA 02-286 + CIAT899	187,0 a	0,082 a	0,49 c	1,37 b	1,86 b
UFLA 02-293 +N	0,00 d	0,00 b	0,79 c	1,20 b	2,30 b
UFLA 02-293 -N	0,00 d	0,00 b	0,37 c	0,29 d	0,67 c
UFLA 02-293 + CIAT899	85,66 b	0,026 b	0,34 c	0,40 d	0,75 c
UFLA 02-281 +N	0,00 d	0,00 b	1,43 a	1,17 b	2,60 b
UFLA 02-281 -N	0,00 d	0,00 b	0,58 c	0,53 d	1,20 c
UFLA 02-281 + CIAT899	90,00 b	0,07	0,42 c	1,06 c	1,48 c
UFLA 02-282 +N	0,00 d	0,00 b	1,35 a	2,48 a	3,83 a
UFLA 02-282 -N	0,00 d	0,00 b	0,32 c	0,26 d	0,58 c
UFLA 02-282 +CIAT899	43,32 c	0,030 b	0,26 c	0,34 d	0,60 c
Controle -N (5,25 mg N L <sup>-1</sup> )	0,00 d	0,00 b	0,49 c	0,19 d	0,69 c
Controle +N (52,5 mg N L <sup>-1</sup> )	0,00 d	0,00 b	0,74 c	1,37 b	1,92 b
CIAT899	86,0 b	0,075 a	0,36 c	1,54 b	1,90 b
CV%	36,55	3,90	33,8	33,2	26,98

CV= coeficiente de variação. Médias seguidas com as mesmas letra nas colunas não diferenciam entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Em relação à produção de MSR, MSPA e MST não houve efeito positivo da coinoculação das sete estirpes avaliadas com a estirpe CIAT 899, este resultado pode está relacionada ao fato das plantas terem sido colhidas antes da floração. No entanto, quando inoculadas individualmente, na presença de alta concentração de N, as estirpes UFLA 02-274, UFLA 02-286 e UFLA 02-282 promoveram produção de MSPA e MST superior controle sem inoculação com +N mineral e aos demais tratamentos. Para as estirpes UFLA 02-290, 02-276, UFLA 02-274, UFLA 02-281 e UFLA 02-282 a coinoculação da CIAT 899



promoveram efeito negativo sobre essas variáveis. Além disso, as estirpes UFLA 02-281 e UFLA 02-282 aumentaram significativamente a produção de MSR quando inoculadas individualmente na presença de alta concentração de N em relação aos demais tratamentos. Na simbiose *Bradyrhizobium* e feijão-caupi, a matéria seca da raiz foi maior quando as plantas foram coinoculadas com *Paenibacillus* (Rodrigues et al., 2012). Já Costa et al. (2014) verificaram que coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Enterobacter* sp. aumentaram significativamente a produção de MSR.

## CONCLUSÕES

As estirpes dos gêneros *Pseudomonas* (UFLA UFLA 02-286), *Bacillus* (UFLA 02-290) e *Xantomonas* (UFLA 02-274) aumentaram a produção de matéria seca total de plantas de feijão-comum quando inoculadas individualmente na presença de alta concentração de nitrogênio na solução nutritiva, já quando coinoculadas com a CIAT 899 promoveram aumentos significativos no número de nódulos e na matéria seca de nódulo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto e pela concessão de bolsas de estudos.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. L.G.; ALCÂNTARA, R. M. C. M.; NÓBREGA, R. S. A.; LEITE, L. F. C.; SILVA, J. A. L.; NÓBREGA, J. C. A. Produtividade do feijão-caupi cv. BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v:364-36, 2010.

BARBERI A. Diversidade e eficiência de bactérias que nodulam feijoeiro de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental. 2007. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras.

CAMACHO, M.; SANTAMARÍA, C.; TEMPRANO, F.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N.; DAZA, A. Co-inoculation with *Bacillus* sp. CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L. Canadian Journal of Microbiology, 47:1058- 1061, 2001.

CHEN, W. X. et al. *Rhizobium huahuii* sp.nov. isolated from root nodules of *Astragalus sinicus*. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, 41:275-280, 1991.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 48:1275-1284, 2013.

FERREIRA, D.F. SISVAR software: versão 5.1. Lavras: DEX/UFLA, 2011. Software.

FERREIRA, P. A. A.; SILVA, M. A. P.; CASSETARI, A.; RUFFINI, M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; Inoculação com cepas de rizóbios na cultura do feijoeiro. Ciência Rural. 39:2210-2212, 2009.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. T. The water culture method for growing plants without soil. Berkeley: California Agriculture Experiment Station, 1950. 32 p. (Circular, 347).

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

NIEMANN, S.; PUEHLER, A.; TICHY, H.; SIMON, R.; SELBITSCHKA, W. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium melioli* population. Journal Applied Microbiology. 82:477-484. 1997.

OLIVEIRA-LONGATTI, S. M. et al., 2014. Bacteria isolated from soils of the western Amazon and from rehabilitated bauxite-mining areas have potential as plant growth promoters. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 30, p. 1239-1250, 2014.

OLIVEIRA-LONGATTI, S. M.; MARRA, L. M. MOREIRA, F. M. S. Evaluation of plant growth-promoting traits of *Burkholderia* and *Rhizobium* strains isolated from Amazon soils for their co-inoculation in common bean. African Journal of Microbiology Research, v. 7, p. 948-959, 2013.

RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; MEDEIROS, V. V.; BARROS, B. G. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. Bioscience Journal, 28:196-202, 2012.

VINCENT, J. M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell, 1970, 164.