

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y MOLECULAR DE LOS
RIZOBIOS NODULADORES DE *DESMANTHUS VIRGATUS*
AISLADOS EN SUELOS ARGENTINOS**

Ing. Agr. Laura Viviana Fornasero

Director de Tesis: Dr. Antonio Lagares
Co-director de Tesis: Dr. José Francisco Pensiero

Lugar de realización:

Laboratorio de Biotecnología y Biología Aplicada- Facultad de Ciencias Agrarias (UNL)

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular – Facultad de Ciencias Exactas (UNLP)

A Carlos, Mauricio y Matías.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis ha sido posible gracias a la invaluable ayuda de un gran número de personas e instituciones:

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (FBCB-UNL) por permitirme enmarcar este trabajo dentro de la carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas y muy especialmente a Adriana Ortolani por las facilidades suministradas en relación a la entrega de este manuscrito.

A la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral (FCA-UNL), por haberme facilitado herramientas e infraestructura para la realización de esta tesis.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) por brindarme el espacio físico, los equipos e instalaciones necesarias para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Antonio Lagares, por dirigir mi trabajo, por todas sus enseñanzas, por su estímulo y principalmente por brindarme su apoyo y confianza.

Al Dr. José Pensiero, por codirigir mi trabajo en forma crítica.

A la Dra. Florencia Del Papa, por su ayuda invaluable y fundamentalmente, por ser un ejemplo de trabajo y de persona.

A María Antonieta, por ayudarme siempre, por su apoyo en los momentos más críticos y por sobre todo por su amistad.

A Betiana y Nicolás, por su compañerismo constante y esfuerzo desinteresado.

A Pablo y Marcelo, por su ayuda en los experimentos de laboratorio y en las tareas de campo.

A José, Angeles, Eugenia, Walter, Mauricio, Carla, Julieta, Mariano, Gonzalo y a todos los integrantes del IBBM por su compañerismo y buena predisposición para que mi estadía sea fructífera y agradable.

Al Ing.Agr. Alejandro Perticari, por su valiosa colaboración en la elaboración de los inoculantes y por su buena disposición.

A mis amigos, por soportar ausencias y por estar siempre a pesar de la distancia.

A mis hermanos, por estar siempre dispuestos a ayudarme y entenderme.

A mi familia, Carlos, Mauricio y Matías por su amor infinito y su apoyo incondicional.

A todos, muchas gracias!

INDICE GENERAL

| | | Página |
|---------------------------------------|---|-----------|
| Indice | | I |
| Indice de Figuras | | VI |
| Indice de Tablas | | IX |
| Abreviaturas | | XI |
| Resumen | | XII |
| Abstract | | XIII |
| Introducción General | | |
| 1. | Fijación biológica de nitrógeno. | 2 |
| 2. | Plantas Leguminosas. | 4 |
| 2.1. | Género <i>Desmanthus</i> Willd. | 5 |
| 2.1.1. | <i>Desmanthus virgatus</i> (L.) Willd. | 7 |
| 3. | Rizobios. | 12 |
| 3.1. | Taxonomía. | 12 |
| 3.2. | Hábitat y estilos de vida. | 17 |
| 4. | Simbiosis rizobio- leguminosa. | 18 |
| 4.1. | Reconocimiento de los simbiosites: Intercambio de señales entre el rizobio y la leguminosa. | 18 |
| 4.2. | Colonización y adhesión de los rizobios a las raíces. | 21 |
| 4.3. | La infección. | 23 |
| 4.4. | Organogénesis del nódulo. | 26 |
| 4.5. | Diferenciación y fijación de nitrógeno. | 29 |
| 5. | Factores ambientales que inciden sobre el establecimiento de las asociaciones simbióticas rizobio-leguminosa. | 31 |
| 5.1. | Temperatura. | 31 |
| 5.2. | pH del suelo. | 32 |
| 5.3. | Salinidad. | 33 |
| Objetivos del trabajo de tesis | | 35 |
| Materiales y Métodos | | |
| 1. | Colección de poblaciones de plantas de <i>D. virgatus</i> (<i>sensu lato</i>). | 37 |
| 1.1. | Sitios de colectas de las poblaciones del complejo <i>D. virgatus</i> . | 37 |
| 1.2. | Caracterización de los sitios de origen de las poblaciones de <i>D. virgatus</i> (<i>sensu lato</i>). | 38 |
| 2. | Medios de cultivos y conservación de microorganismos. | 38 |
| 2.1 | Medios de cultivo. | 38 |
| 2.1.1. | Antibióticos. | 38 |
| 2.2. | Medios de conservación. | 39 |
| 3. | Cepas bacterianas de referencia. | 39 |
| 4. | Material vegetal. | 40 |
| 4.1. | Semillas del complejo <i>D. virgatus</i> . | 40 |
| 4.2. | Escarificación, desinfección y germinación de las semillas. | 40 |
| 4.2.1. | Complejo <i>D. virgatus</i> . | 40 |
| 4.2.2. | <i>P. vulgaris</i> y otras leguminosas. | 40 |
| 4.3. | Inoculación de las plantas. | 41 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| 4.4. | Condiciones de cultivo vegetal. | 41 |
| 5. | Colección de nódulos de las plantas de <i>D. virgatus</i> (<i>sensu lato</i>). | 41 |
| 5.1. | Colección de nódulos de las plantas de campo. | 41 |
| 5.2. | Colección de nódulos de las plantas en condiciones de crecimiento controlado. | 42 |
| 6. | Colección de aislamientos noduladores | 42 |
| 6.1. | Aislamiento de cepas bacterianas a partir de nódulos de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> . | 42 |
| 6.2. | Pruebas de pureza y confirmación del fenotipo de nodulación. | 43 |
| 7. | Caracterización fenotípica de los rizobios. | 44 |
| 7.1. | Características morfológicas. | 44 |
| 7.2. | Características fisiológicas. | 44 |
| 7.2.1. | Velocidad de crecimiento de los aislamientos. | 44 |
| 7.2.2. | Respuesta al cambio de coloración del medio LMA con azul de bromotimol. | 44 |
| 7.2.3. | Crecimiento en diferentes condiciones de pH, temperatura y salinidad. | 44 |
| 7.2.4. | Análisis estadístico. | 45 |
| 8. | Caracterización genotípica de rizobios noduladores del complejo <i>D. virgatus</i> . | 45 |
| 8.1. | Perfil de plásmidos de los aislamientos de rizobios. | 45 |
| 8.2. | Extracción de ADN total. | 46 |
| 8.3. | Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). | 46 |
| 8.4. | Amplificaciones de ADN total de los aislamientos. | 47 |
| 8.5. | Amplificación de las secuencias parciales del gen <i>nodC</i> . | 47 |
| 8.6. | Amplificación de las secuencias parciales del gen ADNr 16S. | 47 |
| 8.7. | Secuenciación y análisis filogenético. | 48 |
| 8.8. | Electroforesis en geles de agarosa. | 48 |
| 8.9. | Revelado de geles y fotografía. | 48 |
| 8.10. | Análisis de productos de amplificación de ADN total de los diferentes aislamientos. | 49 |
| 9. | Ensayos de estimación de FBN en cámara de crecimiento. | 49 |
| 9.1. | Diseño de las experiencias. | 49 |
| 9.2. | Cuantificación de los nódulos y peso seco de <i>D. virgatus</i> . | 50 |
| 10. | Medida de la competitividad para la nodulación. | 50 |
| 11. | Evaluación de la performance a campo. | 51 |
| 11.1. | Caracterización del sitio de los ensayos. | 51 |
| 11.2. | Genotipos y análisis de poder germinativo de las semillas de <i>D. virgatus</i> . | 51 |
| 11.3. | Preparación de los inoculantes. | 52 |
| 11.4. | Diseño experimental. | 52 |
| 11.5. | Desarrollo de los ensayos a campo. | 52 |
| 11.6. | Análisis de la efectividad de la inoculación. | 53 |
| Capítulo I: | Selección y colecta de poblaciones de plantas de <i>D. virgatus</i> (<i>sensu lato</i>) procedentes de la República Argentina. | |
| I.1. | Introducción. | 55 |
| I.2. | Resultados y discusión. | 57 |
| I.2.1. | Descripción del género y determinación taxonómica de las poblaciones colectadas del complejo <i>D. virgatus</i> . | 57 |

| | | |
|------------|--|----|
| I.2.2. | Características fitogeográficas, climáticas y edáficas de los sitios de procedencia de la colección de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> . | 60 |
| I.2.2.1. | Características fitogeográficas de los sitios de colecta. | 60 |
| I.2.2.2. | Características climáticas de los sitios de procedencia de las poblaciones del complejo <i>D. virgatus</i> . | 64 |
| I.2.2.3. | Características edáficas de los sitios de origen de las poblaciones del complejo <i>D. virgatus</i> . | 66 |
| I.2.2.3.1. | Propiedades químicas de los suelos de origen de las poblaciones del complejo <i>D. virgatus</i> . | 69 |
| I.2.3. | Características morfológicas de las poblaciones cultivadas del complejo <i>D. virgatus</i> . | 72 |
| I.3. | Conclusiones. | 74 |

Capítulo II: Establecimiento de una colección de aislamientos noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos del centro y norte de la República Argentina.

| | | |
|-----------|---|----|
| II.1. | Introducción. | 76 |
| II.2. | Resultados y discusión. | 79 |
| II.2.1. | Evaluación de la nodulación rizobio-complejo <i>D. virgatus</i> . | 79 |
| II.2.1.1. | Evaluación de la nodulación rizobio-complejo <i>D. virgatus</i> en sus hábitats naturales. | 79 |
| II.2.1.2. | Evaluación de la nodulación de las distintas poblaciones del complejo <i>D. virgatus</i> inoculadas con sus suelos de origen en condiciones de crecimiento controlado en cámara de plantas. | 83 |
| II.2.2. | Organización, establecimiento y preservación de una colección de aislamientos de rizobios noduladores del complejo <i>D. virgatus</i> . | 88 |
| II.2.2.1. | Colección de aislamientos. Confirmación del fenotipo de nodulación en clones de la colección. | 89 |
| II.3. | Conclusiones. | 92 |

Capítulo III: Características fenotípicas de los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos del centro y norte de la República Argentina.

| | | |
|------------|--|-----|
| III.1. | Introducción. | 94 |
| III.2. | Resultados y discusión. | 97 |
| III.2.1. | Características morfológicas de los rizobios noduladores del complejo <i>D. virgatus</i> aislados en este trabajo de tesis. | 97 |
| III.2.1.1. | Morfología macroscópica. | 97 |
| III.2.1.2. | Características morfológicas microscópicas. | 98 |
| III.2.2. | Características fisiológicas de los rizobios nativos noduladores del complejo <i>D. virgatus</i> . | 99 |
| III.2.2.1. | Velocidad de crecimiento de los aislamientos. | 99 |
| III.2.2.2. | Respuesta al cambio de coloración del medio LMA con azul de bromotimol. | 99 |
| III.2.3. | Características de tolerancia a factores abióticos de los aislamientos de la colección de rizobios noduladores del complejo <i>D. virgatus</i> . | 100 |
| III.2.3.1. | Caracterización del conjunto completo de aislamientos de rizobios frente a diferentes tipos de estrés, discriminados por | |

| | | |
|--------------|---|-----|
| | especie hospedadora. | 100 |
| III.2.3.2. | Análisis de la tolerancia a cada tipo de estrés en los aislamientos de la colección discriminados de acuerdo a su sitio y población de origen. | 105 |
| III.2.3.2.1. | Características de tolerancia a la temperatura. | 105 |
| III.2.3.2.2. | Características de tolerancia a pH extremos. | 108 |
| III.2.3.2.3. | Características de tolerancia a condiciones de salinidad. | 112 |
| III.2.3.3. | Análisis y reconocimiento de las cepas de la colección de rizobios con características de tolerancia a diferentes factores abióticos adversos. | 114 |
| III.2.4. | Características fenotípicas de los rizobios noduladores de <i>D. paspalaceus</i> recuperados de plantas de la provincia de Santa Fe (población 10). | 116 |
| III.2.4.1. | Características morfológicas de los rizobios. | 116 |
| III.2.4.2. | Tolerancia a factores abióticos de los rizobios noduladores de <i>D. paspalaceus</i> recuperados de plantas de la provincia de Santa Fe. | 117 |
| III.3. | Conclusiones. | 120 |

Capítulo IV: Biodiversidad genotípica de los rizobios simbioses del complejo *D. virgatus* presentes en de suelos del centro y norte de Argentina.

| | | |
|-------------|--|-----|
| IV.1. | Introducción. | 122 |
| IV.2. | Resultados y discusión. | 126 |
| IV.2.1. | Características genotípicas de los aislamientos de rizobios noduladores del complejo <i>D. virgatus</i> . | 126 |
| IV.2.1.1. | Análisis de los megaplásmidos presentes en los aislamientos de rizobios discriminados de acuerdo a su sitio y población de origen. | 126 |
| IV.2.1.2. | Estudio de la diversidad genética de los aislamientos simbioses a través de técnicas de huellas digitales de ADN total por métodos de PCR. | 128 |
| IV.2.1.2.1. | Análisis de la diversidad genética de los aislamientos simbioses discriminados de acuerdo a su sitio y población de origen. | 130 |
| IV.2.1.3. | Posición filogenética de los aislamientos simbioses de <i>D. paspalaceus</i> recuperados de suelos de la localidad de General Obligado, provincia de Santa Fe. | 136 |
| IV.2.1.3.1. | Secuenciación parcial y análisis de los genes ADNr 16S y <i>nodC</i> . | 136 |
| IV.2.1.3.2. | Análisis de las relaciones filogenéticas entre diferentes especies de rizobios incluyendo los simbioses de <i>D. paspalaceus</i> . | 141 |
| IV.3. | Conclusiones. | 143 |

Capítulo V: Características simbióticas de los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos del centro y norte de la República Argentina.

| | | |
|--------|--|-----|
| V.1. | Introducción. La simbiosis rizobios noduladores-complejo <i>D. virgatus</i> en suelos argentinos. Caracterización simbiótica y selección de cepas inoculantes. | 146 |
| V.2. | Resultados y discusión. | 148 |
| V.2.1. | Eficiencia simbiótica de los aislamientos de rizobios en cámaras de crecimiento de cultivo. | 148 |

| | | |
|-------------------------------|---|-----|
| V.2.1.1. | Estimación de la fijación biológica de nitrógeno de los rizobios en simbiosis con el complejo <i>D. virgatus</i> . | 150 |
| V.2.1.1.1. | Estimación de la FBN de los rizobios simbioses de <i>D. paspalaceus</i> recuperados de suelos de la provincia de Santa Fe. | 151 |
| V.2.1.1.2. | Estimación de la FBN de los rizobios noduladores de <i>D. virgatus</i> (sensu estricto) presentes en suelos de la provincia de Jujuy. | 153 |
| V.2.1.1.3. | Estimación de la FBN de los aislamientos simbioses de <i>D. paspalaceus</i> recuperados en suelos de la provincia de Corrientes. | 156 |
| V.2.1.2. | Evaluación de la capacidad simbiótica de los rizobios noduladores del complejo <i>D. virgatus</i> . | 159 |
| V.2.2. | Competitividad para la nodulación de las cepas de rizobios en simbiosis con el complejo <i>D. virgatus</i> . | 161 |
| V.3. | Conclusiones. | 163 |
| Capítulo VI: | Evaluación de la performance a campo de los aislamientos noduladores de <i>D. virgatus</i> seleccionados por su eficiencia simbiótica. | |
| VI.1. | Introducción. | 166 |
| VI.2. | Resultados y discusión. | 169 |
| VI.2.1. | Características edafoclimáticas del sitio de los ensayos a campo. | 169 |
| VI.2.2. | Genotipos y poder germinativo de las semillas de <i>D. virgatus</i> . | 173 |
| VI.2.3. | Preparación y evaluación de la calidad de los inoculantes. | 174 |
| VI.2.4. | Implantación de los ensayos a campo. | 176 |
| VI.2.5. | Establecimiento de las plántulas. | 177 |
| VI.2.6. | Evaluación de la performance simbiótica de los aislamientos noduladores de <i>D. virgatus</i> en condiciones de campo. | 178 |
| VI.3. | Conclusiones. | 183 |
| Conclusiones Generales | | 185 |
| Bibliografía | | 191 |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|---------------|---|-----|
| Figura 1. | <i>Desmanthus virgatus</i> (L) Wild. | 8 |
| Figura 2. | Distribución natural de <i>D. virgatus</i> . | 9 |
| Figura 3. | Distribución geográfica de las especies del complejo <i>D. virgatus</i> (<i>D. tathyensis</i> , <i>D. virgatus</i> , <i>D. paspalaceus</i> y <i>D. acuminatus</i>) en la República Argentina. | 10 |
| Figura 4. | Estructura general de los factores Nod producidos por rizobios. | 19 |
| Figura 5. | Hilo de infección de <i>M. sativa</i> cuando es infectado por una cepa de <i>S. meliloti</i> . | 23 |
| Figura 6. | Esquemas de cortes longitudinales de un nódulo indeterminado y un nódulo determinado. | 27 |
| Figura 7. | Esquema general del desarrollo de un nódulo indeterminado con las principales moléculas que intervienen en el reconocimiento. | 28 |
| Figura I.1. | Sitios de colectas de las poblaciones del complejo <i>D. virgatus</i> . | 60 |
| Figura I.2. | Ejemplar de <i>D. acuminatus</i> de la población 1 (Nogoyá-Entre Ríos). | 72 |
| Figura I.3. | A. Ejemplar de <i>D. paspalaceus</i> de la población 4 (Candelaria-Misiones). B. Ejemplar de <i>D. virgatus</i> (sensu estricto) de la población 7 (EL Carmen-Jujuy). | 73 |
| Figura II.1. | Ensayo de nodulación de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> de las poblaciones 1, 2 y 3 inoculadas con sus suelos de origen en condiciones de crecimiento controlado. | 83 |
| Figura II.2. | Planta de <i>D. paspalaceus</i> desarrollada en condiciones de crecimiento controlado. | 86 |
| Figura II.3. | Amplificación de secuencias <i>nodC</i> por PCR de los aislamientos simbiotes del complejo <i>D. virgatus</i> . | 91 |
| Figura III.1. | Morfología macroscópica de las colonias de rizobios noduladores del complejo <i>D. virgatus</i> recuperados de suelos del centro y norte de Argentina. | 98 |
| Figura III.2. | Separación de los aislamientos noduladores del complejo <i>D. virgatus</i> mediante Análisis de Componentes Principales (ACP) de sus diferentes tolerancias a estreses abióticos. | 104 |

| | | |
|---------------|---|-----|
| Figura III.3. | Propiedades de crecimiento en medios ácidos y alcalinos de rizobios noduladores de las poblaciones de <i>D. paspalaceus</i> y <i>D. virgatus</i> (sensu stricto). | 110 |
| Figura III.4. | Rizobios noduladores de las poblaciones de <i>D. paspalaceus</i> y <i>D. virgatus</i> (sensu stricto) tolerantes a distintos niveles de salinidad en medio nutritivo. | 113 |
| Figura III.5. | Morfología macroscópica de las colonias de rizobios noduladores de <i>D. paspalaceus</i> recuperados de la localidad de General Obligado, provincia de Santa Fe. | 116 |
| Figura III.6. | Separación de los aislamientos noduladores de <i>D. paspalaceus</i> mediante Análisis de Componentes Principales (PCA) de sus diferentes tolerancias a estreses abióticos. | 119 |
| Figura IV.1. | Perfiles plasmídicos de los rizobios noduladores del complejo <i>D. virgatus</i> . | 128 |
| Figura IV.2. | Análisis UPGMA realizado en base a la presencia-ausencia de bandas en los productos de amplificación BOXA1R de diferentes aislamientos locales noduladores de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> . | 129 |
| Figura IV.3. | Patrones de amplificación de ADN genómico de los aislamientos recuperados de nódulos de las raíces de <i>D. paspalaceus</i> de la provincia de Santa Fe (población 10). | 131 |
| Figura VI.4. | Análisis UPGMA realizado en base a la presencia-ausencia de bandas en los productos de amplificación BOXA1R de diferentes aislamientos recuperados de suelos de la provincia de Jujuy (población 8) noduladores de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> . | 132 |
| Figura IV.5. | Perfiles de amplificación de ADN genómico de aislamientos simbiotes de <i>D. virgatus</i> (poblaciones 7 y 8) presentes en suelos de Jujuy. | 133 |
| Figura IV.6. | Análisis UPGMA realizado en base a la presencia-ausencia de bandas en los productos de amplificación BOXA1R de diferentes aislamientos recuperados de suelos de Santo Tomé, provincia de Corrientes (población 3) noduladores de plantas de <i>D. paspalaceus</i> . | 134 |
| Figura IV.7. | Patrones de amplificación de ADN genómico de los aislamientos recuperados de nódulos de <i>D. paspalaceus</i> de la provincia de Corrientes (población 2). | 135 |
| Figura IV.8. | Relaciones filogenéticas (<i>neighbor-joining</i>) entre las regiones ADNr 16S de diferentes rizobios incluyendo los simbiotes de <i>D. paspalaceus</i> presentes en suelos de General Obligado, Santa Fe. | 137 |
| Figura IV.9. | Relaciones filogenéticas (<i>neighbor-joining</i>) entre fragmentos de los genes <i>nodC</i> de diferentes rizobios incluyendo los simbiotes de <i>D. paspalaceus</i> presentes en suelos de General Obligado-Santa Fe. | 140 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| Figura V.1. | Efecto de la inoculación con rizobios recuperados de suelos de Santa Fe sobre la materia seca de plantas de <i>D. paspalaceus</i> en condiciones de crecimiento controlado. | 152 |
| Figura V.2. | Efecto de la inoculación con rizobios presentes en suelos de Jujuy sobre la materia seca vegetal de <i>D. virgatus</i> en condiciones de crecimiento controlado. | 154 |
| Figura V.3. | Efecto de la inoculación con rizobios presentes en suelos de Corrientes sobre la materia seca vegetal de <i>D. paspalaceus</i> en condiciones de crecimiento controlado. | 157 |
| Figura V.4. | Evaluación de la competitividad de los rizobios simbioses del complejo <i>D. virgatus</i> recuperados de suelos de Corrientes (3), Jujuy (8) y Santa Fe (10). | 162 |
| Figura VI.1. | Distribución de las precipitaciones y variación de las temperaturas medias mensuales registradas durante la realización de los ensayos a campo (periodo enero-mayo 2012) y las medias mensuales normales (INTA, 1991) correspondientes a la localidad de Esperanza. | 172 |
| Figura VI.2. | Efecto de la inoculación con cepas de rizobios nativos e introducida CB3126 y la fertilización nitrogenada sobre la Materia seca Aérea (mg/pl) y Contenido de Nitrógeno (mg N/pl) de <i>D. virgatus</i> cv. Marc en condiciones de campo en la localidad de Esperanza, Santa Fe. | 180 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|--------------|---|-----|
| Tabla 1. | Especies de bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. | 13 |
| Tabla 2. | Ubicación geográfica de las poblaciones de <i>D. virgatus</i> (<i>sensu lato</i>). | 37 |
| Tabla 3. | Cepas bacterianas utilizadas de referencia en este trabajo. | 39 |
| Tabla I.1. | Determinación taxonómica, Dominio, Provincia y Distrito Fitogeográfico, y Provincia y Departamento de la colección de poblaciones del complejo <i>D. virgatus</i> . | 62 |
| Tabla I.2. | Características climáticas de los sitios de origen de la colección de poblaciones de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> . | 66 |
| Tabla I.3. | Características edáficas de los sitios de origen de la colección de poblaciones de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> . | 68 |
| Tabla I.4. | Propiedades químicas de los suelos de origen de la colección de poblaciones de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> . | 70 |
| Tabla II.1. | Evaluación de la nodulación de las diferentes poblaciones de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> provenientes de sus hábitats naturales. | 80 |
| Tabla II.2. | Evaluación de la nodulación y del crecimiento vegetativo inicial de las poblaciones del complejo <i>D. virgatus</i> cultivadas con sus respectivos suelos de origen en condiciones de crecimiento controlado. | 84 |
| Tabla II.3. | Colección de rizobios noduladores de las poblaciones del complejo <i>D. virgatus</i> procedentes de diferentes sitios del centro y norte de Argentina. | 90 |
| Tabla III.1. | Evaluación de la tolerancia a diferentes condiciones de estreses abióticos en rizobios noduladores del complejo <i>D. virgatus</i> aislados de suelos locales. | 102 |
| Tabla III.2. | Características de tolerancia a temperaturas de crecimiento superiores a la óptima en rizobios noduladores de <i>Desmanthus</i> spp., discriminados por población y especie de planta hospedadora de donde fueron aislados. | 106 |
| Tabla III.3. | Identificación de los aislamientos locales de rizobios noduladores de <i>Desmanthus</i> spp. con tolerancia destacada a varios factores de estrés abiótico de importancia agronómica. | 115 |
| Tabla III.4. | Crecimiento de rizobios noduladores de <i>D. paspalaceus</i> de la provincia de Santa Fe (población 10) evaluados bajo distintas condiciones de estreses abióticos en medio LMA. | 118 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| Tabla IV.1. | Evaluación de la presencia de megaplásmidos en rizobios noduladores del complejo <i>D. virgatus</i> , discriminados según su sitio de origen y población de planta hospedadora. | 127 |
| Tabla IV.2. | Análisis de los grupos Tipo BOXA1R y géneros bacterianos de los aislamientos simbiotes de <i>D. paspalaceus</i> recuperados de Santa Fe. | 138 |
| Tabla V.1. | Crecimiento de rizobios noduladores de <i>D. virgatus</i> de la provincia de Jujuy (población 8) evaluados bajo diferentes condiciones de estreses abióticos en medio LMA. | 155 |
| Tabla V.2. | Crecimiento de rizobios noduladores de <i>D. paspalaceus</i> de la provincia de Corrientes (población 3) evaluados bajo condiciones de estreses abióticos en medio LMA. | 158 |
| Tabla V.3. | Evaluación de la capacidad simbiótica de los rizobios noduladores del complejo <i>D. virgatus</i> , discriminados según su sitio de origen y población de planta hospedadora. | 159 |
| Tabla VI.1. | Valores medios mensuales de las variables meteorológicas registradas durante los meses de realización de los ensayos en el Campo Experimental <i>Juan Donnet</i> de la localidad de Esperanza. | 171 |
| Tabla VI.2. | Concentración final de rizobios viables por gramo de los inoculantes base turba estéril y sobre cada semilla de <i>D. virgatus</i> inoculada con las cepas seleccionadas. | 175 |
| Tabla VI.3. | Contenidos de proteína cruda e índice de efectividad de la inoculación con cepas de rizobios nativas e introducida CB3126 de <i>D. virgatus</i> cv Marc en condiciones de campo. | 182 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| ACP: | Análisis de Componentes Principales |
| ADN: | Acido desoxirribonucleico |
| ARN: | Acido ribonucleico |
| ATP: | Adenosin trifosfato |
| bv: | biovar |
| C: | Carbono |
| °C: | Grados Celsius |
| Ca: | Calcio |
| Cs: | Capacidad simbiótica |
| CPS: | polisacárido capsular |
| cv: | cultivar |
| dNTPs: | desoxirribonucleótidos |
| D.O.: | Densidad óptica |
| EPS: | Exopolisacárido bacteriano |
| FCA: | Facultad de Ciencias Agrarias |
| FBN: | Fijación Biológica de Nitrógeno |
| h: | hora |
| ha: | hectárea |
| IEI: | Indice de efectividad de la inoculación |
| IRN: | Indice de respuesta al nitrógeno |
| LMA: | Medio extracto de levadura-manitol |
| LPS: | Lipopolisacárido |
| M: | Molar |
| Mg: | Magnesio |
| ml: | mililitro |
| mm: | milímetro |
| mg: | miligramo |
| N: | Nitrógeno |
| P: | Fósforo |
| PC: | Proteína cruda |
| PCR: | <i>"Polymerase Chain Reaction"</i> (Reacción en cadena de la polimerasa) |
| PG: | Poder germinativo |
| PGA: | Medio peptona-glucosa-agar |
| pH: | Potencial Hidrógeno |
| ppm: | Partes por millón |
| p/v: | gramos/100 mililitros |
| TBE: | Tris-borato-EDTA |
| TE: | Tris EDTA |
| TY: | Medio triptona-extracto de levadura |
| ufc | unidades formadoras de colonias |
| UPGMA: | <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean</i> |
| UNL: | Universidad Nacional del Litoral |
| μl: | microlitro |
| % | Porcentaje |

RESUMEN

El empleo de leguminosas nativas asociadas a gramíneas constituye un recurso eficiente para mantener el suelo con buenos niveles de fertilidad nitrogenada minimizando el uso de fertilizantes químicos, generalmente costosos y de alto impacto ambiental. En este contexto, las especies de leguminosas forrajeras nativas presentan un gran potencial práctico y un ejemplo de ello es *Desmanthus virgatus* (L.) Willd. leguminosa perenne de amplia distribución en el centro norte de Argentina. Hacia el uso sustentable de esta leguminosa, en este trabajo de tesis se presenta la caracterización fenotípica, genotípica y simbiótica de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos argentinos. Para ello, se seleccionaron y colectaron 10 poblaciones de plantas de *D. virgatus* (sensu lato) en diferentes ambientes de las provincias de Santa Fe, Chaco, Santiago del Estero, Entre Ríos, Corrientes, Misiones, Jujuy y Salta. A partir de los nódulos de las plantas de campo y de los obtenidos de las poblaciones cultivadas con sus propios suelos de origen en cámaras de crecimiento se estableció una colección de más de 170 aislamientos de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* mantenidos por criopreservación como reservorio de germoplasma de las bacterias simbiotes.

La caracterización fenotípica de los simbiotes permitió reconocer rizobios de crecimiento rápido que mostraron un desarrollo óptimo en un amplio rango de pH, temperaturas entre 28 y 35°C, y en condiciones de salinidad entre 0,5% y 1% (p/v) de NaCl (85 y 171 mM). Por otro lado, se identificaron rizobios con capacidad de crecer en condiciones que se consideran adversas y que sugieren una mayor flexibilidad fisiológica y capacidad de adaptación al ambiente. Posteriormente, los perfiles de amplificación de ADN genómico (*fingerprints*) evidenciaron una marcada diversidad genética entre los aislamientos de rizobios presentes en suelos de diferentes provincias de nuestro país. En particular, el análisis filogenético de aislamientos recuperados de suelos de la provincia de Santa Fe realizado a partir de la secuenciación parcial del rDNA 16S reveló la presencia de rizobios y mesorizobios. En dichos simbiotes se observó además la presencia de al menos dos tipos bien diferenciados de genes *nodC*. Con respecto a las características simbióticas, los ensayos de inoculación de plantas realizados en cámara de crecimiento de cultivo evidenciaron que en los suelos de nuestro país se encuentran poblaciones de rizobios con una amplia variación en términos de efectividad simbiótica permitiendo seleccionar cepas con muy buena capacidad potencial de fijación biológica de nitrógeno y competencia por el nicho simbiótico. Finalmente, en la evaluación de la performance a campo de los aislamientos previamente seleccionados en condiciones de laboratorio se comprobó que las cepas de rizobios locales inoculadas en las semillas de *D. virgatus* promovieron un mejor comportamiento agronómico con importantes incrementos de biomasa vegetal y fijación de nitrógeno. Los resultados presentados enfatizan la importancia de la inoculación con cepas eficientes y adaptadas a nuestras condiciones edafoclimáticas para lograr un establecimiento exitoso y crecimiento inicial adecuado de las plántulas de *D. virgatus* en condiciones reales de campo.

ABSTRACT

The use of grass-associated native legumes is an efficient resource in order to keep good nitrogen fertility levels in the soil, minimizing the use of chemical fertilizers, which are usually expensive and of high environmental impact. In this context, the native forage legumes species have great practical potential, an example being *Desmanthus virgatus* (L.) Willd, a perennial legume widely distributed in the central northern area of Argentina. Toward sustainable use of this legume, this thesis paper includes a phenotypic, genotypic and symbiotic characterization of *D. virgatus* complex rhizobia nodulators retrieved from Argentinian soils. For that, ten populations of *D. virgatus* plants (*sensu lato*) were selected and collected from different environments in the provinces of Santa Fe, Chaco, Santiago del Estero, Entre Ríos, Corrientes, Misiones, Jujuy and Salta. A collection of over 170 isolations of *D. virgatus* complex rhizobia nodulators was generated from nodulators obtained from field plants and from populations raised in growth chambers using their own soils of origin. The rhizobia are kept by means of cryopreservation as a germplasm reservoir of the symbiotic bacteria.

The phenotypic characterization of the symbionts allowed for the recognition of rapid growth rhizobia that showed an optimum development in a wide range of pH values, temperatures ranging from 28° to 35° Celsius (82,4° to 95° Fahrenheit) and with salinity conditions between 0.5% and 1% (w/v) of NaCl (85 and 171 mM). Rhizobia were found, which showed a capacity for growth in conditions deemed adverse and which suggest a higher physiological flexibility and an ability to adapt to environmental. Afterwards, the genomic DNA amplification profiling (fingerprints) exhibited a clear genetic diversity amongst the rhizobia isolations present in the soils of different provinces in our country. In particular, the phylogenetic analysis of isolations recovered from soils of the Santa Fe province conducted on the basis of the 16S rDNA partial sequencing revealed the presence of rhizobia and mesorhizobia. In these symbionts it was also observed the presence of, at least, two very different types of *nodC* genes. Regarding the symbiotic characteristics, the inoculation trials on plants performed in growth chambers showed that, in the soils of our country, there are rhizobia populations that exhibit a wide variation in terms of symbiotic effectiveness, allowing for the selection of strains with a great potential for biological nitrogen fixation and competition for the symbiotic niche. Finally, in the field performance evaluation of the isolations previously selected in laboratory conditions, it was confirmed that strains of local rhizobia inoculated in the *D. virgatus* seeds led to an improved agronomic performance with significant increases in plant biomass and nitrogen fixation. The findings presented here emphasize the importance of using efficient strains adapted to our edaphoclimatic conditions for inoculation in order to achieve a successful establishment and a properearly growth of the *D. virgatus* seedlings in real field conditions.

Introducción General

1. Fijación biológica de nitrógeno.

El nitrógeno molecular (N_2) es el gas más abundante en la atmósfera terrestre (79%) y constituye junto al agua el principal factor limitante de la producción agrícola mundial, ello se debe a que las plantas sólo son capaces de asimilar el nitrógeno combinado, siendo necesaria una conversión previa a amonio, a nitrito o nitrato (Taiz y Zeiger, 2006). La ganancia de nitrógeno de un determinado hábitat se puede relacionar básicamente con tres procesos fundamentales:

♣ *Fijación espontánea de nitrógeno:* ocurre a partir de la actividad natural de descargas eléctricas sobre el nitrógeno atmosférico. Se estima que este proceso puede fijar alrededor de 10 millones de toneladas métricas de N_2 por año.

♣ *Fijación industrial:* realizada para la producción de fertilizantes nitrogenados, que consiste en la transformación del N_2 atmosférico en amoníaco, bajo condiciones de temperatura y presión elevada; con lo cual se introducen en el suelo aproximadamente 70 millones de toneladas de N/año (Martínez, 1992).

♣ *Fijación biológica de nitrógeno (FBN):* realizada por microorganismos procariotas que poseen la enzima nitrogenasa capaz de reducir a amonio el N_2 de la atmósfera terrestre. El influjo anual de nitrógeno a la biósfera correspondiente a la FBN es de aproximadamente 175 millones de toneladas, lo que representa más del doble del nitrógeno aportado por los fertilizantes nitrogenados.

La FBN representa más del 60% de la fijación global de nitrógeno en la tierra y los microorganismos que llevan a cabo este proceso se denominan diazótrofos (Raymond *et al.*, 2004; Lloret y Martínez-Romero, 2005). Dentro de estos microorganismos hay muchas especies que realizan la fijación de nitrógeno en vida libre, mientras que otras lo hacen a través de asociaciones simbióticas con plantas.

La eficiencia de la fijación de nitrógeno (N) es relativamente baja en el caso de los fijadores en vida libre ya que reducen el N_2 a amoníaco (NH_4^+) por medio de una reacción enzimática muy costosa energéticamente y de esta forma incorporan N inorgánico. El NH_4^+ incorporado es asequible para otros grupos bacterianos, que pueden oxidarlo a nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-). Los iones NH_4^+ , NO_2^- , y NO_3^- se combinan para formar sales muy solubles en agua y consecuentemente se distribuyen en la ecósfera en

soluciones acuosas, formando pequeños reservorios de reciclado activo. Estos compuestos son muy importantes para el crecimiento vegetal y se agotan rápidamente. Sin embargo, la fijación de N en simbiosis es mucho más eficiente ya que las bacterias fijadoras transforman por medio de la misma reacción el N_2 en NH_4^+ que es incorporado a aminoácidos y ureídos, que en este caso son cedidos a la planta, de la cual obtienen a cambio carbono (C) como nutriente y fuente de energía. La capacidad de reducir el N_2 se ha explotado en la agricultura realizando biofertilizaciones del cultivo de leguminosas con su par simbiótico como una forma de obtener nitrógeno de bajo costo y sin realizar el proceso de fertilización.

Las plantas pertenecientes a la familia Leguminosae poseen la característica distintiva de asociarse simbióticamente a bacterias denominadas genéricamente rizobios. La asociación mutualista rizobio-leguminosa ha sido la más estudiada por la importancia agronómica, económica y social que tiene el cultivo de estas plantas a escala mundial. Ambos simbiosomas son capaces de vivir independientemente, sin embargo, los dos se benefician mutuamente de la interacción que se caracteriza por la formación de nódulos fijadores de nitrógeno que, en la mayoría de las leguminosas se forman en las raíces. En especies de *Aeschynomene*, *Sesbania*, *Neptunia* y *Discolobium*, también se observan infecciones y nódulos en los tallos (Carranca, 2013, Martins *et al.*, 2015).

Los nódulos son órganos especializados que se desarrollan como resultado de un diálogo molecular entre los rizobios y las plantas (Gibson, 2008). En el interior de estos nódulos, los rizobios se diferencian a un estado llamado bacteroide. La planta aporta esqueletos carbonados para el metabolismo del bacteroide a través del floema y, por su parte, el bacteroide aporta amonio en forma de diferentes aminoácidos a la planta (Lodwig y Poole, 2003). La reducción de nitrógeno a amonio es catalizada por la enzima nitrogenasa cuya actividad se ve inhibida en presencia de oxígeno. Así, los nódulos generan el ambiente en el que los rizobios protegidos de altas tensiones de oxígeno expresan su capacidad de fijar nitrógeno. Dentro del nódulo, los bacteroides se localizan en células corticales, englobados por una membrana de origen vegetal formando el simbiosoma. El grado de diferenciación y especialización de los rizobios dentro del simbiosoma es tal que la planta debe ser la encargada de suministrarle carbono a la bacteria. El transporte de oxígeno al simbiosoma se realiza a muy bajas presiones

parciales por la leghemoglobina, una proteína de la familia de las hemoglobinas presente en las leguminosas (Appleby, 1984).

Se ha estimado que la fijación anual de N₂ es de 300 millones de toneladas métricas por año, de las cuales 45 son aportadas por la FBN relacionada al uso de biofertilizantes, principalmente al conjunto rizobios y leguminosas (Socolow, 1999). Sin embargo, como consecuencia del crecimiento de la población y la demanda mundial de alimentos, ha aumentado el N antropogénico incorporado al ciclo. El empleo elevado de fertilizantes químicos nitrogenados representa una carga medioambiental, que incluye la contaminación del aire, la lluvia ácida, contaminación del agua por nitrato, así como eutrofización y reducción de la biodiversidad (Socolow, 1999). Los costos económicos y ambientales del uso intensivo de fertilizantes químicos en la producción de los cultivos constituyen una preocupación mundial. Esto indica que la FBN por microorganismos, especialmente simbióticos, proporciona una alternativa económica, viable y ecológicamente compatible que pudiera contribuir a mitigar esta problemática de forma sustentable.

2. Plantas Leguminosas.

Leguminosae es la tercera familia más grande de las Angiospermas con distribución en diversos ecosistemas a nivel mundial, presentes en regiones tropicales, subtropicales y templadas. Las especies de la familia se extienden desde las hierbas enanas de la vegetación ártica y alpestre hasta los árboles del bosque tropical, creciendo a alturas desde el nivel del mar hasta 3000 m.s.n.m. y adaptándose a zonas áridas y semiáridas (Allen y Allen, 1981). Además, su capacidad para formar asociaciones simbióticas con rizobios fijadores de nitrógeno, les permite establecerse en suelos con escasas de este mineral (Burkart, 1952).

Leguminosae Juss. o Fabaceae Lindl. constituye una amplia e importante familia del Reino Vegetal, vasta y polimorfa (Burkart, 1952); sus 751 géneros y aproximadamente 19.500 especies (LPWG, 2013), se distribuyen en tres subfamilias: Cesalpinioideae (R.Br.) DC., Mimosoideae (R.Br.) DC. y Papilionoideae (Giseke) DC. (Lewis *et al.*, 2005).

La subfamilia Mimosoideae, de mayor incidencia en selvas y sabanas ecuatoriales y subtropicales (Burkart, 1952), incluyendo bosques xerófilos y desiertos (LPWG, 2013) con unos 82 géneros y cerca de 3275 especies representa el 16,79 % de la diversidad de la familia. En la República Argentina, esta subfamilia se halla representada por 19 géneros y 141 especies (Zuloaga y Morrone, 1999).

Las plantas leguminosas presentan una importancia particular en la alimentación humana (granos) y animal (forraje), además de ser fuente de maderas tropicales valiosas, drogas para medicina, plantas ornamentales, resinas, al igual que en el ciclo biogeoquímico del N, ya que la mineralización de sus residuos contribuye un aporte de nitrógeno disponible (Sylvester-Bradley *et al.*, 1988).

Muchas especies de leguminosas son empleadas como productoras de forraje ya que constituyen excelentes fuentes de proteína y minerales para rumiantes en pastoreo (Humphreys, 1991). En los trópicos, representan el recurso forrajero con mayor potencial para incrementar la producción animal debido a su alto contenido de proteína (15-30%) (Skerman *et al.*, 1991). Asimismo, la solubilidad y digestibilidad de sus proteínas las hacen atractivas como fuente de alimento suplementario (Humphreys, 1991).

La flora de la República Argentina es rica en leguminosas forrajeras tanto de ciclo estival como invernal (Burkart, 1952) y un ejemplo de ellas es el complejo taxonómico *Desmanthus virgatus*. Sin embargo, el desconocimiento sobre distintos aspectos de nuestras especies nativas ha sido una de las causas del escaso desarrollo que han tenido los planes para su domesticación, mejoramiento y empleo en nuestro país.

2.1. Género *Desmanthus* Willd.

El género *Desmanthus* Willdenow pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Mimosoideae. Comprende 24 especies en su mayoría herbáceas perennes y sufrútices que muestran una enorme plasticidad, cuyo origen se extiende desde el centro-norte de Estados Unidos, a través de México y Centroamérica, hasta el sur de Brasil, Argentina y Uruguay (Luckow, 1993). *Desmanthus* presenta su mayor diversidad en la región sureste de EE.UU., México y Sudamérica (Grether *et al.*, 2006; Duno de Stefano *et al.*, 2012).

Las especies de *Desmanthus* se caracterizan por ser predominantemente herbáceas, con abundantes ramificaciones que nacen de una corona basal, tallos subleñosos y raíces generalmente napiformes, leñosas. Sus hojas son compuestas, paribipinnadas, con numerosos folíolos pequeños. Las flores son pequeñas, gamopétalas, tubulosas, perfectas, blancas, dispuestas en cabezuelas axilares solitarias, subglobosas, pedunculadas. Los frutos son legumbres bivalvas, lineares, comprimidas, rectas o arqueadas, multiseminadas, negras o castañas oscuras a la madurez, secas, dehiscentes sin elasticidad. Las semillas son generalmente ovoides y con endosperma mucilaginoso. La germinación es de tipo epigea y con cotiledones foliares (Burkart, 1987; Luckow, 1993).

Desmanthus spp. posee una distribución natural en climas tropicales y templados, presentando un gran polimorfismo intra e interespecífico, que constituye un factor muy importante en la búsqueda de líneas de alta producción forrajera. Las especies son bastante plásticas y manifiestan un amplio rango de variabilidad en caracteres de altura y ramificación. El pastoreo intensivo o un ambiente desfavorable pueden conducir a formas postradas y muy ramificadas. Por otro lado, la humedad abundante y el sombreado pueden conducir a formas erectas poco ramificadas (Luckow, 1993).

Las plantas de *Desmanthus* sp. son reconocidas por su capacidad nutritiva (Jones *et al.*, 2000), productividad, resistencia a la sequía y adaptabilidad a suelos arcillosos (Cook *et al.*, 1993; Pengelly y Conway 2000).

El potencial agronómico de las especies de *Desmanthus* en relación a su adaptación al suelo y clima, producción de biomasa y calidad de forraje ha sido investigado en diferentes países (Gardiner *et al.*, 2004; McGraw *et al.*, 2004; Ocumpaugh *et al.*, 2004; Fischbach *et al.*, 2005; Boschma *et al.*, 2014). Sobre la base de estas investigaciones, se han liberado varios cultivares forrajeros de distintas especies: en Australia; *D. virgatus* (L.) Willd. cv. Marc, *D. leptophyllus* Kunth cv. Bayamo y *D. pubescens* B.L.Turner cv. Uman (Jones y Clem, 1997) y la nueva variedad Progardes™ (*D. bicornutus*, *D. leptophyllus* y *D. virgatus*) (Gardiner *et al.*, 2013); en E.E.U.U.; *D. illinoensis* Michx. cv. Sabine (Muncrief y Heizer, 1985) y *D. bicornutus* S. Watson cvv. BeeTAM-06, BeeTAM-08, BeeTAM-37 y BeeTAM-57 (Ocumpaugh *et al.*, 2004) y en el sureste de Asia; *D. pernambucanus* cv. Chaland (Horne y Stür, 1999).

De acuerdo a datos de la literatura, las especies de *Desmanthus* han demostrado su compatibilidad en la siembra con distintas gramíneas. Las asociaciones de *D. illinoensis* con los pastos clavija (*Panicum virgatum*), banderita (*Bouteloua curtipendula*) o pasto indio (*Sorghastrum nutans*) en el noreste de Kansas produjeron mayor concentración de proteína cruda y rendimiento de forraje que los monocultivos de las gramíneas (Posler *et al.*, 1993). Por otro lado, en Texas (EE.UU.) la intersiembra de *D. illinoensis* cv. Sabine en praderas de pasto klein (*Panicum coloratum* L.) presentó mayores rendimientos de forraje que los monocultivos de pasto en el segundo, tercero y cuarto año después de la siembra (Dovel *et al.*, 1990). Las asociaciones de *D. virgatus* y *D. illinoensis* con pasto klein (*P. coloratum*) incrementaron considerablemente la biomasa de forraje (González *et al.*, 2004).

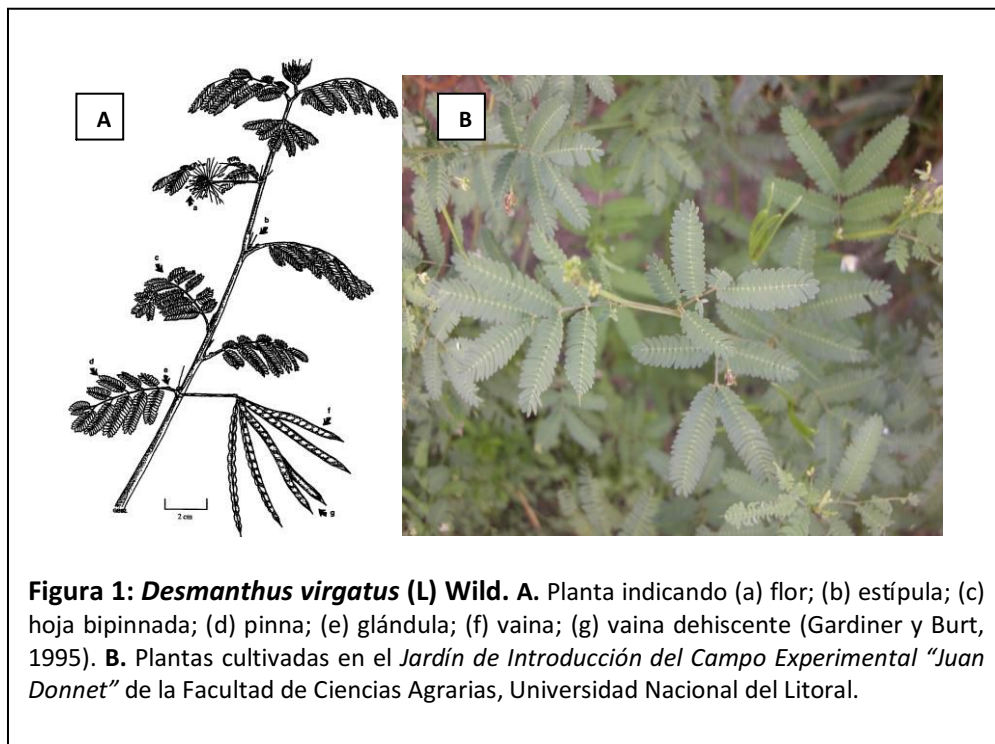
Diversos investigadores han destacado la importancia de las especies de *Desmanthus* en la producción ganadera, ya que es consumida por caprinos, bovinos y ovinos (Jones *et al.*, 2000; Ramirez *et al.*, 2001; Kanani *et al.*, 2006; Rangel y Gardiner, 2009). Similarmente existe literatura referida a los efectos de la incorporación de harina de hojas de *D. virgatus* en la dieta de aves de corral mejorando el rendimiento y la calidad de la yema de huevos de gallinas ponedoras (Buakeeree, 2002; Suksombat y Buakeeree, 2006).

2.1.1. *Desmanthus virgatus* (L.) Willd.

Desmanthus virgatus (L.) Willd. (Figura 1) es un complejo de especies altamente polimórfico, arbustos perennes de hábitos postrados a erectos de 60 a 150 cm de altura, sin espinas, raíz axonomorfa, fuerte y leñosa, hojas bipinnadas y foliolos opuestos. Presenta un número reducido de flores por cabezuela, blanquecinas con pecíolos cortos y fruto multiovulado de valvas lineares y dehiscencia en ambas suturas (Luckow, 1993). Desde un punto de vista taxonómico, las especies: *D. acuminatus*, *D. glandulosus*, *D. paspalaceus*, *D. pubescens*, *D. virgatus* y *D. tatuhyensis* integran el complejo *Desmanthus virgatus* (Luckow, 1993).

D. virgatus presenta los siguientes sinónimos; *Acacia angustisiliqua* (Lam.) Desf., *Acacia virgata* (L.) Gaertn., *Acuan depressa* (Willd.) Kuntze, *Acuan depressum* (Willd.)

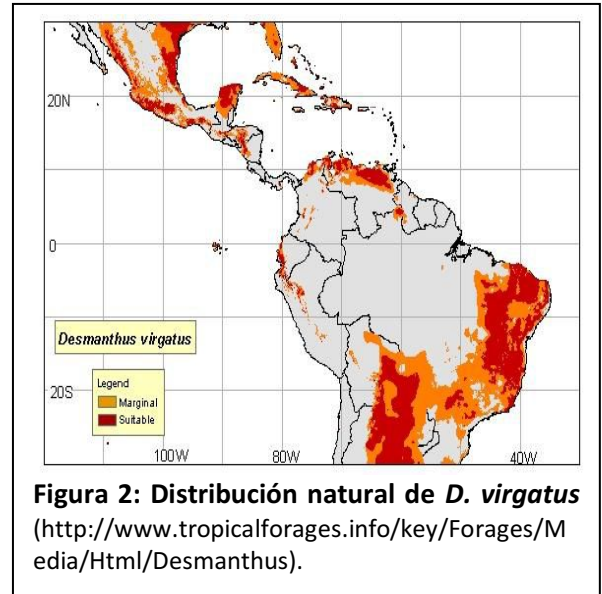
Kuntze, *Acuan texanum* Britton y Rose, *Acuan tracyi* Britton y Rose, *Acuan virgatum* (L.) Medik., *Desmanthus depressus* Willd., *Desmanthus leptophyllus* DC., *Desmanthus pernambucensis* (L.) Thell., *Desmanthus pratorum* Macfad., *Desmanthus strictus* DC., *Desmanthus tenellus* DC., *Desmanthus virgatus* (L.) Willd. var. *depressus* (Willd.) B.L.Turner, *Mimosa angustisiliqua* Lam., *Mimosa depressa* (Willd.) Poir., *Mimosa pernambucensis* L., *Mimosa virgata* L. (Sauvant et al., 2015).



Los nombres comunes de *D. virgatus* son adormidera, brusca prieta, frijolillo, tierra de Tamarindo, huizachillo (México); guashillo, huarangillo, acacia petit, petit mimosa (Francia), mimosa virgate, koa enana (Hawaii); Desmanthus o bundleflower (en inglés).

La distribución natural de *D. virgatus* se extiende desde Texas y Florida en el sur de Estados Unidos, Veracruz y Chiapas en México, Islas del Caribe y la mayoría de los países de Centroamérica hasta Argentina en América del Sur, según se muestra en la Figura 2.

D. virgatus se ha naturalizado en las zonas secas de África (Senegal, Zambia, Sudáfrica), en las Islas del Pacífico (Nueva Caledonia, Hawaii) e Indonesia (FAO, 2010). Asimismo, también fue naturalizada en muchas áreas tropicales y subtropicales (Burt, 1993) y ha sido exitosamente introducida en cultivo en regiones semiáridas y sub-húmedas de Australia (Jones y Clem, 1997).



Las plantas de *D. virgatus* muestran una gran adaptación a diferentes ambientes, pudiendo crecer bajo una amplia gama de temperaturas y condiciones de precipitaciones (250 a 2000 mm), en suelos desde arenosos a arcillosos con pH 5 a pH 7. Además se caracteriza por su resistencia a periodos prolongados de sequía y tolerancia a la competencia de plantas gramíneas, pero no resiste condiciones de sombreado (Cook *et al.*, 2005; Pengelly *et al.*, 2006).

En Argentina, el complejo *D. virgatus* (*sensu lato*) está compuesto por *D. acuminatus* Benth., *D. paspalaceus* (Lindm.) Burkart, *D. virgatus* (L.) Willd., y *D. tathuhyensis* Hoehne (Zuloaga y Morrone, 1999). Las tres primeras presentan mayor potencial forrajero debido a su foliosidad, palatabilidad, tolerancia al pastoreo y capacidad de resiembra (Clem y Hall, 1994; Jones y Brandon, 1998; Pengelly y Conway, 2000; Gardiner *et al.*, 2004). Según se muestra en la Figura 3, las especies de este complejo presentan una amplia distribución geográfica en nuestro país.

Desde el punto de vista agronómico, *D. virgatus* se destaca por tolerar suelos con baja fertilidad y anegamientos temporarios, por su alta palatabilidad y calidad del forraje. Su ciclo de producción es primavera-verano y aunque es sensible a las heladas, su corona es persistente. Además, se ha encontrado variabilidad en el hábito de crecimiento (erecto a decumbente) y en la amplitud del período productivo (Jones y Clem, 1997).

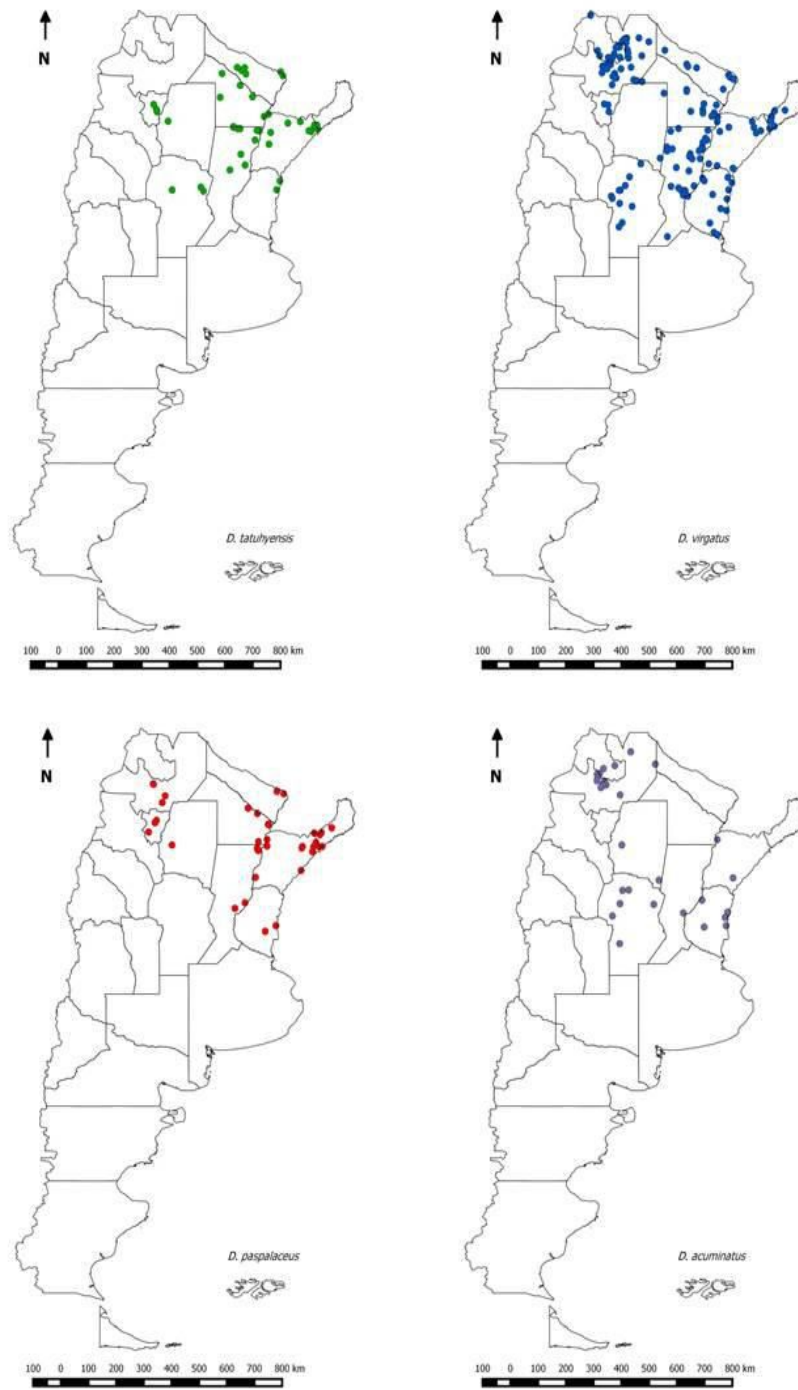


Figura 3: Distribución geográfica de las especies del complejo *D. virgatus* (*D. tatuhyensis*, *D. virgatus*, *D. paspalaceus* y *D. acuminatus*) en la República Argentina (Mainero, 2014).

Diversos investigadores han reportado la productividad, regeneración y persistencia de *D. virgatus* utilizando técnicas de corte o bajo pastoreo (Burrows y Porter, 1993; Trujillo *et al.*, 1993; Jones y Brandon, 1998). Asimismo, ensayos de rendimiento realizados en Australia y EE.UU. informaron la adaptación de *D. virgatus* a distintos suelos y ambientes (Adjei y Pitman, 1993; Gardiner y Burt, 1995; Gardiner *et al.*, 2004). Datos de la literatura muestran que el contenido de proteína cruda en hojas es 22% y el rendimiento de los pasturas aproximadamente 35 toneladas de materia seca/ha/año. A diferencia de *Leucaena*, *D. virgatus* no contiene mimosina y por lo tanto se puede utilizar en la alimentación de animales no rumiantes sin restricciones (Gutteridge y Shelton, 1994).

En nuestro país, Hack y Tomei (2002) reportaron las características agronómicas de distintas accesiones del género *Desmanthus* provenientes de las provincias de Corrientes, Chaco y Salta. Posteriormente, Zabala *et al.*, (2008) informaron la colección de germoplasma y el análisis de la diversidad morfológica de *D. virgatus*, *D. paspalaceus*, y la *D. acuminatus* procedentes del centro y norte de Argentina.

En relación a los cultivares de *Desmanthus* sp., es interesante destacar que, en Australia se desarrollaron los cvv. Marc, Bayamo y Uman, a partir de accesiones extraídas de Centro y Sur América: procedentes de Argentina, Cuba y México, respectivamente. Los tres cultivares se comercializan mezclados en proporciones iguales, disponibles en el mercado con el nombre "Jaribú" (Cook *et al.*, 1993), que permite el establecimiento de las plantas en situaciones en las cuales se desconoce información sobre el tipo de suelo, clima o manejo (Jones y Clems, 1997).

A pesar de que el cultivar compuesto Jaribu fue recomendado para su cultivo en los suelos arcillosos de Queensland (Cook *et al.*, 1993), se han reportado síntomas de clorosis, poco vigor y escasa producción de plantas, problemas atribuidos a una inadecuada nodulación (Bahnisch *et al.*, 1998). Debido a ello, en Australia se han empleado rizobios aislados de *Leucaena leucocephala* y *Neptunia plena* como inoculantes de campo (Date, 1991), con respuestas variables dependiendo del sitio de origen y de la presencia de rizobios en los suelos (Bahnisch *et al.*, 1998; Brandon *et al.*, 1998).

3. Rizobios.

3.1. Taxonomía.

Los microorganismos capaces de establecer simbiosis con leguminosas se conocen con el nombre de rizobios y engloban actualmente a una gran variedad de bacterias. El conocimiento de la existencia de estos microorganismos data de fines del siglo XIX cuando, por primera vez, en 1889 Frank denominó *Rhizobium leguminosarum* a las bacterias aisladas a partir de nódulos de leguminosas. Este nombre originó el genérico de rizobio para designar a todas las bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. No obstante, algunos autores consideran rizobios a todas aquellas bacterias capaces de nodular, mientras otros distinguen entre los verdaderos rizobios, pertenecientes a las α -Proteobacteria e incluidos en la actualidad en 5 géneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (actualmente denominado *Ensifer*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, y las bacterias no-rizobio capaces de nodular, constituidas por cepas de algunos géneros pertenecientes a la clase α Proteobacteria como *Methylobacterium*, *Devosia*, *Phyllobacterium* y *Ochrobactrum* y de otros géneros pertenecientes a la clase β -Proteobacteria (Moulin *et al.*, 2001) como *Cupriavidus* y *Burkholderia* (Tabla 1).

Los rizobios “clásicos” se incluyen actualmente en el orden *Rhizobiales* (Kuykendall, 2005) y se encuentran distribuidos en varias familias. Los géneros *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Allorhizobium* se han fusionado en un sólo y todas sus especies se incluyen en *Rhizobium* (Young *et al.*, 2001). Este género junto con *Sinorhizobium* que ha pasado a denominarse *Ensifer* y el género *Shinella* (An *et al.*, 2006) se incluyen en la familia *Rhizobiaceae*. El género *Mesorhizobium* junto con *Phyllobacterium* se han incluido en una nueva familia denominada *Phyllobacteriaceae*. El género *Azorhizobium* que forma nódulos en tallos de *Sesbania* se incluye en la familia *Xanthobacteraceae*. Finalmente, el género *Bradyrhizobium* se incluye en la familia *Bradyrhizobiaceae* (Kuykendall, 2005). En este trabajo de tesis, se utilizará el término rizobio en referencia a todos los representantes bacterianos que pueden nodular y fijar N₂ en asociación con plantas leguminosas, representando un grupo polifilético (Turner y Young, 2000).

Tabla 1. Especies de bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. A. Especies de rizobios clásicos. Las citas referidas describen a las especies y/o comprueban su capacidad de nodulación.

| Clase I. α Proteobacteria - Orden <i>Rhizobiales</i> | | |
|---|--|-------------------------------------|
| Familia <i>Rhizobiaceae</i> | | |
| Género <i>Rhizobium</i> | | |
| Especie de rizobio | Hospedador de origen | Referencia |
| <i>R. alamii</i> | <i>Medicago ruthenica</i> | Berge <i>et al.</i> , (2009) |
| <i>R. alkalisoli</i> | <i>Caragana intermedia</i> | Lu <i>et al.</i> , 2009a |
| <i>R. anhuiense</i> | <i>Vicia faba</i> , <i>Pisum sativum</i> | Zhang <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>R. azibense</i> | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Mnasri <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>R. bangladeshense</i> | <i>Lens culinaris</i> | Rashid <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>R. binae</i> | <i>L. culinaris</i> | Rashid <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>R. calliandrae</i> | <i>Calliandra grandiflora</i> | Rincón-Rosales <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>R. capsici</i> * | <i>Capsicum annuum</i> | Lin <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>R. cauense</i> | <i>Kummerowia stipulacea</i> | Liu <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>R. ecuadoreense</i> | <i>P. vulgaris</i> | Ribeiro <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>R. etli</i> | <i>Phaseolus</i> | Segovia <i>et al.</i> , 1993 |
| <i>R. etli</i> biovar <i>mimosae</i> | <i>Mimosa affinis</i> | Wang <i>et al.</i> , 1999a |
| <i>R. fabae</i> | <i>V. faba</i> | Tian <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>R. freirei</i> | <i>P. vulgaris</i> | Dall'Agnol <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>R. galegae</i> | <i>Galega orientalis</i> ; <i>Galega officinalis</i> | Lindstrom, 1989 |
| <i>R. gallicum</i> | <i>Phaseolus</i> spp. | Amarger <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>R. giardinii</i> biovar <i>phaseoli</i> , <i>giardinii</i> | <i>Phaseolus</i> spp. | Amarger <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>R. grahamii</i> | <i>Dalea leporina</i> , <i>L. leucocephala</i> | López-López <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>R. hainanense</i> | <i>Desmodium sinuatum</i> | Chen <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>R. helanshanense</i> | <i>Sphaerophysa salsula</i> | Qin <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>R. herbae</i> | <i>Varias leguminosas chinas</i> | Ren <i>et al.</i> , 2011b |
| <i>R. huautlense</i> | <i>Sesbania herbacea</i> | Wang <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>R. indigoferae</i> | <i>Indigofera</i> spp. | Wei <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>R. jaguaris</i> | <i>C. grandiflora</i> | Rincón-Rosales <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>R. laguerreae</i> | <i>V. faba</i> | Saidi <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>R. leguminosarum</i> | <i>Pisum sativum</i> | Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>R. lemnae</i> | <i>Lemna aequinoctialis</i> | Kittiwongwattana y Thawai, 2014 |
| <i>R. lentis</i> | <i>L. culinaris</i> | Rashid <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>R. leucaenae</i> | <i>L. leucocephala</i> | Ribeiro <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>R. loessense</i> | <i>Astragalus</i> spp., <i>Lespedeza</i> spp. | Wei <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>R. lupini</i> | <i>Lupinus polyphyllus</i> y <i>Lupinus luteus</i> | Eckhardt <i>et al.</i> , 1931 |
| <i>R. lusitanum</i> | <i>P. vulgaris</i> | Valverde <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>R. mayense</i> | <i>C. grandiflora</i> | Rincón-Rosales <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>R. mesoamericanum</i> | <i>P. vulgaris</i> , <i>M. púdica</i> | López-López <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>R. mesosinicum</i> | <i>Albizzia</i> , <i>Kummerowia</i> , <i>Dalbergia</i> | Lin <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>R. miluonense</i> | <i>Lespedeza</i> spp. | Gu <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>R. mongolense</i> | <i>M. ruthenica</i> | van Berkum <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>R. multihospitium</i> | <i>Leguminosas nativas de China</i> | Han <i>et al.</i> , 2008b |
| <i>R. oryzae</i> ** | <i>Oryza alta</i> | Peng <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>R. paknamense</i> | <i>Lemna aequinoctialis</i> | Kittiwongwattana y Thawai, 2013 |
| <i>R. paranaense</i> | <i>P. vulgaris</i> | Dall'Agnol <i>et al.</i> , 2014 |

Tabla 1. Especies de bacterias formadoras de nódulos en leguminosas (*continuación*).

| | | |
|--|---|---|
| <i>R. phaseoli</i> | <i>P. vulgaris</i> | Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>R. pisi</i> | <i>Pisum sativum</i> | Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>R. sophorae</i> | <i>Sophora flavescens</i> | Jiao <i>et al.</i> , 2015a |
| <i>R. sophoriradicis</i> | <i>S. flavescens</i> | Jiao <i>et al.</i> , 2015a |
| <i>R. sphaerophysae</i> | <i>Sphaerophysa salsula</i> | Xu <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>R. sullae</i> | <i>Hedysarum coronarium</i> | Squartini <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>R. taibaishanense</i> | <i>Kummerowia striata</i> | Yao <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>R. tibeticum</i> | <i>Trigonella archiducis-nicolai</i> | Hou <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>R. tropici</i> | <i>P. vulgaris</i> , <i>L. esculenta</i> , <i>L. leucocephala</i> | Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991 |
| <i>R. tubonense</i> | <i>Oxytropis glabra</i> | Zang <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>R. undicola</i> | <i>Neptunia natans</i> | de Lajudie <i>et al.</i> , 1998a; Young <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>R. vallis</i> | <i>P. vulgaris</i> , <i>M. pudica</i> , <i>Indigofera spicata</i> | Wang <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>R. vignae</i> | <i>Varias leguminosas chinas</i> | Ren <i>et al.</i> , 2011a |
| <i>R. yanglingense</i> | <i>Amphicarpaea trisperma</i> , <i>Coronilla varia</i> | Tan <i>et al.</i> , 2001 |
| Género Ensifer (Sinorhizobium) | | |
| <i>E. adhaerens</i> | <i>M. sativa</i> , <i>L. leucocephala</i> , <i>Pithecellobium</i> | Casida, 1982; Young, 2003; Willems <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>E. americanus</i> | <i>Acacia</i> spp. | Toledo <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 2013b |
| <i>E. arboris</i> | <i>A. senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i> . | Nick <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>E. chiapanecum</i> | <i>A. angustissima</i> | Rincon-Rosales <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>E. fredii</i> | <i>Glycine max</i> | Scholla y Elkan, 1984; Chen <i>et al.</i> , 1988; de Lajudie <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>E. garamanticus</i> | <i>Varias leguminosas africanas</i> | Merabet <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>E. kostiensis</i> | <i>A. senegal</i> , <i>P. chilensis</i> | Nick <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>E. kummerowiae</i> | <i>Kummerowia stipulacea</i> | Wei <i>et al.</i> , 2002; Young, 2003 |
| <i>E. medicae</i> | <i>Medicago</i> spp. anuales | Rome <i>et al.</i> , 1996; Young, 2003 |
| <i>E. meliloti</i> | <i>Medicago</i> | de Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Young, 2003 |
| <i>E. mexicanus</i> | <i>A. angustissima</i> | Llorente <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>E. morelense</i> | <i>L. leucocephala</i> | Wang <i>et al.</i> , 2002; Wang <i>et al.</i> , 2013b |
| <i>E. numidicus</i> | <i>Varias leguminosas africanas</i> | Merabet <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>E. psoraleae</i> | <i>Psorales corylifolia</i> , <i>Sesbania cannabina</i> | Wang <i>et al.</i> , 2013b |
| <i>E. sahelii</i> | <i>Acacia</i> spp. | de Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Young, 2003 |
| <i>E. sesbaniae</i> | <i>S. cannabina</i> <i>Medicago lupulina</i> | Wang <i>et al.</i> , 2013b |
| <i>E. sojae</i> | <i>G. max</i> | Li <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>E. terengae</i> | <i>Acacia</i> spp. <i>Sesbania</i> spp. | de Lajudie <i>et al.</i> , 1994; Young, 2003 |
| <i>E. xinjiangensis</i> | <i>G. max</i> | Chen <i>et al.</i> , 1988; Young, 2003 |
| Familia Phyllobacteriaceae - Género Mesorhizobium | | |
| <i>M. abyssinicae</i> | <i>A. abyssinica</i> y <i>A. tortilis</i> | Degefu <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>M. albiziae</i> | <i>Albizia kalkora</i> | Wang <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>M. alhagi</i> | <i>Alhagi sparsifolia</i> | Chen <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>M. amorphae</i> | <i>Amorpha fruticosa</i> | Wang <i>et al.</i> , 1999b |
| <i>M. australicum</i> | <i>Biserrula pelecinus</i> | Nandasena <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>M. camelthorni</i> | <i>Alhagi sparsifolia</i> | Chen <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>M. caraganae</i> | <i>Caragana</i> spp. | Guan <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>M. chacoense</i> | <i>Prosopis alba</i> | Velázquez <i>et al.</i> , 2001 |
| <i>M. ciceri</i> | <i>Cicer arietinum</i> | Nour <i>et al.</i> , 1994; Jarvis <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>M. erdmanii</i> | <i>Lotus corniculatus</i> | Martínez-Hidalgo <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>M. gobiense</i> | <i>Astragalus filicaulis</i> , <i>L. frondosus</i> , <i>L. tenuis</i> | Han <i>et al.</i> , 2008a |

Tabla 1: Especies de bacterias formadoras de nódulos en leguminosas (*continuación*).

| | | |
|--|---|---|
| <i>M. hawassense</i> | <i>S. sesban</i> | Degefu <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>M. huakuui</i> | <i>Astragalus sinicus</i> | Chen <i>et al.</i> , 1991; Jarvis <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>M. jarvisi</i> | <i>L. corniculatus</i> | Martinez-Hidalgo <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>M. loti</i> | <i>L. corniculatus</i> | Jordan, <i>et al.</i> , 1984; Jarvis <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>M. mediterraneum</i> | <i>C. arietinum</i> | Nour <i>et al.</i> , 1994; Jarvis <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>M. metallidurans</i> | <i>Anthyllis vulneraria</i> | Vidal <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>M. muleiense</i> | <i>C. arietinum</i> | Zhang <i>et al.</i> , 2012a |
| <i>M. opportunistum</i> | <i>B. pelecinus</i> | Nandasena <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>M. plurifarum</i> | <i>A. senegal</i> | de Lajudie <i>et al.</i> , 1998b |
| <i>M. qingshengii</i> | <i>A. sinicus</i> | Zheng <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>M. robiniae</i> | <i>Robinia pseudoacacia</i> | Zhou <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>M. sangaii</i> | <i>Astragalus luteolus</i> y <i>Astragalus ernestii</i> | Zhou <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>M. septentrionale</i> | <i>Astragalus adsurgens</i> | Gao <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>M. shangrilense</i> | <i>Caragana</i> spp. | Lu <i>et al.</i> , 2009b |
| <i>M. shonense</i> | <i>A. abyssinica</i> | Degefu <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>M. silamurunense</i> | <i>Astragalus</i> spp. | Zhao <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>M. tamadayense</i> | <i>Anagris latifolia</i> <i>Lotus berthelotii</i> | Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>M. tarimense</i> | <i>L. frondosus</i> , <i>L. tenuis</i> | Han <i>et al.</i> , 2008a |
| <i>M. temperatum</i> | <i>A. adsurgens</i> | Gao <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>M. thiogangeticum</i> | <i>Clitoria tematea</i> | Ghosh y Roy, 2006 |
| <i>M. tianshanense</i> | <i>Glycyrhiza pallidiflora</i> | Chen <i>et al.</i> , 1995; Jarvis <i>et al.</i> , 1997 |
| Familia Bradyrhizobiaceae - Género Bradyrhizobium | | |
| <i>B. canariense</i> | <i>Chamaecytisus proliferus</i> | Vinuesa <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>B. cytisi</i> | <i>Cytisus villosus</i> | Chahboune <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>B. daqingense</i> | <i>Glycine max</i> | Wang <i>et al.</i> , 2013a |
| <i>B. diazoefficiens</i> | <i>G. max</i> | Delamuta <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>B. denitrificans</i> | <i>Aeschynomene indica</i> | van Berkum <i>et al.</i> , 2006*** |
| <i>B. elkanii</i> | <i>G. max</i> | Kuykendall <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>B. erythrophlei</i> | <i>Erythrophleum fordii</i> | Yao <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>B. ferriligni</i> | <i>E. fordii</i> | Yao <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>B. ganzhouense</i> | <i>Acacia melanoxylon</i> | Lu <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>B. huanghuaihaiense</i> | <i>G. max</i> | Zhang <i>et al.</i> , 2012b |
| <i>B. icense</i> | <i>Phaseolus lunatus</i> | Durán <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>B. ingae</i> | <i>Inga laurina</i> | Da Silva <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>B. iriomotense</i> **** | <i>Entada koshunensis</i> | Islam <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>B. japonicum</i> | <i>G. max</i> | Jordan, 1982 |
| <i>B. jicamae</i> | <i>Pachyrhizus erosus</i> | Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>B. lablabi</i> | <i>Lablab purpureus</i> , <i>Arachis hypogaea</i> | Chang <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>B. liaoningense</i> | <i>G. max</i> | Xu <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>B. lupini</i> | <i>Lupinus</i> sp. | Peix <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>B. manausense</i> | <i>Vigna unguiculata</i> | Silva <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>B. neotropiale</i> | <i>Centrolobium paraense</i> | Zilli <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>B. oligotrophicum</i> | <i>Aeschynomene indica</i> | Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>B. ottawaense</i> | <i>G. max</i> | Yu <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>B. pachyrhizi</i> | <i>P. erosus</i> | Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>B. paxllaeri</i> | <i>P. lunatus</i> | Durán <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>B. retamae</i> | <i>Retama sphaerocarpa</i> y <i>R. monosperma</i> | Guerrouj <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>B. rifense</i> | <i>C. villosus</i> | Chahboune <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>B. yuanmingense</i> | <i>Lespedeza</i> spp. | Yao <i>et al.</i> , 2002 |

Tabla 1. Especies de bacterias formadoras de nódulos en leguminosas (continuación) B. Especies que nodulan leguminosas y no pertenecen a los rizobios clásicos.

| Clase I. α Proteobacteria. | | |
|--|---|---|
| Orden Rhizobiales | | |
| Especie de rizobio | Hospedador de origen | Referencia |
| Familia Phyllobacteriaceae - Género Phyllobacterium | | |
| <i>P. ifriqiyense</i> | <i>Astragalus algerianus Lathyrus numidicus</i> | Mantelin <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>P. leguminum</i> | <i>A. algerianus Argyrolobium uniflorum</i> | Mantelin <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>P. sophorae</i> | <i>Sophora flavescens</i> | Jiao <i>et al.</i> , 2015b |
| <i>P. trifolii</i> | <i>Trifolium pratense</i> | Valverde <i>et al.</i> , 2005 |
| Familia Xanthobacteraceae - Género Azorhizobium | | |
| <i>A. caulinodans</i> | <i>S. rostrata</i> | Dreyfus <i>et al.</i> , 1988 |
| <i>A. doebereineriae</i> | <i>S. virgata</i> | Moreira <i>et al.</i> , 2006 |
| Familia Hyphomicrobiaceae - Género Devosia | | |
| <i>D. neptuniae</i> | <i>Neptunia natans</i> | Rivas <i>et al.</i> , 2002; Rivas <i>et al.</i> , 2003 |
| <i>D. yakushimensis</i> | <i>Pueraria lobata</i> | Bautista <i>et al.</i> , 2010 |
| Familia Brucellaceae - Género Ochrobactrum | | |
| <i>O. ciceri</i> | <i>C. arietinum</i> | Imran <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>O. cytisi</i> | <i>Cytisus scoparius</i> | Zurdo-Piñeiro <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>O. lupini</i> | <i>Lupinus albus</i> | Trujillo <i>et al.</i> , 2005 |
| Familia Methylobacteriaceae - Género Methylobacterium | | |
| <i>M. nodulans</i> | <i>Crotalaria sp.</i> | Sy <i>et al.</i> , 2001, Jourand <i>et al.</i> , 2004 |
| Clase II. βProteobacteria | | |
| Orden Burkholderiales | | |
| Familia Burkholderiaceae | | |
| Género Burkholderia | | |
| <i>B. aspalathus</i> | <i>Aspalathus abietina</i> | Mavengere <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>B. caballeronis</i> | <i>P. vulgaris</i> | Martinez-Aguilar <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>B. caribensis</i> | <i>Mimosa</i> spp. | Achouak <i>et al.</i> , 1999; Vandamme <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>B. diazotrophica</i> | <i>Mimosa</i> spp. | Sheu <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>B. dilworthii</i> | <i>Lebeckia ambigua</i> | De Meyer <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>B. dolosa</i> (B. cepacea genomovar VI) | <i>Alysicarpus glumaceus</i> | Vandamme <i>et al.</i> , 2002; Vermis <i>et al.</i> , 2004 |
| <i>B. kirstenboschensis</i> | <i>Hypocalyptus coluteoides</i> , <i>H. oxalidifolius</i> , <i>H. sophoroides</i> , <i>Virgilia oroboides</i> | Steenkamp <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>B. mimosarum</i> | <i>Mimosa</i> spp. | Chen <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>B. nueva especie</i> | <i>Lebeckia ambigua</i> | Howieson <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>B. nodosa</i> | <i>Mimosa bimucronata</i> , <i>Mimosa scabrella</i> | Chen <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>B. phymatum</i> | <i>Machaerium lunatum</i> | Vandamme <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>B. rhynchosiae</i> | <i>Rhynchosia ferulifolia</i> | De Meyer <i>et al.</i> , 2013b |
| <i>B. sabiae</i> | <i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> | Chen <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>B. sprentiae</i> | <i>Lebeckia ambigua</i> | De Meyer <i>et al.</i> , 2013a |
| <i>B. symbiotica</i> | <i>Mimosa</i> spp. | Sheu <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>B. tuberum</i> | <i>Aspalathus carnosa</i> | Vandamme <i>et al.</i> , 2002 |
| Género Cupriavidus | | |
| <i>C. taiwanensis</i> | <i>Mimosa</i> spp. | Chen <i>et al.</i> , 2001; Vandamme y Coenye, 2004 |

* Fueron aisladas de tumores de las raíces de *Capsicum annum*, con capacidad de desencadenar la nodulación en *G. max*.

** Fueron aisladas de las raíces de *Oryza alta*, con capacidad de nodular *P. vulgaris* y *G. max*.

*** Estos autores no describieron esta especie, pero descubrieron que pueden formar nódulos en leguminosas y la propusieron para que se incluyera en el género *Bradyrhizobium*.

**** Aisladas de malformaciones parecidas a tumores de las raíces de *Entada koshunensis*, con capacidad de nodular *M. atropurpureum*.

3.2 Hábitat y estilos de vida.

Los rizobios pueden permanecer en vida libre durante largos periodos en el suelo, aún en ausencia de leguminosas (Lindstrom *et al.*, 1990), como bacterias saprófitas del suelo, donde consumen diversas fuentes de C pero no son capaces de fijar N₂. Sin embargo, la vida saprofítica puede incluir dos estados. En uno de ellos, denominado estado planctónico los rizobios pueden moverse por medio de flagelos, que de acuerdo a la especie, varían en número, composición y localización en la superficie celular. Los flagelos bacterianos son activados por los sistemas quimiotácticos capaces de sensor nutrientes y peligros del medio ambiente. Alternativamente a este estado, pueden formar biopelículas (*biofilms*), donde tampoco son capaces de fijar N₂ y adquieren una organización que les ofrece protección ante sustancias tóxicas, radiaciones ultravioletas, desecación y otros peligros. Su formación comienza con la adhesión reversible a la superficie, siendo aún capaces de retornar al estado planctónico. Posteriormente, las células pierden el flagelo y comienzan a secretar sustancias poliméricas que ayudarán a la adhesión firme de las bacterias y a la formación de la estructura típica de las biopelículas. En su arquitectura se observan canales por los que circulan agua y nutrientes. Una vez que estas estructuras maduran, y de acuerdo a señales como por ejemplo la escasez de nutrientes, las células pueden retornar al estado planctónico, desprendiéndose de la matriz y expresando nuevamente el flagelo. Este desprendimiento permite a los rizobios colonizar nuevos hábitats, ya sea la rizósfera de una raíz en crecimiento u otra superficie en la que se encuentren nutrientes disponibles. Este estilo de vida comunitario puede establecerse incluso entre diferentes especies bacterianas y se encuentra estrechamente relacionado a la densidad celular a través de un mecanismo de *Quorum Sensing*. La formación de biopelículas en los rizobios se ha descrito para especies como *S. meliloti*, *R. leguminosarum*, *R. etli*, *M. huakii*, *M. tianshanense*, *B. elkanii* y *B. japonicum* (Fujishige *et al.*, 2006; Sanchez-Contreras *et al.*, 2007; Perez-Gimenez *et al.*, 2009; Rinaudi y Giordano, 2010).

Finalmente, los rizobios presentan otra forma de vida como simbioses dentro de su leguminosa hospedadora. Esta simbiosis es altamente específica en algunos casos y requiere un intercambio de señales moleculares entre ambos simbioses. Los rizobios sufren una importante diferenciación a un nuevo estadio denominado bacteroide,

adquieren formas irregulares, inmóviles, fijan N_2 y sólo pueden utilizar ácidos dicarboxílicos como fuentes de carbono. Se produce una transferencia de C desde la planta al rizobio diferenciado, donde es oxidado para producir la energía requerida para la fijación del N_2 (Prell y Poole, 2006). A continuación, se presenta una breve reseña de los procesos que ocurren en la simbiosis rizobio-leguminosa.

4. Simbiosis rizobio- leguminosa.

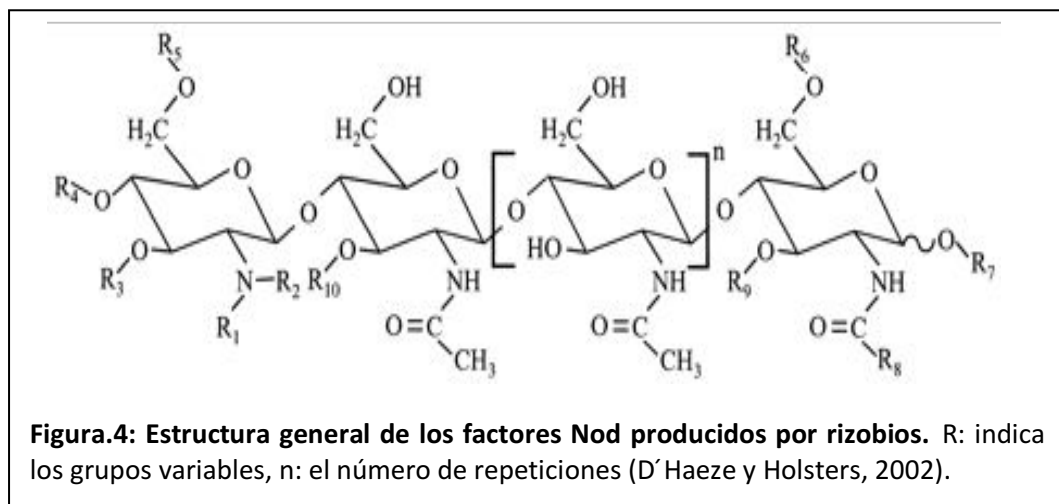
4.1. Reconocimiento de los simbiosis: Intercambio de señales entre el rizobio y la leguminosa.

La rizósfera se puede definir como la porción de suelo asociada inmediatamente a las raíces de plantas. Posee propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a las del resto del suelo, que hacen de ella un ambiente particularmente adecuado para el crecimiento de microorganismos. Las raíces de las plantas exudan diferentes compuestos orgánicos a la rizósfera como carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos y derivados fenólicos, los cuales son consumidos por diversos microorganismos (Bowen y Rovira, 1999).

Las leguminosas atraen a los rizobios simbiosis principalmente a través del exudado de compuestos fenólicos del tipo flavonoides (derivados de 2-fenil-1,4-benzopirona), que son producidos como resultado del metabolismo secundario de la planta. Los flavonoides son la primera señal que reciben los rizobios de su leguminosa hospedera, estimulando su migración hacia la superficie radical. Estudios previos han demostrado que estos compuestos juegan un rol multifuncional en la comunicación planta-microorganismo y planta-planta a nivel de rizósfera (Downie, 1994; Spaink, 2000). Cada leguminosa exuda un conjunto característico de flavonoides que activan específicamente a los genes de nodulación (genes *nod*) del rizobio simbiótico (Perret *et al.*, 2000). En primera instancia, los flavonoides interactúan con las proteínas citoplasmáticas NodD, factores de transcripción que estimulan la expresión de genes que codifican proteínas necesarias para

la síntesis de una molécula rizobiana denominada factor Nod que actuará como señal sobre la planta.

El factor Nod o lipoquitooligosacárido tiene un esqueleto de β -1,4-*N*-acetil-D-glucosamina y presenta de tres a cinco monómeros. En el grupo amino correspondiente al azúcar del extremo no reductor se une una marcada variedad de ácidos grasos formando uniones amida, los cuales dependiendo de cada factor Nod tendrán diferente grado de saturación. Sobre esa estructura básica (ver Figura 4) y dependiendo de la especie de rizobio, se encuentran modificaciones o sustituciones muy variadas tanto en el extremo reductor como en el no reductor (Perret *et al.*, 2000). Los genes esenciales para formar el esqueleto del factor Nod se encuentran en el operón *nodABC*, mientras que otros genes como *noe* y *nol* se encuentran en distintos operones y codifican para las enzimas que sintetizan las sustituciones que conferirán la especificidad con el hospedador. Estos sustituyentes pueden ser fucosas, sulfatos, acetilos, metilos y otros. En paralelo, se introducen diferencias en las cadenas de ácidos grasos del extremo no reductor (Perret *et al.*, 2000). Muchas especies bacterianas expresan más de un factor Nod y por ello es difícil predecir el huésped únicamente con este dato.



Moron *et al.*, (2005) demostraron que *Rhizobium tropici* CIAT899 expresa 52 tipos de factor Nod en condiciones ácidas, comparados con 29 en condiciones neutras, habiendo únicamente 15 estructuras comunes entre ambas. Asimismo, existen especies como *R. etli* y *M. loti* que expresan el mismo factor Nod y, sin embargo, nodulan distintos hospedadores, *Phaseolus* spp. y *Lotus* spp., respectivamente. Del mismo modo, se ha

observado que dos especies que expresan diferentes lipoquitooligosacáridos pueden nodular la misma planta hospedadora, por ejemplo, *R. tropici* (sustituído con un grupo sulfato) y *R. etli* (sustituído con una acetilfucosa) nodulan *P. vulgaris* (Perret *et al.*, 2000). Más recientemente se ha demostrado que en dos cepas de *Bradyrhizobium* sp. capaces de realizar fotosíntesis (BTAi1 y ORS278) los genes centrales *nodABC* y por ende los factores Nod, no son necesarios para establecer la simbiosis (Giraud *et al.*, 2007). Como se puede apreciar, la especificidad de este diálogo molecular no es tan estrecha como se consideró en un principio (Bauer *et al.*, 1994; Dénarié *et al.*, 1996).

Asimismo, existen otros conjuntos de moléculas que también ayudan a esta interacción y son expresadas tanto por la planta como por la bacteria. Entre las expresadas por la planta se encuentran: betaínas, xantonas, compuestos fenólicos, lectinas y jasmonatos. Entre las expresadas por el rizobio pueden encontrarse proteínas secretadas por los sistemas de transporte tipo I y tipo III, polisacáridos de superficie implicados en el reconocimiento con lectinas vegetales y moléculas relacionadas al *Quorum Sensing* (Cooper, 2007).

Este intercambio de señales ocurre en la rizósfera, donde las concentraciones de los metabolitos (del orden de nano o picomolar) y el transporte de los mismos dependen de factores ambientales. La distancia que deban recorrer los flavonoides hasta ser percibidos por los rizobios cumplirá un rol determinante en el establecimiento de la simbiosis. En principio, los sistemas de quimiotaxis y movilidad serán los encargados de mediar este tipo de respuestas, siempre subordinados a las condiciones del ambiente. En el caso de rizobios de crecimiento rápido, como *S. meliloti*, *R. leguminosarum bv phaseoli* se ha observado, *in vitro*, una correlación entre la quimiotaxis hacia flavonoides y la expresión de los genes *nod* (Aguilar *et al.*, 1988). No obstante, en *B. japonicum*, rizobio de crecimiento lento, no se ha observado quimiotaxis positiva hacia genisteína y diadzeína, dos isoflavonas que son capaces de estimular la expresión de los genes de nodulación secretadas por las raíces y semillas de soja (Barbour *et al.*, 1991). Por el contrario, se ha observado un efecto positivo de la quimiotaxis hacia ácidos orgánicos, ácidos hidroxiaromáticos y aminoácidos como aspartato y glutamato, compuestos presentes en los exudados radicales (Barbour *et al.*, 1991; Cooper, 2007). En la década de 1980 se realizaron muchos trabajos relacionando la quimiotaxis de los rizobios con su capacidad

de infectar leguminosas, sin embargo, los experimentos no se llevaron a cabo en medio natural sino en soluciones acuosas. Por ello no se puede hacer una interpretación lineal de los resultados para dilucidar el verdadero rol de la quimiotaxis y la movilidad en la infección.

Las leguminosas expresan receptores de transmembrana específicos de factores Nod, o *NFPs* (*Nod Factor Perception*) y de esta manera son capaces de reconocerlos aún a concentraciones del orden de picomolar. Estos receptores presentan dominios extracelulares capaces de reconocer glucanos como la N-acetilglucosamina, un dominio transmembrana y un dominio quinasa citosólico (Mulder *et al.*, 2006). Se han caracterizado algunas de estas proteínas, por ejemplo en *Medicago truncatula* (Amor *et al.*, 2003; Smit *et al.*, 2007), en *Lotus japonicus* (Madsen *et al.*, 2003) y en *Pisum sativum* (Walker *et al.*, 2000).

Finalmente, se ha descrito que en la planta se genera una cascada de señalización que induce múltiples respuestas necesarias para la infección como: la deformación del pelo radical, la despolarización de la membrana, las oscilaciones de calcio intracelular, la reactivación de la división celular en las células corticales, y la activación de la transcripción de genes necesarios para la infección (Jones *et al.*, 2007).

4.2. Colonización y adhesión de los rizobios a las raíces.

Los rizobios en vida libre pueden permanecer durante largos periodos en el suelo, aún en ausencia de leguminosas. Dado que estas bacterias no son capaces de esporular, es posible que su permanencia en el suelo dependa de la presencia de nichos favorables a los que puedan colonizar. Cuando las raíces de las plantas penetran en el suelo se producen cambios importantes en la composición química de la solución del suelo debido a que exudan una variedad de aminoácidos, proteínas, azúcares, carbohidratos complejos, flavonoides, alcoholes, vitaminas, hormonas y ácidos orgánicos. Este ambiente enriquecido en nutrientes puede promover el crecimiento de las poblaciones rizobianas del suelo y su movilización hacia las raíces a merced de la quimiotaxis positiva que presentan hacia muchos de estos compuestos, en forma inespecífica (Gaworzewska y

Carlile, 1982) o en forma selectiva ante la presencia de ciertos flavonoides liberados por su hospedante simbiótico (Caetano Anollés *et al.*, 1988). Además, las propias raíces en su proceso de desarrollo pueden encontrar rizobios libres. El resultado de todos estos procesos es la colonización de la rizósfera, que está sujeta a influencias físicas y biológicas de las propias raíces. Inmediata a la superficie radical existe una capa mucilaginosa (mucigel) de unos 0,5 a 8 μm de espesor (Greaves y Darbyshire, 1972), que se continua en la rizósfera. La superficie misma de la raíz por debajo del mucigel, denominada rizoplano y las zonas subcorticales de la raíz (endorizósfera) también pueden ser colonizadas por las bacterias. De ese modo, la colonización de la rizósfera, el mucigel, el rizoplano y la endorizósfera permiten el rápido crecimiento de las poblaciones bacterianas.

Las lectinas vegetales son proteínas que tienen al menos un dominio no catalítico de unión a un mono u oligosacárido y se encuentran en altas cantidades en las semillas y en también en hojas, tallos y raíces. Estas pueden servir como receptores de polisacáridos de superficie del rizobio (Hirsch, 1999). Además las lectinas están implicadas en parte en la especificidad simbiótica, por ejemplo, la expresión de la lectina de soja en *Lotus corniculatus* transgénico, permitió que la planta sea nodulada por *B. japonicum* (van Rhijn *et al.*, 1998). Entre las proteínas de la bacteria que median la interacción han sido estudiadas la ricadesina de *R. leguminosarum* *bv. viciae* (Smit *et al.*, 1989), la RapA1 de *R. leguminosarum* *bv. trifolii* (Ausmees *et al.*, 2001; Mongiardini *et al.*, 2008).

En términos generales, se ha descrito el proceso de adhesión de los rizobios a las raíces de las leguminosas en dos etapas. En una primera etapa ocurre una adhesión débil y reversible, donde las lectinas de leguminosas pueden reconocer un carbohidrato de superficie del rizobio y también proteínas como la ricadesina y la RapA1 estarían implicadas en la unión. En una segunda etapa intervienen fibras de celulosa bacteriana, ya sea producida antes o después de la adhesión de las bacterias. Estas fibrillas causarían una unión irreversible y la formación de agregados bacterianos en la superficie del hospedador (Ausmees *et al.*, 1999; Laus *et al.*, 2005).

Por otra parte, sumado a las características intrínsecas de cada individuo, los procesos de adhesión bacteriana a las raíces dependen también de variables como la densidad del inóculo, el pH, las condiciones de la incubación y la fase de crecimiento de la bacteria (Albareda *et al.*, 2006).

4.3. La infección.

A continuación de la adsorción firme y la colonización rizosférica, tiene lugar la infección de los pelos radicales. Cuando los rizobios infectan las raíces ocurren una serie de cambios morfológicos característicos: los pelos se deforman, a veces se ramifican y presentan un punto refringente en su extremo apical. Entre estas deformaciones es particularmente importante el enrollado (*curling*) que consiste en un encurvamiento del pelo, como consecuencia de la elongación desigual de uno y otro lado del pelo en crecimiento apical (Miller *et al.*, 2000; Esseling *et al.*, 2003). Es posible que los factores Nod, al ser reguladores del crecimiento (Oldroyd, 2007), retrasen la elongación en uno de los lados del pelo y las bacterias quedan atrapadas en una especie de bolsillo. Allí, por medio de una actividad celulásica son capaces de degradar la pared celular e ingresar generando luego una invaginación de la membrana (Robledo *et al.*, 2008). Esta invaginación crece en dirección opuesta a la dirección de crecimiento que presentaba el pelo al momento de la infección. El interior de este canal se denomina hilo de infección (ver Figura 5) y es ocupado por un solo clon de bacterias o, a lo sumo dos. Este espacio es equivalente al medio extracelular, ya que se ha demostrado que posee proteínas pertenecientes a la matriz extracelular (Rathbun *et al.*, 2002). En la punta del hilo de infección los rizobios se dividen activamente y el mismo progresa hacia el interior de la raíz hasta alcanzar la zona subcortical, donde se está desarrollando el primordio del nódulo. El pasaje del hilo de infección de una célula a otra implica degradación local de la pared celular, fusión de ésta con el hilo de infección e iniciación de una nueva invaginación que permite el crecimiento del mismo (Gage, 2004).

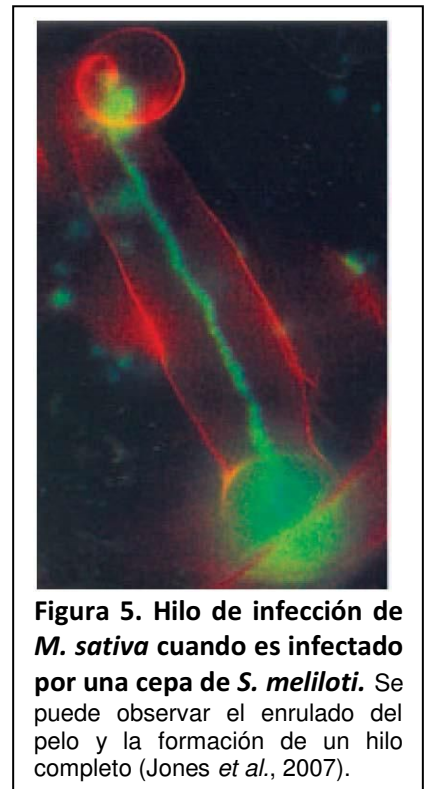


Figura 5. Hilo de infección de *M. sativa* cuando es infectado por una cepa de *S. meliloti*. Se puede observar el enrollado del pelo y la formación de un hilo completo (Jones *et al.*, 2007).

Otra forma de invasión del huésped es la generada por *Azorhizobium caulinodans* en *Sesbania rostrata* y por *Bradyrhizobium* sp. en *Arachis hipogea*. En este proceso no se desarrolla un hilo de infección sino que los rizobios penetran por roturas (*crack entry*)

que generalmente ocurren en las axilas de raíces secundarias emergentes y se dispersan luego por los espacios intercelulares hasta llegar al primordio de nódulo (Goormachtig *et al.*, 2004).

En relación a la eficiencia de las infecciones que se inician, puede verse que no todos los hilos de infección terminan en la formación de nódulos. Se observa comúnmente un gran número de hilos de infección abortivos. Este tipo de regulación ha sido estudiada en detalle en soja (Caetano Anollés y Gresshoff, 1990) y en alfalfa (Caetano Anollés y Bauer, 1988). A través de un mecanismo sistémico la planta controla el número de nódulos totales que se desarrollan en la raíz. Es posible que mediante esta regulación, la planta nivele sus demandas de nitrógeno fijado con su capacidad de aportar fotosintatos para el funcionamiento de los nódulos (Caetano Anollés y Gresshoff, 1991). Es interesante notar que la obtención de nitrógeno como NO_3^- posee un costo energético menor para la planta que la fijación simbiótica de nitrógeno, y que en presencia de NO_3^- la nodulación se ve inhibida en una forma que también está controlada por la planta en forma sistémica con una participación importante de la parte aérea (Streeter, 1988). Así, la regulación de la nodulación por parte de la planta opera tanto a nivel de reconocimiento de la presencia de fuentes de nitrógeno fijado (lo que inhibe la nodulación) como a nivel del número de infecciones exitosas permitidas (si no dispone de nitrógeno fijado), con objeto de ajustar sus necesidades biosintéticas a sus disponibilidades energéticas.

El factor Nod sería necesario durante todo el proceso de infección e incluso para una correcta invasión del nódulo (Gage, 2004; Jones *et al.*, 2007). El inicio y crecimiento de los hilos de infección es un proceso complejo caracterizado por la participación de señales del rizobio y requerimientos de ciertas estructuras superficiales de la bacteria cuya ausencia resulta en el aborto o ausencia de las infecciones. De este modo, ciertos componentes superficiales de la bacteria parecen tener un rol en la modulación de la infección. Entre estos componentes se encuentran los polisacáridos capsulares (CPS), exopolisacáridos (EPS) y lipopolisacáridos (LPS) componentes de la membrana externa de las bacterias gran negativas. En la simbiosis rizobio-alfalfa, el exopolisacárido de *S. meliloti* está involucrado en disparar la regulación de la nodulación por retroinhibición (Caetano Anollés *et al.*, 1990). En trébol, Dazzo *et al.*, (1991) describieron que el LPS de *R. leguminosarum* *bv. trifolii* modula el crecimiento del hilo de infección. Lagares *et al.*,

(1992) aislaron un mutante de *S. meliloti* con el LPS alterado que mostraba un retardo en la formación de nódulos y muy reducida capacidad competitiva frente al parental del tipo silvestre.

La población clonal del hilo de infección se descarga en las células corticales, donde ya se ha inducido la formación del primordio de nódulo (Oldroyd y Downie, 2008). El número de hilos de infección que se inician es mucho mayor que la cantidad de nódulos que finalmente se formarán, como se mencionó anteriormente. Este hecho vislumbra la existencia de un mecanismo de defensa de la planta para evitar una infección ilimitada. Las plantas tienen una primera línea de defensa que consiste en un sistema de reconocimiento de elicitores de patógenos. Se han encontrado semejanzas interesantes entre estas respuestas ante patógenos y en la percepción del factor Nod. Los factores Nod son capaces de controlar la concentración de especies reactivas del oxígeno (ROS), se cree que con el fin de permitir la formación del hilo de infección (Santos *et al.*, 2001). Estas especies ayudarían a la remodelación de la pared celular. Si hay un desbalance en los niveles de ROS, particularmente un exceso, se abortará la infección de ese hilo, aunque la vía de señalización por medio de la cual esto ocurre se desconoce (Jones *et al.*, 2007). Se sabe que mutantes de *S. meliloti* en algunas de las tres catalasas que tiene la bacteria o en una de las dos superóxido dismutasas, son sensibles a ROS pero no son defectivas en simbiosis (Jones *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha observado que el ácido jasmónico y el etileno, implicados en las respuestas de defensa de las plantas ante patógenos, también estarían involucrados en la nodulación. Ambos modulan las oscilaciones de calcio en las células de la raíz generadas en respuesta al factor Nod. Las vías de señalización de ambos compuestos estarían relacionadas aunque se desconoce a qué nivel (Sun *et al.*, 2006). Un ejemplo llamativo de estas regulaciones se observa en el caso del par simbiótico *S. rostrata* y *A. caulinodans*. En este sistema, la infección puede ocurrir vía *crack entry* en condiciones de inundación, donde el gas etileno se disuelve en el agua y es necesario para la infección; mientras que también puede suceder la infección vía hilo de infección en condiciones de capacidad de campo y, en este caso, el etileno es inhibidor de la nodulación (Oldroyd y Downie, 2008).

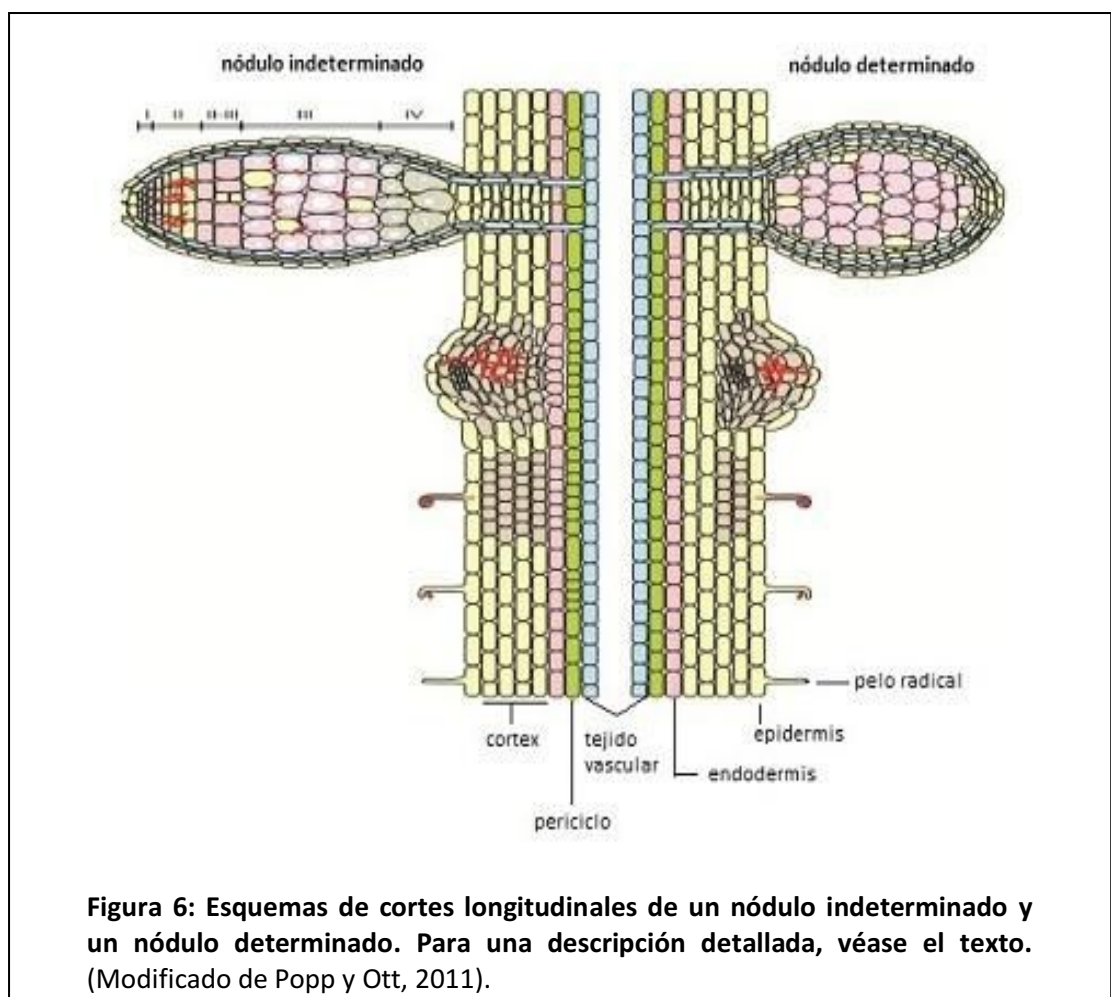
Al describir el proceso de infección se puede apreciar que existe una delgada línea que separa el mutualismo de la patogénesis. Como se ha mencionado, las leguminosas

expresan una respuesta de defensa local, lo cual sugiere que el rizobio en su entrada es percibido como un patógeno. No obstante, el factor Nod logra controlar respuestas más avanzadas de la planta, de modo tal que durante el desarrollo del nódulo, los genes asociados a la inmunidad se encuentran reprimidos (Brechenmacher *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 2008).

4.4. Organogénesis del nódulo.

El primordio del nódulo se induce por la acción del factor Nod que en un principio se pone en contacto con la epidermis de la raíz (Oldroyd y Downie, 2008). Este evento ocurre en paralelo a la formación del hilo de infección. Una vez inducido, en el primordio continúan las divisiones mitóticas de las células corticales, que sufren un proceso de dediferenciación, conduciendo a la formación de un meristema cuya función será generar el tejido en crecimiento del nódulo. De acuerdo al programa genético de la leguminosa, se pueden formar dos tipos de nódulos con distinta morfología. Los nódulos determinados tienen forma redondeada debido a que presentan un meristema apical periférico que no es permanente. En estos nódulos las células infectadas más jóvenes están inmediatamente por debajo del tejido periférico, los simbiosomas (bacteroides rodeados por membrana vegetal) funcionales se encuentran en una capa intermedia, mientras que los simbiosomas senescentes se hallan en la zona central. Los nódulos indeterminados son alargados debido a que las células del cortex interno generan un meristema apical persistente. En estos nódulos se distinguen zonas transversales, llamadas zona I o del meristema libre de bacterias, zona II o zona donde penetran los hilos de infección y los bacteroides se dividen y diferencian, una interzona II-III, zona III o zona de simbiosomas fijadores de N₂ y zona IV donde se encuentran bacteroides en senescencia (ver Figura 6.). Estas zonas se suceden desde el ápice del nódulo hacia la base. En ambos tipos nodulares, los rizobios que provienen del hilo de infección son endocitados en el citoplasma de las células del primordio, quedando envueltos en la membrana de origen vegetal denominada Membrana Peribacteroidal (MPB) y dando origen al simbiosoma.

En la infección de los nódulos indeterminados los rizobios se dividen algunas veces después de ser rodeados por la MPB, con lo cual es común la presencia de más de un bacteroide por simbiosoma. En las infecciones que resultan en nódulos determinados, no habría división de las bacterias una vez envueltas por la MPB, sin embargo, se observan simbiosomas con más de un bacteroide que pueden provenir de fusiones de simbiosomas. La MPB tiene proteínas tanto vegetales como bacterianas, que le confieren características particulares y permite delimitar un espacio donde ocurrirá la diferenciación a bacteroide y la fijación del N_2 (Gage, 2004).



En cuanto a los exopolisacáridos (EPS) de rizobios y su relación con el tipo nodular, se ha establecido que son estrictamente necesarios para la nodulación en aquellas leguminosas que forman nódulos indeterminados (Frayse *et al.*, 2003).

Las especies que forman nódulos determinados son en general de climas tropicales, siendo las más conocidas *Glycine max* (soja) y *Phaseolus vulgaris* (poroto) o subtropicales como *Lotus japonicus*. Dentro de las especies que forman nódulos indeterminados, las más conocidas son *Trifolium sp.* (trébol), *M. sativa* (alfalfa) y *P. sativum* (arveja). En la Figura 7. se muestra, a modo de resumen, un esquema general del establecimiento de la simbiosis.

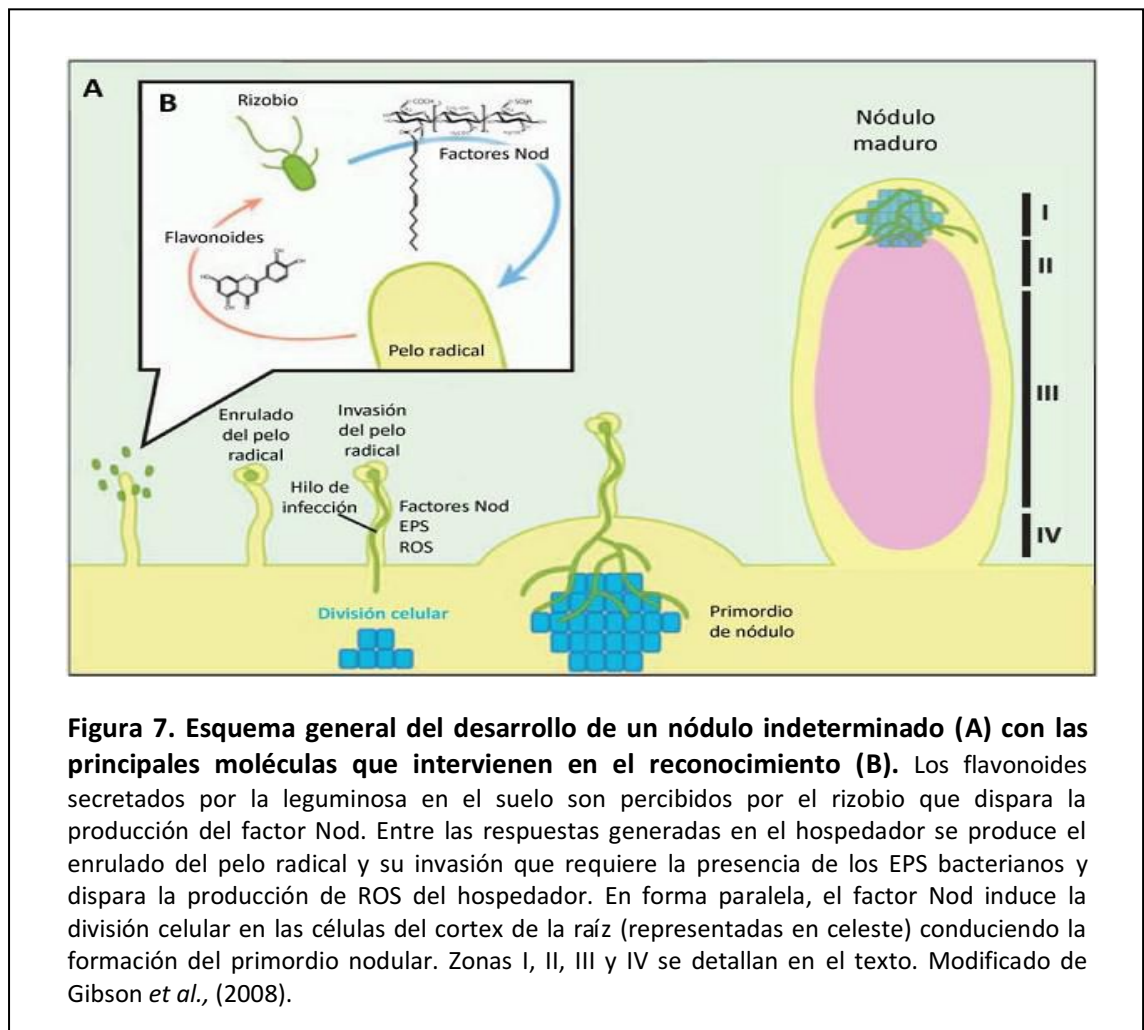


Figura 7. Esquema general del desarrollo de un nódulo indeterminado (A) con las principales moléculas que intervienen en el reconocimiento (B). Los flavonoides secretados por la leguminosa en el suelo son percibidos por el rizobio que dispara la producción del factor Nod. Entre las respuestas generadas en el hospedador se produce el enrollado del pelo radical y su invasión que requiere la presencia de los EPS bacterianos y dispara la producción de ROS del hospedador. En forma paralela, el factor Nod induce la división celular en las células del cortex de la raíz (representadas en celeste) conduciendo la formación del primordio nodular. Zonas I, II, III y IV se detallan en el texto. Modificado de Gibson *et al.*, (2008).

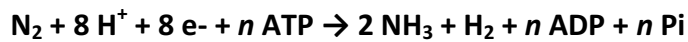
4.5. Diferenciación y fijación de nitrógeno.

Los rizobios en el simbiosoma sufren una diferenciación hacia un nuevo estadio denominado bacteroide. Esto se logra debido a un cambio substancial en su metabolismo y cuyas características más sobresalientes son: el aumento de tamaño de la célula (hasta 10 veces), la ausencia de flagelos, la incapacidad de duplicarse, el cambio en el metabolismo de fuentes de C y la expresión de la enzima nitrogenasa. Para alcanzar este nuevo fenotipo debe haber un importante cambio en la expresión de los genes bacterianos. Estudios de transcriptómica mostraron un aumento en la expresión de genes relacionados tanto al intercambio de compuestos carbonados y de amonio, como a su metabolismo; de genes implicados en las vías de síntesis de vitaminas y en procesos relacionados al estrés, tales como proteínas del shock térmico, chaperoninas, y otras (Djordjevic, 2004). Contrariamente, se observó la represión de genes relacionados al metabolismo del ADN, del ARN y de la traducción, así como genes de la biosíntesis de purinas, genes involucrados en la progresión del ciclo celular y genes de movilidad y quimiotaxis (Becker *et al.*, 2004; Pessi *et al.*, 2007).

Los bacteroides utilizan como única fuente de C los ácidos malato y succinato cedidos por la planta. A cambio de ello, ofrecen a la leguminosa el amonio que obtienen por medio de la enzima nitrogenasa. Este metabolismo constituye el eje central de la simbiosis rizobio-leguminosa. La nitrogenasa confiere a los diazótrofos la capacidad de reducir el N_2 a NH_4^+ . Esta enzima es un complejo multienzimático, compuesto por dos metaloproteínas, una con un centro hierro-azufre y molibdeno (Mo), y la otra, con un centro de hierro (Fe). El oxígeno es capaz de inhibir la enzima, al desnaturalizar irreversiblemente a su cofactor Mo-Fe (Shah y Brill, 1977). Sin embargo, por medio de un sistema de dos componentes, los rizobios son capaces de sensor los niveles de este gas y responder a ellos. Este sistema está compuesto por las proteínas FixLJ, donde FixL es un sensor ubicado en la membrana del bacteroide que se activa cuando el nivel de oxígeno disminuye lo suficiente y entonces transfiere la señal a FixJ. FixJ activa a su vez la expresión de *nifA* y *nifK*, encargadas de regular positivamente la expresión de los genes de la nitrogenasa y de las enzimas encargadas de la biosíntesis de nuevos citocromos, respectivamente. En algunos casos, *nifA* es capaz de sensor directamente al oxígeno

(Fischer, 1994). Una vez sintetizados todos los componentes del complejo de la nitrogenasa, esta enzima cataliza la transformación de una molécula de N_2 a NH_4^+ por medio de reacciones de óxido-reducción y la energía aportada por el ATP.

La ecuación completa de la reacción es:



El H_2 se genera como subproducto de la reacción en la reducción del N_2 . El ATP consumido por cada N_2 transformado es de 16 moléculas o más dependiendo del flujo de protones (Halbleib y Ludden, 2000). Debido a la baja tensión de oxígeno necesaria para que dicha reacción sea viable, el nódulo es un ambiente reductor generado por la protección de una capa celular exterior que lo envuelve, formando una barrera de protección a la difusión del oxígeno desde la atmósfera del suelo.

Además, la planta suministra al nódulo una proteína llamada leghemoglobina, capaz de unir y transportar oxígeno con gran afinidad, lo que resulta en concentraciones de oxígeno extremadamente bajas en el nódulo. Sus niveles y regulación en el nódulo son muy estrictos, pues se establece un compromiso entre la baja concentración de O_2 , imperiosa para el funcionamiento de la nitrogenasa, y la necesidad de aquél como aceptor final de electrones en la fosforilación oxidativa, la cual proveerá el ATP necesario para la fijación de N_2 (Jones *et al.*, 2007). El problema de la difusión de O_2 también ha requerido la evolución de una citocromo oxidasa de alta afinidad por el oxígeno, la que se expresa exclusivamente en el bacteroide (Preisig *et al.*, 1996).

El intercambio de señales solubles entre los simbioses forma parte de un proceso complejo por el cual se producen modificaciones funcionales muy tempranas en la bacteria y en la planta. Los rizobios se unen a la planta en un proceso conocido como adsorción. Dicho proceso es el paso previo a la infección de las raíces. Históricamente en esta etapa ha sido donde primero se ha investigado la posible evidencia de la especificidad que refleja el comportamiento global de la asociación.

5. Factores ambientales que inciden sobre el establecimiento de las asociaciones simbióticas rizobio-leguminosa.

La nodulación y FBN requerirán que la planta huésped y los microsimbiontes sean compatibles, y también que el medio ambiente del suelo sea apropiado para el intercambio de señales que precederá al proceso de infección. Como se ha descrito en las secciones anteriores, el establecimiento de una simbiosis efectiva requiere de una colonización y supervivencia del rizobio en el suelo, así como competencia saprofítica con otros microorganismos, una adecuada colonización de la rizósfera antes de la infección radical y compatibilidad genética entre el huésped y la bacteria para establecer un nódulo efectivo, y un ambiente favorable que permita el intercambio de señales, la infección y la fijación de N₂ en los nódulos maduros.

Diversos investigadores han documentado la importancia de los diferentes estreses edáficos sobre la persistencia de los rizobios en el suelo, la nodulación y fijación de nitrógeno (Sadowsky, 2005; Graham, 2008). Las variaciones en el pH del suelo, la disponibilidad de nutrientes y la temperatura, entre otros factores, influirán en la actividad metabólica y supervivencia de los rizobios en el suelo y afectarán su capacidad para iniciar interacciones simbióticas. A continuación se describen las características más relevantes de la incidencia de los principales factores ambientales en el desarrollo de la simbiosis rizobio-leguminosa.

5.1. Temperatura.

Las temperaturas de suelo frecuentemente registradas en zonas tropicales y subtropicales constituyen un problema importante para la FBN de las leguminosas (Michiels *et al.*, 1994). La temperatura tiene una influencia marcada sobre la supervivencia y la persistencia de cepas de rizobios en los suelos. Sin embargo, cepas de rizobios procedentes de regiones tropicales sobreviven mejor a temperaturas altas que cepas de rizobios de climas templados (Zahran *et al.*, 1994).

La influencia de la temperatura sobre los rizobios dependería de la cepa (Zahran, 2010). Por ejemplo, *Bradyrhizobium* sp. fue menos susceptible que *R. leguminosarum* bv. *trifolii* a la alta temperatura de suelo (Sadowsky, 2005). Asimismo, las temperaturas elevadas pueden influir en la competitividad para la nodulación (Triplett y Sadowsky, 1992) y en la pérdida de infectividad (Segovia *et al.*, 1991). Sin embargo, se han reportado en la literatura rizobios tolerantes a temperaturas elevadas (40°C) que formaron nódulos eficientes en simbiosis con *P. vulgaris* (Hungría *et al.*, 1993; Michiels *et al.*, 1994), *Prosopis juliflora* (Kulkarni y Nautiyal, 1999) y *Acacia* sp. (Zerhari *et al.*, 2000).

La simbiosis rizobio-leguminosa presenta una relación óptima de temperatura aproximadamente de 30°C para trébol, entre 35-40°C para soja, maní y caupí, y entre 25-30°C para poroto (Piha y Munns, 1987; Michiels *et al.*, 1994). La exposición de ambos socios simbióticos a temperaturas extremas superiores o inferiores a las temperaturas óptimas perjudica la infección de las raíces, la estructura y funcionamiento de los nódulos, así como también el crecimiento y productividad de la planta (Michiels *et al.*, 1994).

Las temperaturas elevadas influyen directamente en la producción o liberación de genes *nod* inductores para soja y frijol (Hungría y Stacey, 1997), donde se altera el funcionamiento del nódulo, en particular la síntesis de leghemoglobina y la actividad de la nitrogenasa y se acelera la senescencia del nódulo (Hungría y Vargas 2000). Según datos de la literatura, proteínas de choque térmico se han hallado en rizobios (Michiels *et al.*, 1994; Munchbach *et al.*, 1999; Labidi *et al.*, 2000) y alteraciones en la movilidad de LPS por estrés calórico (Zahran *et al.*, 1994).

5.2. pH del suelo.

La influencia del pH de suelo sobre el proceso de nodulación y FBN ha sido reportada ampliamente (Graham, 1992; Hungría y Vargas, 2000). A nivel mundial, aproximadamente un 25 % de las tierras cultivadas se hallan afectadas por problemas relacionados con la acidez de suelo (Munns, 1986).

En suelos ácidos hay una importante disminución del número de rizobios. Brockwell *et al.* (1991) reportaron que el número de rizobios que en un suelo neutro puede alcanzar 10^5 bacterias/g, no supera los 100 rizobios/g cuando el pH del suelo es cercano a 6,0. Al disminuir el número de rizobios, no todas las plantas son noduladas en cantidad suficiente como para que haya una FBN adecuada para el crecimiento vegetal. Igualmente se ha descrito que en suelos ácidos hay un aumento en la proporción de nódulos inefectivos.

En general, los rizobios de crecimiento rápido (ej: *S. melilotii*, *S. medicae*, *R. etli*, *R. tropici*, etc.) son menos tolerantes a la acidez que los rizobios de crecimiento lento (ej. *Bradyrhizobium* spp.) (Brockwell *et al.*, 1991; Keyser y Munns, 1979; Sadowsky y Graham, 1998), sin embargo, algunas cepas de *R. tropici* son muy ácido tolerante (Graham *et al.*, 1992). La tolerancia a la acidez también varía entre especies de un mismo género. Así, *R. tropici* es más tolerante a la acidez que *R. leguminosarum*. Asimismo, existen diferencias a nivel de cepa, reportadas en *B. japonicum* (Keyser y Munns, 1979), *R. phaseoli* (Aarons y Graham, 1991), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (Watkin *et al.*, 2000) y *S. meliloti* (Howieson y Ewing, 1986).

A pesar que los rizobios parecen más sensibles a pHs bajos del medio que sus plantas hospedadoras (Hungria y Vargas, 2000), la acidez también influye el crecimiento de la leguminosa y el proceso de infección (Munns, 1986). Este efecto se debería a una interrupción del intercambio de señales entre macro y micro-simbiontes (Hungria y Stacey, 1997) y a la represión de los genes de nodulación y factores Nod en los rizobios (Richardson *et al.*, 1988). Así, la acidez del suelo afecta la persistencia de los rizobios, la nodulación y la eficiencia de fijación de N_2 de algunas leguminosas (Graham y Vance 2000).

5.3. Salinidad.

Las leguminosas son reconocidas por su sensibilidad o moderada resistencia a la salinidad. La sensibilidad a contenidos de sal elevados en el suelo se puede atribuir a la acumulación de iones tóxicos en diferentes tejidos de la planta, que dificultarán las

actividades enzimáticas. El estrés salino reduce la nodulación de las leguminosas mediante la inhibición las etapas tempranas del proceso simbiótico.

Los niveles de salinidad que inhiben la simbiosis rizobio-leguminosa son diferentes de los que inhiben el crecimiento de los simbiontes individuales. La pobre performance simbiótica de algunas leguminosas en condiciones salinas no se debería a limitaciones en el crecimiento y supervivencia de los rizobios en el suelo (Zarhan, 1991).

Las cepas de *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp. presentan variaciones en su tolerancia a la salinidad (Zahran, 1991, Graham, 1992). Según datos de la literatura, las cepas de crecimiento rápido son más tolerantes a concentraciones salinas elevadas que las de crecimiento lento (Graham y Parker, 1964; Singleton *et al.*, 1982; Yelton *et al.*, 1983, Elsheikh, 1998). Dicha situación sería atribuida a la capacidad de las cepas de *Rhizobium* sp. para influir en el potencial osmótico (Chen y Alexander, 1973) o acumular solutos específicos, como por ejemplo, glutamato o betaína (LeRudulier y Bernard, 1986) con mayor rapidez que las cepas de *Bradyrhizobium* sp.

Una de las estrategias empleadas por los microorganismos sometidos a estrés salino para mantener su viabilidad en el medio es la llamada *estrategia de soluto compatible*, que consiste en que los microorganismos mantienen el balance osmótico mediante pequeñas moléculas que son sintetizadas por ellos o son tomadas del medio donde se encuentran disponibles, con el objetivo de permitir el funcionamiento adecuado de las enzimas bacterianas. Algunos ejemplos de estos variados grupos de compuestos son polioles como el glicerol y arabinitol, azúcares y sus derivados (sacarosa, trehalosa, glucosil-glicerol), aminoácidos y derivados de aminas cuaternarias como la glicina betaína (González-Hernández y Peña, 2002).

Objetivos del trabajo de tesis.

Objetivo general

- ✓ Caracterizar a nivel funcional y molecular rizobios noduladores de *Desmanthus virgatus* obtenidos de diferentes suelos argentinos.

Objetivos específicos

- ✓ Seleccionar poblaciones de plantas de *D. virgatus* en diferentes ambientes de la República Argentina.
- ✓ Establecer una colección de rizobios obtenidos de ambientes naturales y noduladores de *D. virgatus*.
- ✓ Caracterizar fenotípica y genotípicamente la colección de aislamientos noduladores obtenidos previamente.
- ✓ Estudiar y caracterizar las propiedades simbióticas de cepas representativas de la colección.
- ✓ Evaluar la habilidad de las cepas para llevar a cabo el proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno.
- ✓ Evaluar la performance a campo de los aislamientos seleccionados de acuerdo a su potencial aplicación y utilidad en condiciones de uso agrícola.

Materiales y Métodos

1. Colección de poblaciones de plantas de *D. virgatus* (*sensu lato*).

1.1. Sitios de colectas de las poblaciones del complejo *D. virgatus*.

Se colectaron diez poblaciones de plantas de *D. virgatus* (*sensu lato*) en diferentes sitios del centro y norte de Argentina, provincias de Santa Fe, Chaco, Santiago del Estero, Entre Ríos, Corrientes, Misiones, Jujuy y Salta. Para cada población se registraron sus coordenadas geográficas a través de un sistema de geoposicionamiento satelital (GPS), según se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Ubicación geográfica de las poblaciones de *D. virgatus* (*sensu lato*).

| Población | Provincia | Departamento | GPS | |
|-----------|---------------------|------------------------|---------------|---------------|
| | | | GPS sur | GPS oeste |
| 1 | Entre Ríos | Nogoyá | 32° 24' 39,8' | 59° 33' 07,3' |
| 2 | Corrientes | Santo Tomé | 28° 22' 50,2' | 56° 06' 28,9' |
| 3 | Corrientes | Santo Tomé | 28° 07' 28,4' | 56° 03' 03,3' |
| 4 | Misiones | Candelaria | 28° 27' 01,7' | 55° 40' 37,5' |
| 5 | Chaco | San Fernando | 27° 50' 28,9' | 59° 17' 23,2' |
| 6 | Salta | Rosario de la Frontera | 25° 45' 17,7' | 64° 56' 40,8' |
| 7 | Jujuy | El Carmen | 24° 32' 15,5' | 65° 04' 50,7' |
| 8 | Jujuy | Ledesma | 23° 45' 40,1' | 64° 43' 21,8' |
| 9 | Santiago del Estero | Rivadavia | 28° 40' 44,5' | 82° 07' 49,0' |
| 10 | Santa Fe | General Obligado | 28° 18' 30,0' | 59° 16' 29,3' |

De cada población se seleccionaron plantas con suelo rizosférico y se herborizó un ejemplar de cada una, que fue determinado taxonómicamente según Luchetti (2014) y conservado en el Herbario “Arturo E. Ragonese” de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), Universidad Nacional del Litoral (UNL), reconocido internacionalmente con la sigla SF. Se colectaron los frutos maduros de 20-40 plantas de cada población y se tomaron muestras compuestas de suelo. Las semillas recolectadas se codificaron y conservaron, y las plantas

vivas se cultivaron en el “*Jardín de Introducción del Campo Experimental “Juan Donnet”* de la FCA (31°25’S, 60°56’W).

1.2. Caracterización de los sitios de origen de las poblaciones de *D. virgatus* (sensu lato).

Las muestras de suelo de los diferentes sitios de colección fueron sometidas a los siguientes análisis químicos: Materia orgánica (Walkey y Black, 1934), Nitrógeno (Kjeldhal, AOAC, 1990), Fósforo (Bray and Kurtz, 1945), pH (potenciometría, MAG, 1982) y Conductividad eléctrica (conductimetría, MAG, 1982).

Las características de ambiente, vegetación y edáficas más relevantes de los sitios muestreados fueron agrupadas y se mantienen almacenadas para su posterior utilización.

2. Medios de cultivos y conservación de microorganismos.

2.1 Medios de cultivo.

El medio extracto de levadura-manitol (LMA) (Vincent, 1970), se compone de: extracto de levadura: 0,4 g l⁻¹, manitol: 10 g l⁻¹, NaCl: 0,1 g l⁻¹, MgSO₄.7H₂O: 0,2 g l⁻¹, K₂HPO₄: 0,5 g l⁻¹. El medio LMA agarizado se preparó con agar 1,5% (p/v) y rojo congo 0,25% (p/v). La esterilización se realizó durante 20 minutos a 121°C en autoclave.

El medio completo (TY) (Beringer, 1974) se compone de: CaCl₂.2H₂O: 0,9 g l⁻¹, Triptona: 5 g l⁻¹ extracto de levadura: 3 g l⁻¹. Para la preparación del medio sólido se añadió agar al 1,5 %. La esterilización se realizó durante 20 minutos a 121°C en autoclave.

El medio peptona-glucosa-agar (PGA) (CIAT, 1988) se compone de: peptona: 10 g l⁻¹, glucosa: 5 g l⁻¹, agar: 15 g l⁻¹, púrpura de bromocresol 1,0% en etanol: 10 ml l⁻¹, pH: 6,7.

El medio extracto de levadura-manitol (LMA) con azul de bromotimol (CIAT, 1988): se compone de medio de cultivo líquido LMA con indicador azul de bromotimol (0,5% en NaOH 0,016N; pH 6,8).

2.1.1. Antibióticos.

Los antibióticos, cuando se requirieron, fueron adicionados a los medios de cultivo luego de ser esterilizados en autoclave a partir de soluciones 1000 veces concentradas de los mismos en agua deionizada. Las concentraciones finales en los medios de cultivo

fueron ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$): Streptomicina (25; 50; 100; 200; 300 y 400), Ampicilina (50; 75; 100 y 200) y Gentamicina (25; 50; 75; 100 y 200).

2.2. Medios de conservación.

La conservación a largo plazo de los aislamientos bacterianos y las cepas de referencia se hizo por congelación rápida de cultivos crecidos hasta la fase logarítmica tardía suplementados con glicerol estéril hasta una concentración final del 50% (v/v). Los criotubos se almacenaron a una temperatura de -20°C .

3. Cepas bacterianas de referencia.

Las cepas de rizobios utilizadas de referencia durante el desarrollo de esta Tesis se detallan en la Tabla 3. junto con sus plantas huésped y principales características.

Tabla 3: Cepas bacterianas utilizadas de referencia en este trabajo.

| Bacteria | Características relevantes | Fuente o referencia |
|------------------------------------|---|--|
| <i>R. tropici</i> II B CIAT 899 | cepa silvestre de <i>P. vulgaris</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Leucaena esculenta</i> | Martínez-Romero <i>et al.</i> , (1991) |
| <i>Rhizobium sp.</i> LPU83 | cepa aislada de nódulo de <i>Medicago sativa</i> (Argentina) | Del Papa (2001) |
| <i>S. meliloti</i> 2011 | <i>M. sativa</i> cepa derivada de SU47 | J. Denarié – France |
| <i>S. fredii</i> USDA 205T | cepa aislada de <i>Glycine max</i> | Scholaa y Elkan, (1984) |
| <i>S. hainannense</i> I66 | <i>Desmodium sinuatum</i> | Chen <i>et al.</i> , (1997) |
| <i>Rhizobium sp.</i> CB3126 | cepa aislada de <i>L. leucocephala</i> utilizada como inoculante en Australia | Date (1991) |

4. Material vegetal.

4.1. Semillas del complejo *D. virgatus*.

En los ensayos de laboratorio realizados para obtener una colección de nódulos y en las pruebas de infección se emplearon las semillas colectadas en cada uno de los sitios experimentales detallados en la Tabla 2.

En los experimentos de evaluación de la FBN y competitividad se utilizaron semillas del complejo *D. virgatus* cosechadas en forma manual de los frutos maduros de las plantas de las diez poblaciones cultivadas en el *Jardín de Introducción del Campo Experimental "Juan Donnet"* de la FCA-UNL.

4.2. Escarificación, desinfección y germinación de las semillas.

4.2.1. Complejo *D. virgatus*.

Las semillas fueron escarificadas por inmersión en agua en ebullición durante 10 segundos, según Hopkinson y English (2004). La desinfección se realizó por inmersión en etanol 96° durante un minuto, 0,5 % de hipoclorito de sodio cinco minutos y luego fueron lavadas seis veces con agua destilada estéril, permaneciendo una hora en el agua del último lavado. La germinación se efectuó extendiendo las semillas en condiciones asépticas sobre agar-agua 1% (p/v) contenido en placas de Petri y luego permanecieron en oscuridad a 28°C de temperatura durante 48 h.

Opcionalmente se pudo comprobar el grado de desinfección extendiendo algunas semillas en placas de TY e incubándolas a 28°C.

4.2.2. *P. vulgaris* y otras leguminosas.

Para los ensayos de nodulación de *P. vulgaris* se utilizaron semillas que se lavaron con agua para eliminar restos de fungicida y posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio (55g/l) durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavaron abundantemente con agua. Los pasos posteriores fueron similares a los realizados con las semillas de *D. virgatus*.

Las semillas de *Macroptilium lathyroides* y *Macroptilium erythroloma* se escarificaron manualmente por medio de un método de abrasión por el empleo de un papel de lija y las semillas de *Leucaena leucophela* sumergiéndolas en agua hirviendo durante 1 minuto.

La desinfección de estas semillas y las de *Medicago sativa*, *Vicia sativa* y *Vicia villosa* se realizó por inmersión en etanol 96° durante un minuto, 0,5 % de hipoclorito de sodio (5–7 minutos) y fueron lavadas seis veces con agua destilada estéril, permaneciendo una hora en el agua del último lavado. Posteriormente, se germinaron sobre agar-agua 1% (p/v) en oscuridad a 28°C de temperatura (48 – 72h).

4.3. Inoculación de las plantas.

Los inóculos se prepararon cultivando las bacterias en caldo LMA hasta obtener una concentración de 1.10^8 ufc/ml (unidad formadoras de colonias/ml). La inoculación de las plantas del complejo *D. virgatus* se realizó tras 15 días de permanencia en la cámara de cultivo aplicando 10 ml de cada cultivo bacteriano en una suspensión que contenía 10^7 ufc/ml de solución Jensen (1942) sobre la vermiculita en torno al cuello de la plántula (una planta por maceta con vermiculita estéril).

La inoculación de las plantas de *P. vulgaris* se hizo en el momento de la siembra en maceta, que contenían perlita y vermiculita estériles en relación 1:1 como soporte, añadiendo 1 ml de suspensión bacteriana de la cepa en estudio. La inoculación de las leguminosas descritas en la sección 4.2.2. se realizó en forma similar a la inoculación de *D. virgatus*.

4.4. Condiciones de cultivo vegetal.

Los ensayos se realizaron en una cámara de cultivo de plantas mantenida en las siguientes condiciones: $500 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ (400-700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, 28°C de temperatura y 55-60 % de humedad relativa.

5. Colección de nódulos de las plantas de *D. virgatus* (*sensu lato*).

5.1. Colección de nódulos de las plantas de campo.

Se colectaron los nódulos de las raíces de las plantas desarrolladas a campo a partir de muestras de ejemplares de cada población del complejo *D. virgatus* extraídos con suelo rizosférico en los diferentes sitios de colecta. Para cada población de plantas se evaluó la nodulación cuantificando el número total de nódulos por planta, los cuales

fueron conservados en tubos con gel de sílice para su posterior procesamiento en el laboratorio.

5.2. Colección de nódulos de las plantas en condiciones de crecimiento controlado.

En los ensayos de laboratorio se emplearon las semillas colectadas en el campo (hábitat natural) de cada población con sus respectivos suelos de origen. Las semillas fueron escarificadas, desinfectadas y germinadas según se describe en la sección 4.2.1. del presente Capítulo. Las semillas que presentaban una radícula de 10 a 15mm de longitud se colocaron en macetas con vermiculita estéril y suelo de la misma procedencia de la semilla, en relación 5:1.

Las plántulas permanecieron en cámara de cultivo (ver condiciones de crecimiento sección 4.4.) durante 90 días y se regaron con agua estéril y solución fisiológica Jensen diluida 1:4. Al finalizar el ensayo, se cuantificó el número total de nódulos por planta y se determinaron la longitud de raíz, el número de hojas bipinnadas y la altura de cada planta de *D. virgatus (sensu lato)* proveniente de las diez poblaciones seleccionadas. Los nódulos obtenidos fueron conservados en tubos con gel de sílice.

6. Colección de aislamientos noduladores.

6.1. Aislamiento de cepas bacterianas a partir de nódulos de plantas del complejo *D. virgatus*.

A partir de los nódulos obtenidos de campo y en condiciones de crecimiento controlado, se realizaron aislamientos de rizobios en medio agarizado LMA. Los nódulos deshidratados fueron rehidratados con agua destilada estéril en placas Petri durante 6 h. Posteriormente, fueron desinfectados superficialmente por inmersión en alcohol 96° durante un minuto, H₂O₂ 30 volúmenes 5-8 minutos y seis veces lavados con agua destilada estéril. Posteriormente fueron macerados en 100 µl de solución mineral de Fahraeus, sembrados en placas con LMA e incubados a 28°C. Las observaciones se realizaron cada dos días repicando las colonias típicas de rizobios (CIAT, 1988) hasta obtener cultivos puros.

Los aislamientos obtenidos fueron clasificados de acuerdo a la población de plantas y sitios de origen, y conservados según se describe en sección 2.2 de este Capítulo. Se

codificó cada cepa bacteriana, asignándole el primer número correspondiente al de la población colectada del complejo *D. virgatus*, seguido de la letra C o L según haya sido obtenida de nódulos de plantas de campo o de laboratorio, seguido el número correspondiente del orden de plantas analizadas y el número respectivo al orden de los nódulos evaluados.

6.2. Pruebas de pureza y confirmación del fenotipo de nodulación.

Las cepas aisladas fueron sometidas a pruebas de pureza para descartar la presencia de posibles contaminantes y confirmar la capacidad de producir nódulos:

- Tinción diferencial de Gram:

Se comprobó la reacción de la pared celular a la tinción diferencial de Gram (Vincent, 1970).

- Características de crecimiento en PGA:

Se sembraron los cultivos en placas con medio PGA y se incubaron a 28°C por cinco días.

- Pruebas de infección en plántulas de *D. virgatus*:

Las cepas de rizobios fueron confirmadas ensayando su capacidad de producir nódulos en la planta huésped (Vincent, 1970), utilizando los frutos extraídos de las poblaciones de plantas colectadas en el campo. Las semillas se escarificaron, desinfectaron y germinaron (según se describió en la sección 4.2.1.) y se colocaron en macetas con sustrato de vermiculita y suelo estéril, en relación 5:1. A los quince días, las plántulas fueron inoculadas con los aislamientos correspondientes al mismo sitio de origen de cada planta. Los inóculos se prepararon cultivando las bacterias en caldo LMA hasta obtener una concentración de 1.10^8 ufc/ml. Los tratamientos consistieron en: plántulas inoculadas y control (ejemplares de cada población sin inocular). Las plantas permanecieron en condiciones de crecimiento controlado (ver sección 4.4.) y luego de 45 días posteriores a la inoculación, fueron removidas de las macetas y examinadas para comprobar la ocurrencia del proceso de nodulación. A partir de los nódulos formados se aislaron las cepas en medio LMA con rojo congo.

7. Caracterización fenotípica de los rizobios:

7.1. Características morfológicas:

Las cepas bacterianas se cultivaron en placas de LMA con rojo congo a 28°C durante 5 días y se observó la morfología macroscópica de las colonias: color, elevación, consistencia, bordes y producción de exopolisacáridos. La morfología celular se observó al microscopio óptico mediante la tinción diferencial de Gram (Vincent, 1970).

7.2. Características fisiológicas:

7.2.1. Velocidad de crecimiento de los aislamientos.

La velocidad de crecimiento de las cepas se determinó a través del tiempo de aparición de las primeras colonias y el diámetro de las mismas, cultivadas en LMA a 28°C durante diez días. Se consideraron de crecimiento rápido aquellas cepas cuyas primeras colonias aparecieron dentro de los 2-4 días de incubación y presentaron un diámetro igual o mayor a 2 mm y de crecimiento lento las que aparecieron entre los 5-7 días y su diámetro fue inferior a 2 mm, según Jordan (1984).

7.2.2. Respuesta al cambio de coloración del medio LMA con azul de bromotimol.

La producción de acidez o alcalinidad se determinó adicionando el indicador azul de bromotimol al medio de cultivo. Se sembraron las cepas en tubos de ensayo con 10 ml de medio de cultivo líquido LMA con azul de bromotimol de color verde a pH 6,8. Se incubaron a 28°C durante 5 días y se observó el cambio de coloración del medio. Según el viraje del indicador a color azul o amarillo, las cepas se calificaron como productoras de alcalinidad o acidez respectivamente (CIAT, 1988).

7.2.3. Crecimiento en diferentes condiciones de pH, temperatura y salinidad.

Los aislamientos de rizobios noduladores de cada población de plantas fueron evaluados respecto a su habilidad para crecer en medio LMA con diferentes niveles de pHs, en temperaturas extremas y con distintas condiciones de salinidad. Se sembraron 10 µl de un cultivo que contenía aproximadamente 1.10^4 células en placas con el medio de cultivo LMA modificado según la característica a evaluar y se incubaron en estufa durante

5 días. El crecimiento de las cepas, evaluado por duplicado, se calificó según una escala numérica gradual desde 0 (ausencia de crecimiento) hasta 5 (desarrollo normal), comparándolo con el crecimiento obtenido en medio LMA en condiciones óptimas (pH 6,8; 28°C y 0,01% p/v NaCl).

- pH: el medio se ajustó a los niveles de pHs: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 y 9,0.
- temperatura: las cepas se incubaron a 28°C, 35°C, 40°C y 45°C.
- salinidad: el medio se modificó a las concentraciones: 0,01%; 0,5%; 1%; 2% y 3% p/v NaCl (equivalentes a 17; 85; 171; 342 y 513 mM NaCl).

7.2.4. Análisis estadístico.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) de las diferentes tolerancias a estreses abióticos de las cepas de rizobios de la colección. El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2013).

8. Caracterización genotípica de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*.

8.1. Perfil de plásmidos.

Los aislamientos bacterianos seleccionados de cada población se examinaron en sus perfiles plasmídicos mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa tipo Eckhardt. Esta técnica comprende la lisis de los rizobios en la misma fosa de siembra del gel de separación y permite revelar la presencia de plásmidos de gran tamaño característicos de algunos rizobios (Geniaux *et al.*, 1995).

Según el método de lisis *in situ* descrito por Wheatcroft *et al.*, (1990), las bacterias fueron cultivadas en medio TY líquido, una alícuota de 1ml a 0,4 de DO₆₂₀ se centrifugó y las células se lavaron con 1 ml de solución 0,3% p/v de sarkosilato de sodio. Posteriormente, las células se centrifugaron y resuspendieron en 15 µl de solución de ficoll 20% (p/v), manteniéndolas en una mezcla de agua-hielo hasta el momento de sembrar el gel de lisis/separación (0,75 % de agarosa con buffer TBE (Tris 0,09 M; Ac Bórico 0,09 M; EDTA 0,002 M)).

Previo a la siembra de las muestras se colocó en cada fosa del gel 25 µl de solución de SDS 10% conteniendo xylene cyanole, se corrieron a polaridad invertida hasta que el

frente retrocede un centímetro. En el momento de la siembra se agregaron 15µl de solución de lisis (sacarosa 8% ficoll 2% Tris 50 mM EDTA 25 nM, RNAsa 0,4 mg/ml lisozima 1mg/ml) a cada una de las muestras, se mezclaron en forma suave e inmediatamente se sembraron 15µl de la mezcla por calle.

Se corrió a 30 V por 30 min. y luego a 110 V 2 h. Al finalizar la corrida se lavó con agua 30 min y se tiñó con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) para visualizar las bandas mediante trans-iluminación con luz ultravioleta.

8.2. Extracción de ADN total.

Los ADN moldes para las amplificaciones fueron obtenidos utilizando la siguiente metodología:

Los cultivos bacterianos de la cepa correspondiente se inocularon en placas con medio TY (Beringer, 1974) y se incubaron durante 24-48h a 28°C. Las células se lavaron en 400 µl de una solución de NaCl 1M en un tubo eppendorf y se centrifugaron durante 15 minutos a 15000 g. A continuación, se resuspendieron en 250 µl sacarosa al 20% en TE, se añadió 250 µl de lisozima 5 mg ml⁻¹ (en TE), se mezcló por inversión y se incubó una hora a 37°C. Luego se agregaron 50 µl de pronasa [10 mg ml⁻¹ en N-lauril sarcosina al 5% en buffer Tris EDTA (TE)], se mezcló por inversión y se incubó a 37°C durante 1-2 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifugó durante 15 minutos a 15000 g y se pasó la fase superior acuosa a un nuevo tubo eppendorf. Se agregó 10 µl de sílica, se centrifugó durante 1 minuto a 15000 g y se descartó la fase superior acuosa. El precipitado se lavó 3 veces con 400 µl de solución de lavado y se secó en estufa 15 minutos a 37°C. Se resuspendió en 50-70 µl de agua bidestilada estéril y se incubó 10 minutos a 60°C. Posteriormente se centrifugó a 15000 g y se pasó el sobrenadante conteniendo el ADN a un nuevo tubo eppendorf.

Las preparaciones y manipulaciones de las muestras de ADN se realizaron según las técnicas descriptas en Sambrook *et al.*, (1989).

8.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico. La composición de las mezclas de reacción utilizadas fue: 50 mM Tris-HCl (pH 8,3); 3 mM MgCl₂, 200 µM dNTPS; 1 U Taq DNA polimerasa (Promega Corp.) y 10 µM de cada uno de los cebadores

(primers), completando un volumen final de mezcla de reacción, para todos los casos de 25 µl. Las condiciones de ciclado dependieron de los cebadores utilizados y se detallan en las secciones siguientes. Al finalizar las reacciones de PCR, 10 µl de cada uno de los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa.

8.4. Amplificaciones de ADN total de los aislamientos.

Los cebadores empleados fueron: BOX A1R (secuencia: 5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') De Brujin *et al.* (1992) y MBOREP1 (secuencia: 5'-CCG CCG TTG CCG CCG TTG CCG CCG-3') Versalovic (1991).

Las condiciones de ciclado utilizadas para BOX A1R fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C 7 minutos y 30 ciclos de desnaturalización a 94°C 10 segundos, annealing a 52°C 60 segundos, y elongación a 72°C 2 minutos.

Las condiciones de ciclado utilizadas para MboREP fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C 7 minutos y 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C 10 segundos, annealing a 65°C 70 segundos, y elongación a 72°C 2 minutos.

8.5. Amplificación de las secuencias parciales del gen *nodC*.

La amplificación de un fragmento de 848 pb correspondiente al gen de nodulación *nodC* se realizó empleando los cebadores nodCF/nodCI y las condiciones de ciclado descritas por Laguerre *et al.*, (2001).

Los alineamientos se realizaron con una secuencia que cubrían aproximadamente 753 pb con los sitios homólogos a los nucleótidos 353 a 1105 en *nodC* de *S. meliloti* 1021 (GI: 14523570).

8.6. Amplificación de las secuencias parciales del gen ADNr 16S.

La amplificación de un fragmento de 1440 pb correspondiente al gen ADNr 16S se realizó empleando los cebadores fD1 y RD1 según Weisburg *et al.*, (1991).

Los alineamientos fueron realizados con una secuencia que cubrían los sitios homólogos a los nucleótidos 91 a 1.364 en el ADNr 16S de *S. meliloti* 1021 (NC_003047).

Sobre la base de las secuencias ADNr 16S de *Mesorhizobium* sp. 10L4.2 y 10L5.3 y la secuencia homóloga de *Rhizobium* 10L11.4 (tres aislamientos caracterizados en este

trabajo) se diseñaron los siguientes cebadores específicos: Para PCR1, 16S4 (59-GGTTACCAGAAATGGTTTCC- 39) y el cebador RD1 fueron utilizados para amplificar un fragmento de 538 pb interno del ADNr 16S de los mesorizobios; mientras que para PCR2, cebadores fd1 y 16S2 (59-ATGGAARhizobial GAGGTGAGTGGGAAT-39) fueron utilizados para amplificar un homólogo interno ADNr de los rizobios.

8.7. Secuenciación y análisis filogenético.

Las secuencias de nucleótidos de los productos de amplificación parcial de los genes *nodC* y ADNr 16S fue realizada por el servicio de secuenciación de INTA Castelar, Argentina. Las secuencias finales fueron ingresadas en GenBank bajo los números de adhesión KJ128392 a KJ128398.

La búsqueda de secuencias homólogas en bases de datos se realizó utilizando la herramienta BLASTN (Altschul *et al.*, 1997), desde el servidor del NCBI (National Centre for Biotechnological Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Las secuencias homólogas se alinearon utilizando el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

El análisis filogenético se realizó empleando el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

8.8. Electroforesis en geles de agarosa.

La electroforesis horizontal en geles de agarosa se utilizó para observar los productos obtenidos de las reacciones en cadena de la polimerasa. El porcentaje de agarosa de la solución (1,5% p/v) fue preparada empleando solución tampón Tris-bórico-EDTA (TBE, Tris 89 mM, EDTANa₂ 2,5 mM, BO₃H₃ 89 mM, pH 8,2). Las muestras se mezclaron para su siembra con solución de carga (sacarosa 40%, azul de bromofenol 0,25% en una relación 5 µl solución de ADN /µl solución de carga) y las corridas se realizaron a voltaje constante (80 volts), utilizando como solución tampón de corrida el mismo TBE.

8.9. Revelado de geles y fotografía.

La visualización de los fragmentos de ADN se realizó con el agregado de 0,5 µg ml⁻¹ de bromuro de etidio a los geles de agarosa por transiluminación con luz ultravioleta de λ=260 nm. Como marcador de peso molecular se utilizó ADN del fago λ digerido con

HindIII. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital bajo iluminación ultravioleta.

8.10. Análisis de productos de amplificación de ADN total de los diferentes aislamientos.

Para el análisis de los datos los productos de PCR se establecieron como presencia (1) o ausencia (0) de bandas para cada uno de los individuos analizados. Los datos fueron utilizados para generar un dendograma UPGMA (coeficiente de similitud Dice) el cual fue obtenido del análisis de los fingerprints derivados de BOXA1-PCR. Se utilizaron el software Cross Checker (para la construcción de la matriz binaria) y los programas FAMD (Fingerprint Analysis with Missing Data) versión 1.23 beta (Schluter y Harris, 2006) y MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011).

9. Ensayos de estimación de FBN en cámara de crecimiento.

9.1. Diseño experimental.

Las semillas del complejo *D. virgatus* cosechadas en forma manual de los frutos maduros de las plantas cultivadas fueron escarificadas, desinfectadas y germinadas (ver sección 4.2.) y colocadas individualmente en macetas de plástico que contenían vermiculita estéril y solución mineral de Jensen.

Los tratamientos aplicados consistieron en testigo absoluto (plántulas sin inocular), testigo fertilizado con N e inoculado (plantas inoculadas con la cepa de rizobio a evaluar). La fertilización con N fue realizada mediante la adición de 50 ml de KNO₃ 0,05% (p/v) (70 ppm N) semanalmente durante 65 días (30 mg N incorporado en cada maceta con su sola planta).

La inoculación de las plantas del complejo *D. virgatus* se realizó tras 15 días de permanencia en la cámara de cultivo aplicando 10 ml de cada cultivo bacteriano en una suspensión que contenía 10⁷ ufc/ml de solución Jensen sobre la vermiculita en torno al cuello de la plántula.

Las plantas permanecieron 80 días en condiciones de crecimiento controlado a 28°C de temperatura, fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad) y periódicamente se regaron con agua estéril y solución fisiológica Jensen diluida 1:4.

9.2. Cuantificación de los nódulos y peso seco de *D. virgatus*.

La fijación de nitrógeno para cada tratamiento fue estimada cuantificando el número de nódulos formados y midiendo el peso seco del tejido radicular y aéreo con una balanza, 80 días después de la fecha de inicio de la experiencia. Para evaluar el peso seco de las plantas se separó la parte radicular y aérea de cada planta de *D. virgatus* y se introdujeron en sobres de papel individuales. Se secaron en estufa a 65°C durante 48 horas y se determinó el peso seco.

Los datos obtenidos de número de nódulos y materia seca de las plantas fueron analizados según análisis de la varianza y las medias se compararon según el test de Tuckey ($p < 0,01$). El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2013).

Además, se calculó la efectividad simbiótica de cada cepa de rizobio, expresada como capacidad simbiótica (Sc) través de la siguiente ecuación:

$$Sc = I - U / N - U$$

donde I correspondió a la materia seca (MS) aérea del tratamiento inoculado, U a la MS aérea del tratamiento testigo sin inocular y N a la MS aérea control fertilizado con N (+N). Así, de acuerdo a Brockwell *et al.*, (1966) se calcularon los índices de efectividad, donde $Sc \geq 0,67$ (altamente efectiva), $0,33 \leq Sc < 0,67$ (efectiva), $Sc < 0,33$ (levemente efectiva) y sin nodulación (inefectiva).

10. Medida de la competitividad para la nodulación.

La determinación del número de nódulos que una cepa es capaz de formar en presencia de otra se hizo por el marcaje de las cepas (por ej resistencia a algún antibiótico). Previamente a la preparación de los inóculos, se hizo una estimación del número de células viables en un cultivo en comienzo de fase estacionaria en medio LMA líquido para cada cepa. Una vez realizados los recuentos y conocido el número de células viables, se tomó de cada cultivo el volumen adecuado que se diluyó en el medio mineral estéril para conseguir una densidad celular de 1×10^7 cel/ml.

La inoculación de las plantas se realizó con suspensiones bacterianas formadas por la mezcla de dos cepas en proporciones 1:1 (v:v) y la mezcla se utilizó para inocular

(1ml/maceta). Para ello, se partió de cultivos bacterianos que tenían aproximadamente la misma DO a 600 nm. Como controles siempre se incluyeron macetas sin inocular, y también macetas inoculadas con cada cepa en forma separada.

A los 80 días después de la inoculación se cortaron las raíces noduladas, se esterilizaron superficialmente los nódulos y se machacaron los mismos para plaquearlos en placas de LMA con los diferentes antibióticos.

11. Evaluación de la performance a campo.

11.1. Caracterización del sitio de los ensayos.

Los ensayos se llevaron a cabo en el Campo Experimental “Juan Donnet” de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral, ubicado en la localidad de Esperanza (31°25'S, 60°56'W), departamento Las Colonias, provincia de Santa Fe.

El sitio presenta una temperatura media anual de 18,8°C y una precipitación anual promedio de 1046 mm. Los datos meteorológicos registrados durante la realización de los ensayos a campo fueron obtenidos de la estación automática meteorológica inalámbrica de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNL).

El suelo es un Argiudol típico con textura franco limosa y las características químicas fueron: 2,4% de materia orgánica (Walkley y Black), 0,145% de nitrógeno total (AOAC, 1998), 25 ppm de fósforo extractable (Bray y Kurtz N°1), pH 6,3 (suelo:agua 1:2,5) y 0,7 dSm⁻¹ de conductividad eléctrica.

Se tomaron muestras de suelo del lugar y se realizó un recuento de rizobios en plantas estériles por el método del Número más Probable (NMP) (Vincent, 1970).

11.2. Genotipos y análisis de poder germinativo de las semillas de *D. virgatus*.

En la implantación del ensayo I se utilizaron semillas de *D. virgatus* cv Marc procedentes del *Australian Tropical Crops and Forages Collection (Queensland Department of Primary Industries and Fisheries, Australia)*.

En la implantación del ensayo II se emplearon semillas de una población nativa de *D. virgatus (sensu stricto)* originaria del Departamento Ledesma, provincia de Jujuy, codificada en este trabajo de tesis según población 8 (Id 7059).

El análisis de poder germinativo (PG) de las semillas se realizó utilizando germinadores con 50 semillas cada uno y cinco repeticiones según la metodología propuesta por Peretti (1994).

11.3. Preparación de los inoculantes.

Los inoculantes fueron preparados en turba estéril a partir de cultivos puros de rizobios desarrollados en medio LMA líquidos. Se realizaron pruebas de pureza para cepas de rizobios mediante un examen microscópico, tinción de Gram, desarrollo de colonias en placas con LMA y crecimiento en medio APG (CIAT, 1988). Se efectuaron recuentos del Número de rizobios viables por el método de Recuento en Placa (Vincent, 1970) para los caldos de cultivos de rizobios, inoculantes preparados base turba y semillas de *D. virgatus* inoculadas.

11.4. Diseño experimental.

En cada uno de los ensayos a campo se realizaron los siguientes 6 tratamientos: control sin inocular (1), inoculado con una cepa representativa de la colección originaria de la provincia de Santa Fe (2), inoculado con una cepa procedente de Jujuy (3), inoculado con una cepa originaria de Corrientes (4), inoculado con la cepa *Rhizobium* sp. CB3126 (5) y control con nitrógeno (6). El diseño experimental fue en bloques completos al azar con tres repeticiones (18 tratamientos) para cada ensayo.

11.5. Desarrollo de los ensayos a campo.

Los ensayos se implantaron en la segunda quincena del mes de enero de 2012 sembrando 100 semillas por metro lineal de *D. virgatus* cv Marc y *D. virgatus* (sensu estricto) población 8 (Id 7059), para las experiencias I y II respectivamente. Previamente, las semillas fueron escarificadas según la metodología propuesta por Hopkinson y English (2004), y para los tratamientos inoculados fueron humectadas con una solución de sacarosa estéril 20% (p/v) como adherente e inoculadas con 8 g de inoculante por Kg de semilla.

Las parcelas consistieron en 4 surcos separados a 0,15 m entre ellos y un metro de largo (la superficie de cada parcela fue 0,8 m²). Las parcelas de *D. virgatus* se separaron

entre sí mediante la siembra de una gramínea *S. itálica*, con una densidad de 20 Kg de N ha⁻¹ para reducir la posibilidad de contaminación cruzada por rizobios.

En el tratamiento con nitrógeno se aplicaron 20 Kg de N ha⁻¹ (4,3 g de urea por metro de surco) cada dos semanas, iniciando las fertilizaciones a los quince días posteriores a la fecha de siembra (7 aplicaciones en total). Durante el ensayo se efectuaron dos riegos semanales, control de hormigas con insecticidas y control de malezas de manera manual.

A las 15 semanas posteriores a la siembra se tomaron muestras de plantas de las líneas centrales de las parcelas para evitar el efecto bordura, realizando el corte de las plantas a nivel del suelo.

11.6. Análisis de la efectividad de la inoculación.

Las plantas cosechadas de *D. virgatus* se colocaron en sobres de papel y se mantuvieron individualizadas. Se determinaron materia seca vegetal por secado en estufa de aire forzado a 60°C hasta peso constante y contenido de N total en parte aérea de las plantas, según el método Kjeldahl (AOAC, 1990). El contenido de proteína cruda (PC) se halló utilizando el factor 6,25 para convertir el nitrógeno a proteína.

Los datos obtenidos de materia seca y contenido de N de las plantas fueron analizados según análisis de la varianza y las medias se compararon según el test de Tuckey (p<0,01). El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2013).

Se determinaron el Índice de efectividad de la inoculación (IEI) e Índice de respuesta al nitrógeno (IRN), según (CIAT, 1988).

El efecto de los tratamientos de inoculación en el rendimiento de N fue evaluado mediante el IEI:

$$\text{IEI} = \frac{\text{Rendimiento de N (+I)} - \text{Rendimiento de N (-I)}}{\text{Rendimiento de N (+I)}} \times 100$$

donde: (+I): tratamiento inoculado con cepa determinada ; (-I) tratamiento sin inocular

El testigo fertilizado con nitrógeno fue evaluado mediante el IRN:

$$\text{IRN} = \frac{\text{Rendimiento de N (+N)} - \text{Rendimiento de N (-N)}}{\text{Rendimiento de N (+N)}} \times 100$$

donde: (+N): tratamiento fertilizado con N; (-N): tratamiento sin N

Capítulo I

Selección y colecta de poblaciones de plantas de *D. virgatus* (sensu lato) procedentes de la República Argentina.

I.1. Introducción.

La producción ganadera del centro-norte de la República Argentina se caracteriza por su naturaleza extensiva, utilizando el forraje proveniente de pastizales naturales, pasturas cultivadas y verdes estacionales. En ellos, las leguminosas forrajeras son la fuente principal de nitrógeno de la dieta animal, además de contribuir a la digestibilidad y balance nutricional del forraje ofrecido (Chestnutt y Lowe, 1970). Por otro lado, el incremento de las zonas agrícolas cultivables ha impulsado a los sistemas ganaderos a desplazarse cada vez más hacia zonas consideradas marginales, en donde las especies leguminosas forrajeras disponibles y adaptadas a esas condiciones son escasas.

Una alternativa viable y eficaz podría ser la domesticación e introducción a cultivo de especies leguminosas nativas con reconocido potencial forrajero y adaptadas a nuestras condiciones edafoclimáticas. Entre estas especies se destacan las que pertenecen al género *Desmanthus* (Allen y Allen, 1981; Burt, 1993). En Argentina habitan 5 especies de *Desmanthus*, una de ellas, sin importancia forrajera, es endémica de la provincia de Misiones (*D. hexapetalus* (Micheli) J.F. Macbr.), mientras que las restantes especies integran, desde el punto de vista taxonómico, el complejo *Desmanthus virgatus*, al que pertenecen: *D. acuminatus* Benth., *D. paspalaceus* (Lindm.) Burkart, *D. tatuhyensis* Hoene y *D. virgatus* (L.) Willd. (Luckow, 1993; Zuloaga y Morrone, 1999). En otros países se han evaluado las características forrajeras en materiales promisorios de *D. virgatus* provenientes de Argentina (Jones y Clem, 1997). En el caso particular de *D. virgatus*, es una especie perenne, de ciclo primavero-estival y amplia distribución en el centro-norte de Argentina. Desde el punto de vista forrajero, se distingue por su alta palatabilidad, tolerancia al pastoreo (Pengelly y Conway, 2000; Gardiner *et al.*, 2004) y calidad del forraje ofrecido, alcanzando valores de 22% de proteína cruda en hojas (Jones y Clem, 1997). Esta especie ha sido introducida con éxito al cultivo en sistemas pastoriles extensivos de áreas subhúmedas y semiáridas de Australia (Jones y Brandon, 1998).

Por otro lado, es reconocido el papel de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en las pasturas de leguminosas, al aumentar el nitrógeno disponible para la planta y por ende el de la dieta ofrecida (Norris, 1972; Cameron, 1980). El desconocimiento de las interacciones entre leguminosas forrajeras nativas y bacterias fijadoras de nitrógeno,

podría llevar a realizar malogrados intentos durante su introducción a cultivo, ya que muchos materiales vegetales modifican su comportamiento en evaluaciones agronómicas en función de la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno. Jones y Clem (1997) reconocieron la importancia del escaso conocimiento sobre la habilidad de las plantas de *D. virgatus* para formar nódulos efectivos con cepas nativas.

A pesar del interés que presenta *D. virgatus* como recurso forrajero, en Argentina no existían antecedentes de estudios en esta especie y han sido escasos los intentos de introducirla a cultivo. Con el objetivo de lograr la incorporación y desarrollo de nuevas alternativas forrajeras, en la Facultad de Ciencias Agrarias (UNL) se inició un programa de colección y caracterización de recursos forrajeros nativos, en particular de especies del género *Desmanthus*. Durante el transcurso de los años 2004 y 2005 se realizaron distintas expediciones con la finalidad de coleccionar semillas, plantas vivas, nódulos y muestras de suelos de poblaciones correspondientes a las especies nativas que integran el complejo *D. virgatus (sensu lato)* en Argentina. A tal fin se visitaron las provincias de Santa Fe, Chaco, Santiago del Estero, Entre Ríos, Corrientes, Misiones, Jujuy y Salta. Sobre la base de estas colecciones, Zabala *et al.* (2008) realizaron la caracterización morfológica de las poblaciones de este complejo.

El objetivo del presente capítulo fue seleccionar y construir una colección de poblaciones de plantas de *D. virgatus (sensu lato)* procedentes del centro y norte de la República Argentina.

En este capítulo, en una etapa inicial se expone una descripción del género *Desmanthus* y la determinación taxonómica de las especies del complejo *D. virgatus* a las que pertenecen las distintas poblaciones colectadas en el centro y norte de Argentina. Posteriormente, se describen las características fitogeográficas, climáticas y edáficas más relevantes de los sitios de origen de las poblaciones de la colección. En una etapa final, se detallan las características morfológicas de las especies cultivadas del complejo *D. virgatus* estudiadas en este trabajo de tesis.

I.2. Resultados y discusión.

I.2.1. Descripción y determinación taxonómica de las poblaciones colectadas del complejo *D. virgatus*.

Desmanthus Willd. es un género perteneciente a la subfamilia Mimosoideae de la familia Fabaceae, que incluye un total de 24 especies de amplia distribución en América (ver detalles de características en sección 2.1. de Introducción General).

En Argentina habitan 5 especies de *Desmanthus*: *D. hexapetalus* (Micheli) J.F. Macbr.), *D. acuminatus* Benth., *D. paspalaceus* (Lindm.) Kurkart, *D. tatuhyensis* Hoene y *D. virgatus* (L.) Willd., la primera de ellas, endémica de Misiones, sin valor forrajero al igual que *D. tatuhyensis* (Zuloaga y Morrone, 1999; Zabala *et al.*, 2008). Desde el punto de vista taxonómico, con excepción de *D. hexapetalus*, las restantes especies del género integran en nuestro país el complejo taxonómico *Desmanthus virgatus (sensu lato)* (Luckow, 1993).

Si bien en algunos casos resulta dificultosa una clara determinación taxonómica de las plantas que integran el complejo *D. virgatus*, a continuación se presenta una clave que permite reconocer las especies que integran dicho complejo (Luchetti, 2014):

- 1** Inflorescencias sésiles o sostenidas por pequeños pedúnculos de 0,2 a 0,7 (- 0,8) cm long. Hojas con 1-2 pares de pinnas lanceoladas, éstas con 20-50 pares de foliólulos cuyo tamaño disminuye desde el ápice a la base; estípulas con pequeñas aurículas, glabras. Raíz napiforme hasta de 9 cm long. Legumbre glabra, levemente falcada, de 3-5 cm long., 7-18 seminada. Arbustos o subarbustos hasta de 0,4 m de altura..... ***D. tatuhyensis***

- 1'** Inflorescencias pedunculadas sostenidas por pedúnculos de (0,5-) 0,8 a 7 cm long. Hojas con 1-9 pares de pinnas oblongas o lanceoladas, éstas con 7-50 pares de foliólulos de tamaño decreciente, o semejante, desde la base al ápice; estípulas con aurículas desarrolladas, glabras o pubescentes..... **2**

- 2** Hojas con 1-3 (-4) pares de pinnas de contorno lanceolado, de 25-51 mm long., con 20-50 pares de foliólulos de tamaño decreciente desde el ápice a la base. Nectario extrafloral hasta de 3,5 mm long. superando el ancho del raquis o pecíolo, chato, elíptico. Pedúnculos de las inflorescencias de 2,5 a 6,5 (-7) cm long. Raíz napiforme de 5-28 cm long. Legumbre recta, de 4-8 cm long., 14-32 seminada. Hierbas o subarbustos erectos de 0,3-1,2 m de altura.....
..... ***D. paspalaceus***
- 2'** Hojas con 2-9 pares de pinnas de contorno oblongo, de 11-30 mm long., con 7-25 (-30) pares de foliólulos de longitud semejante desde el ápice a la base. Nectario extrafloral hasta de 2 mm de diámetro, generalmente no mayor que el ancho del raquis o pecíolo, orbicular. Pedúnculos de las inflorescencias de 0,5 a 3 cm (- 4,5) long.....
.....**3**
- 3** Hojas con 5-9 pares de pinnas, éstas con 7-12 pares de foliólulos; estípulas pubescentes. Raíz napiforme, rojiza. Legumbre de 2,5-5 cm long., levemente incurva, con ápice acuminado, glabra o glabrescente con pelos blancos, 4-18 seminada. Hierbas o subarbustos hasta de 0,3 m de altura.....
..... ***D. acuminatus***
- 3'** Hojas con 2-5 pares de pinnas, éstas con 10-25 (-30) pares de foliólulos; estípulas glabras. Raíz cilíndrica, marrón. Legumbre de 2,2-8,8 cm long., linear, con ápice atenuado, glabra, 9-27 seminada. Hierbas o subarbustos hasta de 1,5 m de altura
..... ***D. virgatus***

En la Tabla I.1 se presentan las determinaciones taxonómicas de cada una de las poblaciones estudiadas. Al momento de la colecta, cada población fue documentada por un ejemplar que se herborizó y se conserva en el Herbario “Arturo E. Ragonese” (SF) de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), Universidad Nacional del Litoral (UNL). A continuación se presentan los datos de los ejemplares herborizados, los que corresponden a los sitios de colecta de cada una de las poblaciones estudiadas (ver Figura I.1):

Población 1 (*D. acuminatus*). Prov. Entre Ríos, Dpto. Nogoyá, ruta 39 y desvío a Lucas González, 32° 24′ 39,8″ S 59° 33′ 7,3″ W, 8-XII-2004, Pensiero *et al.* 6821 (SF)¹.

Población 2 (*D. paspalaceus*). Prov. Corrientes, Dpto. Santo Tomé, ruta 14, al N de Santo Tomé, en campos con *Aristida* sp., 28° 22′ 50,2″ S 56° 06′ 28,9″ W, 12-XII-2004, Pensiero *et al.* 6879 (SF)¹.

Población 3 (*D. paspalaceus*). Prov. Corrientes, Dpto. Santo Tomé, ruta 14, al S de Gobernador Virasoro, en banquina, 28° 07′ 28,4″ S 56° 03′ 03,3″ W, 12-XII-2004, Pensiero *et al.* 6883 (SF)¹.

Población 4 (*D. paspalaceus*). Prov. Misiones, Dpto. Candelaria, ruta 207, ± 1 km SE del cruce con la ruta 12, en banquina, 27° 28′ 01,7″ S 55° 40′ 37,5″ W, 13-XII-2004, Pensiero *et al.* 6884 (SF)¹.

Población 5 (*D. paspalaceus*). Prov. Chaco, Dpto. San Fernando, ruta 11, 53 km al S de Resistencia, en banquina y borde de alambrados, 27° 50′ 28,9″ S 59° 17′ 23,2″ W, 16-XII-2004, Pensiero *et al.* 6928 (SF)¹.

Población 6 (*D. paspalaceus*). Prov. Salta, Dpto. Rosario de la Frontera, Rosario de la Frontera, en banquina, 25° 45′ 17,7″ S 64° 56′ 40,8″ W, 18-III-2005, Pensiero *et al.* 6995 (SF)¹.

Población 7 (*D. virgatus* –sensu estricto-). Prov. Jujuy, Dpto. El Carmen, ruta 9, en banquina, 24° 32′ 15,5″ S 65° 04′ 50,7″ W, 19-III-2005, Pensiero *et al.* 7005 (SF)¹.

Población 8 (*D. virgatus* –sensu estricto-). Prov. Jujuy, Dpto. Ledesma, ruta 34, de Calilegua a Caimancito, en banquina, 23° 45′ 40,1″ S 64° 43′ 21,8″ W, 21-III-2005, Pensiero *et al.* 7059 (SF)¹.

Población 9 (*D. virgatus* –sensu estricto-). Prov. Santiago del Estero, Dpto. Rivadavia, ruta 34, 14 km al N de Selva, en banquina, 29° 40′ 44,5″ S 62° 07′ 49,0″ W, 24-III-2005, Pensiero *et al.* 7093 (SF)¹.

Población 10 (*D. paspalaceus*). Prov. Santa Fe, Dpto. General Obligado, ruta 100s, 1 km al W de ruta 11, camino a Villa Guillermina, 28° 18′ 30″ S 59° 16′ 29,3″ W, 16-XII-2004, Pensiero *et al.* 6932 (SF)¹.

1- Nº de colección correspondiente al catálogo del Dr. Pensiero (FCA-UNL).

I.2.2. Características fitogeográficas, climáticas y edáficas de los sitios de procedencia de la colección de plantas del complejo *D. virgatus*.

I.2.2.1. Características fitogeográficas de los sitios de colecta.

En distintas localidades del centro y norte de la República Argentina se colectaron diez poblaciones de plantas de *D. virgatus* (*sensu lato*), según se muestra en la Figura I.1.

Desde el punto de vista fitogeográfico, las poblaciones colectadas corresponden a las provincias Chaqueña (Distrito Oriental y Distrito Occidental) y Espinal (Distrito Ñandubay) del Dominio Chaqueño, y a las provincias Paranaense (Distrito de los Campos) y de las Yungas (Distrito Selvas de Transición) del Dominio Amazónico.



En nuestro país, el Dominio Chaqueño cubre la mayor parte de la superficie del territorio. El clima es variado predominando el continental, con lluvias moderadas a escasas. La vegetación es polimorfa, con bosques xerófilos caducifolios, estepas

herbáceas o arbustivas, sabanas y praderas. En Argentina este Dominio se halla representado por cinco Provincias Fitogeográficas: Chaqueña, del Espinal, Prepuneña, del Monte y Pampeana, (Cabrera, 1994).

El Dominio Amazónico ocupa una superficie reducida de Argentina, su clima es cálido y húmedo, con una vegetación predominante de tipo selvática. En Argentina a este Dominio pertenecen las Provincias Fitogeográficas Paranaense y de las Yungas (Cabrera, 1994).

En la Tabla I.1. se presentan el dominio y provincia fitogeográfica, la provincia política y la determinación taxonómica de cada una de las poblaciones de plantas del complejo *D. virgatus* analizadas en este trabajo.

La Provincia Chaqueña posee en Argentina 4 Distritos: Chaqueño Oriental, Chaqueño Occidental, Chaqueño Serrano y de las Sabanas. El Distrito Chaqueño Oriental, al que pertenecen las poblaciones 5 y 10, se caracteriza por poseer un clima más húmedo que los restantes distritos de la provincia, con precipitaciones en general mayores a 950 mm anuales, las que van disminuyendo de este a oeste. La vegetación típica de este Distrito es el bosque xerofítico de quebracho colorado (*Schinopsis balansae*) y quebracho blanco (*Aspidosperma quebracho-blanco*), acompañadas por quayacán (*Caesalpinia paraguariensis*), espina corona (*Gleditsia amorphoides*), guaraniná (*Sideroxylon obtusifolium*), viraró (*Ruprechtia laxiflora*) y guayaibí (*Patagonula americana*), entre otras. Existen, además de los quebrachales, otros bosques en los que se encuentran numerosas especies leñosas y herbáceas, y otros tipos de vegetación, como parques, sabanas, pajonales, praderas y canutillares. Las plantas de la población 5 se colectaron próximas a la localidad de San Fernando, en ambiente de banquina aladaña a la ruta nacional 11, al sur de Resistencia, provincia de Chaco. La población 10 se colectó en ambientes próximos a la banquina de la ruta provincial 100s, camino a la localidad de Villa Guillermina, provincia de Santa Fe, en un sitio donde además crecían *Sporobolus indicus*, *Themeda quadrivalvis*, *Desmodium incanum* y *Galactia striata*.

Tabla 1.1: Determinación taxonómica, Dominio, Provincia y Distrito Fitogeográfico, y Provincia y Departamento de la colección de poblaciones del complejo *D. virgatus*.

| Población de plantas (Id)^a | Determinación Taxonómica | Dominio Fitogeográfico^b | Provincia Fitogeográfica^b (Distrito) | Provincia (Departamento) |
|--|--|---|--|------------------------------------|
| 1 (6821) | <i>D. acuminatus</i> | Chaqueño | Espinal Distrito Ñandubay | Entre Ríos (Nogoyá) |
| 2 (6879) | <i>D. paspalaceus</i> | Amazónico | Paranaense Distrito de los Campos | Corrientes (Santa Tomé) |
| 3 (6883) | <i>D. paspalaceus</i> | Amazónico | Paranaense Distrito de los Campos | Corrientes (Santa Tomé) |
| 4 (6884) | <i>D. paspalaceus</i> | Amazónico | Paranaense Distrito de los Campos | Misiones (Candelaria) |
| 5 (6928) | <i>D. paspalaceus</i> | Chaqueño | Chaqueña Distrito Oriental | Chaco (San Fernando) |
| 6 (6995) | <i>D. paspalaceus</i> | Chaqueño | Chaqueña Distrito Occidental | Salta (Rosario de la Frontera) |
| 7 (7005) | <i>D. virgatus</i> (sensu estricto) | Amazónico | Yungas Distrito Selvas de Transición | Jujuy (El Carmen) |
| 8 (7059) | <i>D. virgatus</i> (sensu estricto) | Amazónico | Yungas Distrito Selvas de Transición | Jujuy (Ledesma) |
| 9 (7093) | <i>D. virgatus</i> (sensu estricto) | Chaqueño | Chaqueña Distrito Occidental | Santiago del Estero (Rivadavia) |
| 10 (6932) | <i>D. paspalaceus</i> | Chaqueño | Chaqueña Distrito Oriental | Santa Fe (General Obligado) |

^a: Nº de colección correspondiente al catálogo del Dr. Pensiero (FCA-UNL). ^b: Cabrera (1994)

El Distrito Occidental de la Provincia Chaqueña, al que pertenecen las poblaciones 6 y 9, posee un clima más seco en relación con el anterior, con precipitaciones que van de 500 a 900 mm anuales. Si bien la comunidad climática de este Distrito es el bosque xerofítico de quebracho colorado santiagueño (*Schinopsis lorentzii*) y quebracho blanco (*Aspidosperma quebracho-blanco*), acompañados por la brea (*Cercidium praecox*), mistol (*Ziziphus mistol*) y el itín (*Prosopis kuntzei*), entre otras, son frecuentes los bosques y sabanas de caranday (*Copernicia alba*), además de estepas arbustivas y herbáceas. La población 6 fue colectada en un ambiente de banquina, próximo a la localidad de Rosario de la Frontera, provincia de Salta. Las plantas de la población 9 se obtuvieron también en un ambiente próximo a una banquina, al norte de Selva, provincia de Santiago del Estero, conviviendo con distintas gramíneas cespitosas, entre las que se destacaban algunas especies del género *Paspalum*.

La Provincia del Espinal, posee clima cálido y húmedo, con abundantes precipitaciones a fines de primavera y verano, y está representada por tres distritos: del Ñandubay, del Algarrobo y del Calden. En el Distrito del Ñandubay, donde se colectó la población 1, la vegetación climax es el bosque de ñandubay (*Prosopis affinis*), en el que se encuentran además otras especies como el algarrobo negro (*Prosopis nigra*), chañar (*Geoffroea decorticans*) y tala (*Celtis ehrenbergiana*), entre otras. Las plantas correspondientes a esta población se colectaron en un campo próximo a la localidad de Nogoyá, sobre la ruta nacional 39 y el acceso a la ciudad de Lucas González. En el sitio de colecta, las plantas de *D. virgatus (sensu lato)* se hallaban junto a gramíneas del género *Aristida*.

La Provincia Paranaense presenta un clima cálido y húmedo, con precipitaciones durante todo el año, los suelos son lateríticos formados por finas partículas y los tipos de vegetación se hallan caracterizados por selvas y sabanas. Esta provincia se halla representada por dos Distritos, el de las Selvas Mixtas y de los Campos. Las poblaciones 2, 3 y 4 fueron colectadas en el Distrito de los Campos, el que se caracteriza por sus sabanas gramíneas que alternan con pequeños bosques y matorrales. Las plantas de la población 2 se colectaron en un campo situado al norte de la ciudad de Santo Tomé, en un sitio en el que la vegetación estaba conformada por distintas especies de gramíneas, entre las que se destacaban aquellas de los géneros *Aristida* y *Axonopus*. La población 3

fue recolectada en una banquina aledaña a la ruta nacional 14, al sur de la ciudad de General Virasoro, en la provincia de Corrientes. La población 4 se obtuvo de una banquina, en donde crecían junto a plantas cespitosas del género *Axonopus*.

A la Provincia Fitogeográfica de las Yungas, corresponden en nuestro país tres Distritos: el de la Selva de Transición, Selvas Montanas y el de los Bosques Montanos. En esta región el clima también es cálido y húmedo, pero con lluvias principalmente estivales y heladas durante el invierno. El relieve exhibe montañas escarpadas, quebradas, valles y llanuras onduladas al pie de las montañas. Los tipos de vegetación son selvas, bosques montanos y praderas. El Distrito de la Selva de Transición (o Bosque Pedemontano), al que pertenecen las poblaciones 7 y 8, se ubica entre los 400 y 700 msnm y limita al este con el Distrito Occidental de la provincia Chaqueña. En este Distrito son típicas las selvas de palo blanco (*Calycophyllum multiflorum*), las palo amarillo (*Phyllostylon rhamnoides*), y más al sur las selvas de tipa (*Tipuana tipu*) y de pacará (*Enterolobium contortisiliquum*). La población 7 se colectó próximo a la localidad del Carmen, en una banquina cercana a la ruta nacional 9, junto con las gramíneas *Trichloris pluriflora* y *Setaria macrostachya*. Las plantas de la población 8 se colectaron en las proximidades de la localidad de Ledesma, en una banquina aledaña a la ruta nacional 34, Calilegua y el municipio de Caimancito.

1.2.2.2. Características climáticas de los sitios de procedencia de las poblaciones del complejo *D. virgatus*.

El crecimiento y desarrollo de las plantas dependerá de la actividad del sistema fotosintético, el cual se halla funcionalmente relacionado con el clima del hábitat particular a través del flujo de energía, de dióxido de carbono y de nutrientes minerales del suelo (Baruch y Fisher, 1991). Las pasturas poseen características morfológicas y fisiológicas propias que le brindarán una adaptación específica. Sin embargo, podrían experimentar modificaciones en su rendimiento y calidad cuando ocurran cambios en las condiciones climáticas, donde los factores más importantes son la temperatura, la radiación solar, y la cantidad y distribución de las precipitaciones (Del Pozo Rodríguez, 2002).

Las plantas de *D. virgatus* poseen una distribución natural en climas tropicales húmedos y subhúmedos, rebrotando después de heladas leves (Pengelly *et al.*, 2006).

En la Tabla I.2. se muestran las características climáticas de los sitios de colectas de las distintas poblaciones del complejo *D. virgatus*. Los registros climáticos indican que los sitios de origen de las plantas corresponden a zonas con climas cálidos tropicales, con y sin estación seca, cálidos subtropicales serranos y templados pampeano húmedos.

En las regiones fitogeográficas de pertenencia de las poblaciones se han reportado temperaturas máximas absolutas mayores a 40°C (Cabrera, 1994). La temperatura controlará todas las reacciones bioquímicas de las plantas y afectará los procesos de fotosíntesis, respiración, transpiración, absorción de agua y nutrientes, transporte de compuestos y actividad enzimática. Por ende, la temperatura actuará en forma directa afectando el crecimiento y metabolismo de las pasturas (Bernal, 2003) e indirecta modificando la actividad biológica del suelo, principalmente la mineralización y la fijación de nitrógeno. Con respecto a la ocurrencia de precipitaciones, el volumen de agua caída y su distribución a través del año ejercerán efectos notables en el crecimiento y calidad de las pasturas, debido a su estrecha relación con los factores bioquímicos y fisiológicos que regulan estos procesos biológicos (Del Pozo Rodríguez, 2002).

Las plantas de *D. paspalaceus* de las poblaciones 2, 3, 4, 5, y 10 se colectaron en una región de clima cálido subtropical sin estación seca, con una temperatura media anual superior a 20°C y abundantes precipitaciones distribuidas durante todas las estaciones del año.

A la región de clima cálido subtropical con estación seca, correspondieron las poblaciones 6 y 9, cuyas características climáticas son similares a la zona anterior, pero presentan un lapso de tiempo donde las precipitaciones son más escasas y estivales.

Las plantas de *D. virgatus* (sensu estricto) de las poblaciones 7 y 8 se colectaron en una zona de clima tropical serrano, con lluvias estivales y heladas frecuentes durante el invierno. En esta zona, se presenta una gran amplitud térmica con elevadas temperaturas diurnas durante todo el año. En verano, especialmente durante los meses de diciembre y enero, las temperaturas absolutas pueden alcanzar 46°C y en las noches invernales las temperaturas disminuyen de los 10°C.

Tabla I.2: Características climáticas^a de los sitios de origen de la colección de poblaciones de plantas del complejo *D. virgatus*.

| Población de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> ^b | Precipitación anual (mm) | Temperatura anual (°C) | | | Días anuales helada | Humedad relativa anual (%) |
|---|--------------------------|------------------------|-------|------|---------------------|----------------------------|
| | | Máx. | Media | Mín. | | |
| 1- <i>D. acuminatus</i> | 1121,5 | 23,7 | 18,0 | 12,3 | 9,0 | 71,5 |
| 2- <i>D. paspalaceus</i> | 1807,1 | 26,4 | 21,0 | 15,6 | 1,7 | 71,7 |
| 2- <i>D. paspalaceus</i> | 1827,9 | 26,6 | 21,2 | 15,8 | 1,5 | 71,6 |
| 4- <i>D. paspalaceus</i> | 1920,8 | 26,9 | 21,6 | 16,2 | 0,9 | 71,3 |
| 5- <i>D. paspalaceus</i> | 1356,2 | 26,7 | 21,0 | 15,3 | 3,0 | 72,1 |
| 6- <i>D. paspalaceus</i> | 924,9 | 25,5 | 19,2 | 13,0 | 12,8 | 69,2 |
| 7- <i>D. virgatus</i> | 742,9 | 24,7 | 17,8 | 10,9 | 33,1 | 67,2 |
| 8- <i>D. virgatus</i> | 761,9 | 25,3 | 18,2 | 11,1 | 46,4 | 64,9 |
| 9- <i>D. virgatus</i> | 954,9 | 25,7 | 19,3 | 13,1 | 10,6 | 71,2 |
| 10- <i>D. paspalaceus</i> | 1313,5 | 26,2 | 20,9 | 15,5 | 2,6 | 72,9 |

^a: Datos obtenidos de GeolNTA (<http://geointa.inta.gov.ar/visor>).

^b: Provincia y departamento de origen de cada población se detallan en Tabla I.1.

A la zona de clima templado pampeano húmedo, correspondieron las plantas de la población 1, caracterizada por presentar una temperatura media anual inferior a la registrada en las zonas anteriores y un volumen adecuado de precipitaciones distribuidas uniformemente a lo largo del año.

1.2.2.3. Características edáficas de los sitios de origen de las poblaciones del complejo *D. virgatus*.

La composición edáfica adecuada para el crecimiento de las plantas de *D. virgatus* se halla en una sucesión de tipos de suelos, desde arenosos a arcillosos y rocosos, de textura media a gruesa y con un pH de 5 a 7 (Pengelly *et al.*, 2006). Desde el punto de vista agronómico, *D. virgatus* se cultiva productivamente en suelos ligeros de reacción neutra a alcalina, destacándose por tolerar suelos con baja fertilidad y anegamientos temporarios.

En la Tabla I.3. se presentan las características edáficas más relevantes de los sitios de origen de la colección de plantas del complejo *D. virgatus*.

Las distintas poblaciones de plantas se colectaron según una distribución altitudinal desde 51 a 787 msnm. En América Latina, *D. virgatus* se encuentra entre el nivel del mar y 2000 m, siendo su hábitat más frecuente a niveles inferiores a 500 m (FAO, 2010). En la región centro y norte de México se distribuye desde los 650 m a los 2000 m (Andrade *et al.*, 2007).

Las plantas de la población 1 fueron colectadas en un ambiente con suelos del orden Vertisol, caracterizados por presentar altos contenidos de arcillas de gran capacidad de absorción de agua. Los procesos de desecación y humectación producirían tensiones internas en el perfil, que ocasionarían la formación de movimientos diferenciales de la masa de suelo, grietas profundas y el desarrollo de un micro-relieve ondulado. Las plantas de *D. acuminatus* fueron extraídas de suelos arcillosos con problemas de drenaje deficiente, que presentarían exceso de agua en los periodos lluviosos. La ocurrencia de precipitaciones anuales superiores a 1000 mm (ver Tabla I.2) ocasionaría el escurrimiento superficial del agua generando problemas de erosión hídrica.

Las poblaciones 2 y 3 de *D. paspalaceus* fueron extraídas de suelos ultisoles, característicos de la provincia de Corrientes, que presentaron un horizonte argílico de poco espesor, de coloración pardo rojizo oscuro y textura arcillosa. Las principales limitantes edáficas de estos sitios de colectas fueron la baja fertilidad de los suelos y la susceptibilidad a la erosión hídrica.

En suelos alfisoles, denominados comúnmente “lavados” debido a sus horizontes superficiales de colores claros y estructura masiva, seguido de horizontes muy arcillosos, se colectaron las poblaciones 4, 5 y 10. Si bien, estas plantas se extrajeron en suelos de banquina, los alfisoles se utilizan para pastoreo de ganado, como pasturas naturales o pasturas tolerantes a exceso de agua y sodio.

Tabla I.3: Características edáficas^a de los sitios de origen de la colección de poblaciones de plantas del complejo *D. virgatus*.

| Población de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> ^b | Posición suelo | P ^d (%) | Cota (m) | Orden Suelo ^e | Textura | Limitante principal | IP ^f |
|---|---------------------|--------------------|----------|--------------------------|-----------------------|--|-----------------|
| 1- <i>D. acuminatus</i> | Loma | 1 | 84 | Vertisoles | Arcillo-limosa | Erosión hídrica | 28 |
| 2- <i>D. paspalaceus</i> | Loma | 6 | 81 | Ultisoles | Arcillosa | Erosión hídrica | 29 |
| 3- <i>D. paspalaceus</i> | Loma | 6 | 81 | Ultisoles | Arcillosa | Erosión hídrica | 42 |
| 4- <i>D. paspalaceus</i> | ND ^c | 0 | 165 | Alfisoles | ND ^c | Erosión hídrica | 29 |
| 5- <i>D. paspalaceus</i> | Loma | 1 | 51 | Alfisoles | Franca | Alcalinidad menos 50cm | 14 |
| 6- <i>D. paspalaceus</i> | Pendiente escarpada | 5 | 787 | Entisoles | Areno-gravosa | Pendientes | 6 |
| 7- <i>D. virgatus</i> | Llanura extendida | 3 | 769 | Molisoles | Franco-arcillo-limoso | Erosión hídrica | 65 |
| 8- <i>D. virgatus</i> | Sector apical | 5 | 457 | Molisoles | Franco-arcillosa | Susceptibilidad Erosión hídrica | 74 |
| 9- <i>D. virgatus</i> | Planicie | 0 | 85 | Molisoles | Franco-arcillo-limoso | Susceptibilidad inundación o anegamiento | 18 |
| 10- <i>D. paspalaceus</i> | Plano inundable | 0 | 51 | Alfisoles | Arcillo-limosa | Susceptibilidad inundación o anegamiento | 32 |

^a: Datos obtenidos de GeolINTA (<http://geointa.inta.gov.ar/visor>).

^b: Provincia y departamento de origen de cada población se detallan en Tabla I.1.

^c: ND: No Determinado

^d: P: Pendiente

^e: Sistema de clasificación "Soil Taxonomy"

^f: IP: Índice de productividad

La población 6, procedente de Salta, fue colectada en un suelo del orden Entisol, representado por un escaso desarrollo pedogenético, con un horizonte superficial claro de poco espesor y pobre contenido de materia orgánica. Las limitantes edáficas de estos sitios fueron las pendientes y la somera profundidad efectiva. Dicho suelo de textura areno-gravosa mostró el menor índice de productividad de los sitios de origen de la colección del complejo *D. virgatus*.

En suelos molisoles, caracterizados por un epipedón mólico de estructura granular, bien provistos en materia orgánica y contenido de nutrientes, fueron colectadas las plantas de las poblaciones 7, 8 y 9. Las poblaciones originarias de la provincia de Jujuy fueron extraídas de suelos con textura franco-arcillo-limosa y franco-arcillosa, en zonas que mostraron los mayores índices de productividad. Las plantas procedentes de Santiago del Estero fueron recolectadas en suelos que presentaron susceptibilidad a la inundación o anegamiento y muy bajos índices de productividad.

1.2.2.3.1. Propiedades químicas de los suelos de origen de las poblaciones del complejo *D. virgatus*.

La naturaleza química del suelo controla el suplemento y la disponibilidad de los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas. La actividad química del suelo dependerá de la cantidad y naturaleza de las arcillas y del contenido de materia orgánica. Estos parámetros a su vez dependerán de las condiciones climáticas y de la edad del suelo (Bernal, 2003). Las condiciones físico-químicas del suelo en el que crezcan las plantas tendrán un marcado efecto sobre los rizobios, ya que afectarán tanto la supervivencia como la capacidad de infectar los pelos radicales.

Según se muestra en la Tabla I.4. las propiedades químicas de los suelos presentaron características diferenciales entre los distintos sitios de origen de las poblaciones del complejo *D. virgatus*. Los suelos de colecta de las plantas mostraron un amplio rango en los contenidos de materia orgánica, con valores porcentuales que fluctuaron entre 1,99 y 4,90. Puede observarse que los sitios de origen presentaron contenidos de materia orgánica pobres a aceptables, a excepción del suelo de procedencia de la población 10 (provincia de Santa Fe).

Las cantidades de nitrógeno (N) presentes en el suelo se hallan controladas por las condiciones climáticas, vegetación, topografía, material parental y actividades humanas. Una gran proporción del N total en el suelo se encuentra en forma orgánica, el cual a través de complejos procesos de descomposición se transformará en compuestos inorgánicos disponibles para las plantas. Los contenidos de N orgánico total de los suelos de origen de la colección fueron bajos, destacando que los sitios de procedencia de la población 2 (Corrientes) y 6 (Salta) presentaron contenidos de N orgánico deficientes.

Tabla I.4: Propiedades químicas^a de los suelos de origen de la colección de poblaciones de plantas del complejo *D. virgatus*.

| Población de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> ^b | Materia Orgánica ^c (%) | Nitrógeno orgánico total ^d (%) | Fósforo asimilable ^e (ppm) | pH ^f (rel.2:1) | Conductividad eléctrica ^g (dS/m) |
|---|-----------------------------------|---|---------------------------------------|---------------------------|---|
| 1- <i>D. acuminatus</i> | 2,10 | 0,102 | 10 | 7,8 | 0,224 |
| 2- <i>D. paspalaceus</i> | 3,03 | 0,074 | 7 | 6,0 | ND ^h |
| 3- <i>D. paspalaceus</i> | 2,97 | 0,114 | 6 | 5,4 | 0,039 |
| 4- <i>D. paspalaceus</i> | 3,38 | 0,132 | 7 | 5,7 | ND ^h |
| 5- <i>D. paspalaceus</i> | 2,63 | 0,130 | 10 | 6,8 | 0,146 |
| 6- <i>D. paspalaceus</i> | 1,99 | 0,091 | 7 | 7,2 | 0,145 |
| 7- <i>D. virgatus</i> | 2,59 | 0,123 | 23 | 6,8 | 0,089 |
| 8- <i>D. virgatus</i> | 2,11 | 0,100 | 17 | 6,9 | 0,105 |
| 9- <i>D. virgatus</i> | 2,23 | 0,119 | 47 | 6,9 | 0,082 |
| 10- <i>D. paspalaceus</i> | 4,90 | 0,227 | 22 | 6,2 | ND ^h |

^a: Según se detallan en Materiales y Métodos sección 1.2.

^b: Provincia y departamento de origen de cada población se detallan en Tabla I.1.

^c: Walkey y Black, (1934). ^d: Kjeldhal, AOAC, (1990). ^e: Bray y Kurtz, (1945).

^f: potenciometría MAG, (1982). ^g: Conductimetría, MAG, (1982). ^h: ND: No Determinado

Cabe mencionar que, el fósforo (P) es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo óptimo de las plantas, las cuales lo absorben de la solución del suelo en forma de iones ortofosfatos ($H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}). Se considera que el P es un elemento crítico para la nutrición vegetal, debido a su tendencia a reaccionar formando compuestos fosfatados no disponibles para las plantas. Por otro lado, la simbiosis leguminosa-rizobio es

altamente sensible a la carencia de P, ya que este elemento forma parte de las moléculas de ATP responsables de la liberación e intercambio de la energía. De este modo, el P resulta indispensable para lograr una adecuada fijación biológica de nitrógeno.

Los suelos de origen de las poblaciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 presentaron contenidos de fósforo asimilable muy bajos, mostrando valores que oscilaron entre 6 y 10 ppm (ver Tabla I.4). En estos lugares, la escasez de P asimilable jugaría un rol importante en el proceso de nodulación. Diversos investigadores sugirieron que las leguminosas sometidas a un inadecuado suministro de nutrientes, especialmente P, reducirán la nodulación limitando el crecimiento y desarrollo vegetativo (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1991; Tsai *et al.*, 1993; de Oliveira *et al.*, 1998).

El pH del suelo es un factor que ejerce una gran influencia en la asimilación de distintos elementos nutritivos. Los suelos de procedencia de las poblaciones del complejo *D. virgatus* mostraron un amplio rango de pHs, con valores que fluctuaron entre 5,4 y 7,8 (Tabla I.4.). No obstante, el 50 % de los sitios de la colección presentó valores cercanos a la neutralidad, que indican condiciones favorables tanto para el crecimiento y desarrollo de las plantas como para la sobrevivencia de los rizobios en el suelo.

Por otro lado, la acidez o alcalinidad de los suelos afecta el crecimiento de las plantas a través de su efecto en la disponibilidad de nutrimentos (relación entre fósforo disponible y pH) y en la actividad de los microorganismos del suelo.

Según Wild (1992), los efectos de la acidez del suelo sobre el crecimiento vegetal se manifestarán a través de efectos del pH como tal en la fisiología de las raíces y en las propiedades del suelo. Asimismo, la acidez afectaría las distintas etapas de la simbiosis leguminosa-rizobios, desde la supervivencia y multiplicación de los rizobios en el suelo, la infección y nodulación hasta la FBN (Frioni, 1999). En este aspecto, los sitios de origen de las poblaciones de Corrientes y Misiones mostraron niveles de pHs de suelo que oscilaron desde mediano a fuertemente ácidos, característica edáfica predominante en la provincia fitogeográfica de procedencia. En suelos ácidos los iones ortofosfatos reaccionan con metales como hierro y aluminio formando compuestos minerales insolubles que impedirán la disponibilidad de este nutrimento para las plantas, generando una acumulación tóxica que afectaría el crecimiento vegetativo de raíces, tallos y ramas. Además, otra limitante para el desarrollo de las plantas forrajeras en suelos ácidos es la

toxicidad del manganeso (Mn), nutrimento que en estos niveles de pH permanece en estado insoluble. Por otro lado, en suelos ácidos pueden ocurrir deficiencias en la nutrición mineral de elementos como calcio (Ca), magnesio (Mg), potasio (K) y P tanto para las plantas huéspedes como para los rizobios (Pérez-Galdona y Kahn, 1994). Sin embargo, la severidad de estas deficiencias y toxicidades depende del hábitat en que crezcan las plantas y, especialmente, del grado de adaptación de éstas al ambiente descripto (Ayarza, 1991).

Los suelos originarios de las plantas de *D. acuminatus* (provincia de Entre Ríos) se destacaron por presentar una ligera alcalinidad que podría reducir la disponibilidad de los iones ortofosfatos para las plantas, ya que ocurriría la precipitación de sales de fósforo al reaccionar con cationes como Ca o Mg formando fosfatos insolubles.

Con respecto a la salinidad, los suelos de procedencia de la colección de plantas mostraron un rango de valores de conductividad eléctrica que osciló entre 0,039 y 0,224 dS/m (Tabla I.4.). El suelo de la población 1 presentó los mayores valores de conductividad eléctrica en relación al total de muestras de la colección. Cabe mencionar que, los sitios de origen del complejo *D. virgatus* fueron considerados suelos normales en función de su salinidad, ya que no presentaron un exceso de sales solubles, cuyos iones en la solución del suelo dificultarían el desarrollo normal de las plantas.

I.2.3. Características morfológicas de las poblaciones cultivadas del complejo *D. virgatus*.

Las poblaciones de plantas colectadas en el centro y norte de nuestro país correspondieron a tres especies que integran el complejo taxonómico “*virgatus*” del género *Desmanthus*: *D. acuminatus*, *D. paspalaceus* y *D. virgatus* (sensu estricto).

Las plantas de *D. acuminatus* de la población 1 (ver Figura I.2.) se distinguieron claramente de las otras especies del complejo, por su hábito postrado a decumbente, menor altura de planta,

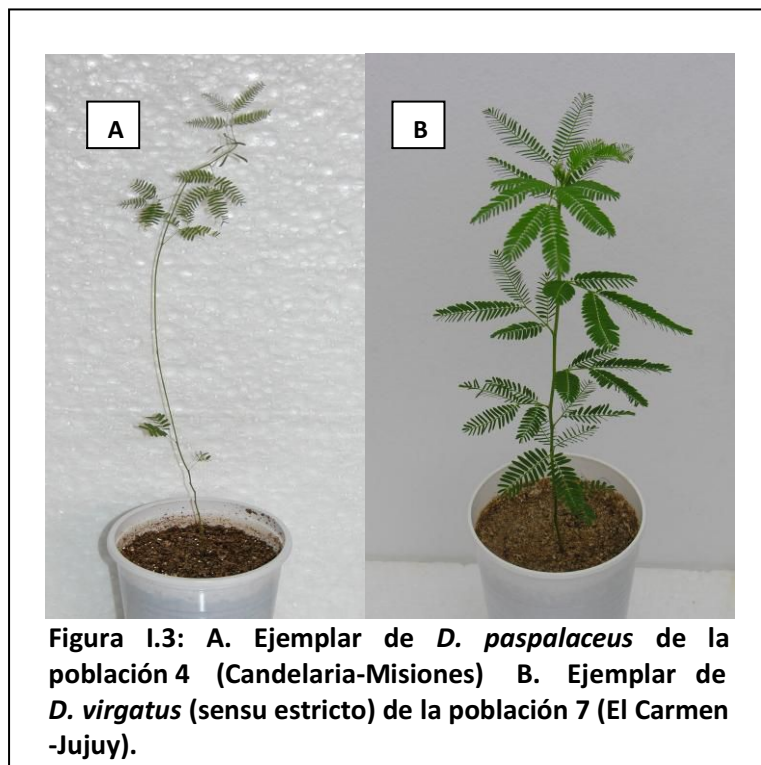


ramas laterales profusas desde la corona; raíz napiforme conspicua, de color rojizo; hojas con 5 a 9 pares de pinnas de contorno oblongo; inflorescencias con 6 a 13 flores por cabezuela; frutos lineares, ligeramente curvos.

Las poblaciones restantes de la colección, determinadas taxonómicamente como *D. paspalaceus* y *D. virgatus* (sensu estricto) se caracterizaron por presentar un hábito de crecimiento erecto o semi-erecto, menor número de ramas laterales de menor longitud que las registradas en la especie anterior; y hojas con mayor número de pares de foliólulos por pinna (ver Figura I.3.).

Las plantas de *D. virgatus* (sensu estricto) fueron las que mostraron mayor altura de las especies de la colección, con varias ramas creciendo desde la base; un xilopodio leñoso, corchoso, de forma cilíndrica, de poco espesor y corteza de color marrón; un mayor tamaño de hoja, con 2 a 5 pares de pinnas de contorno oblongo y 10 a 25 pares de foliólulos de similar longitud desde el ápice a la base, según se muestra en la Figura I.3.B.

Las plantas de *D. paspalaceus* se caracterizaron por presentar menor altura en relación con la especie anterior y una escasa ramificación basal; una raíz principal napiforme, leñosa, de corteza lisa y color gris o rojizo; hojas con 1 a 4 (generalmente 3) pares de pinnas de contorno lanceolado y 20 a 50 pares de foliólulos, cuyo tamaño disminuye desde el ápice a la base (Figura I.3. A.).



Las plantas provenientes de los distintos sitios de colecta se mantuvieron en cultivo en el *Jardín de Introducción del Campo Experimental* de la FCA-UNL. Durante los meses de febrero y marzo de cada año, se cosecharon en forma manual los frutos maduros de cada una de las poblaciones del complejo *D. virgatus*. Las semillas obtenidas fueron conservadas y parte de ellas se emplearon posteriormente para obtener las plantas que se utilizaron en los ensayos en cámara de crecimiento. Las semillas de las poblaciones analizadas se conservan en la actualidad en el Banco de Germoplasma de la EEA Pergamino del INTA.

I.3. Conclusiones.

En este capítulo se ha presentado la construcción de una colección de poblaciones del complejo *D. virgatus*. Las plantas fueron extraídas de diez sitios correspondientes a ocho provincias de Argentina, lo cual confirma su amplia distribución y adaptabilidad.

La descripción y el análisis realizado mostraron que las poblaciones fueron colectadas en zonas de climas cálidos tropicales y subtropicales, como así también en zonas templadas y húmedas. Asimismo, las plantas crecieron óptimamente en suelos con características edáficas muy variadas y de naturaleza química diferentes. De este modo, las plantas del género *Desmanthus* mostraron un amplio rango de adaptación a diferentes zonas ecológicas, indicando que el centro y norte de nuestro país presenta un alto potencial como fuente de germoplasma del complejo *D. virgatus*.

Las poblaciones de plantas adaptadas a las condiciones locales de suelo y clima, y a los factores bióticos dominantes constituyen recursos naturales de gran valor. Dichos recursos presentan un doble valor, por un lado como forrajeras potenciales y fuente de genes deseables para otras especies vegetales, y por otro como reservorio de germoplasma de las bacterias simbiotes presentes en los sitios de origen de las plantas del complejo *D. virgatus*.

Capítulo II

Establecimiento de una colección de aislamientos de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*, recuperados de suelos del centro y norte de la República Argentina.

II.1. Introducción.

Las leguminosas forrajeras nativas presentan un gran potencial productivo ya que constituyen excelentes fuentes de proteína y minerales para rumiantes en pastoreo, siendo un ejemplo de ellas el complejo taxonómico *Desmanthus virgatus (sensu lato)* integrado por las especies con valor forrajero *D. acuminatus*, *D. paspalaceus*, y *D. virgatus (sensu stricto)*, de amplia distribución en el centro y norte de nuestro país (ver Introducción General de esta tesis, sección 2.1.1.). Sin embargo, para su uso efectivo en la cadena de producción animal, las leguminosas forrajeras deberían ser capaces de otorgar forraje en cantidad y calidad, y además persistir y establecerse en las condiciones ecológicas del lugar. La habilidad de las plantas leguminosas para adaptarse a distintos tipos de suelos, en particular a aquellos de regiones marginales, depende en gran medida de la nodulación por rizobios eficientes para fijar nitrógeno atento a que dicho elemento es en muchos casos un factor limitante durante el crecimiento de las plantas (Zahran, 1999). Cabe destacar que los rizobios simbiotes de leguminosas nativas frecuentemente son más tolerantes a condiciones de estrés ambiental que los rizobios de leguminosas de cultivo. Así, los aislamientos nativos eficientes podrían ser utilizados para la inoculación de plantas cultivadas (Zahran, 1998).

En los últimos años se ha generado mucho conocimiento de base sobre rizobios tomados como modelos de estudio, en particular *S. meliloti* (simbionte de especies de los géneros *Medicago*, *Mellilotus* y *Trigonella*), *B. japonicum* (simbionte de soja) y *M. loti* (simbionte de diferentes especies del género *Lotus*). Los estudios con rizobios han demostrado una riqueza muy grande de sistemas simbióticos dentro de las leguminosas, constituidos por una diversidad muy marcada de rizobios, con constituciones genómicas (cromosomales y plasmídicas) muy diversas. Este último hecho hace en muchos casos difícil la taxonomía de rizobios.

Lamentablemente, las características simbióticas y la diversidad biológica de los rizobios asociados a plantas nativas ha sido particularmente poco explorada a pesar de la función ecológica y agroeconómica que presentan en diversos ecosistemas naturales.

En nuestro país son escasos los estudios sobre la diversidad del género *Desmanthus*, así como las evaluaciones agronómicas del mismo (Hack *et al.*, 2005; Zabala *et al.*, 2008).

Además, existe poca información acerca de la nodulación y fijación de nitrógeno de las distintas especies de *Desmanthus* spp. en asociación con rizobios nativos. Pedraza *et al.* (2001) mostraron que plantas cultivadas de *D. virgatus* cv Jaribu formaron nódulos espontáneamente con rizobios en suelos de la llanura Deprimida Salina de la provincia de Tucumán. Sin embargo, aún no se han realizado estudios sistemáticos de caracterización de los microsimbiontes del género *Desmanthus* existentes en suelos argentinos. **En este contexto, el relevamiento y caracterización molecular y simbiótica de las poblaciones de rizobios nativos presentes en nuestros suelos constituirá una valiosa herramienta hacia la selección de potenciales cepas inoculantes para ser utilizadas en suelos de cultivo locales.**

Un primer paso importante hacia el mejoramiento de la asociación rizobio- complejo *D. virgatus* en los suelos de nuestro país, es sin duda la construcción y caracterización de una colección de rizobios nativos. De ese modo, por un lado puede evaluarse el tipo de germoplasma presente en los propios suelos, para luego en una etapa posterior abordar la selección de aquellas cepas que resulten más eficientes en su simbiosis con *Desmanthus* y a su vez más tolerantes a condiciones de estreses abióticos. En relación a esta última posibilidad, no debe descartarse que sobre las poblaciones de rizobios nativos haya existido una selección positiva a favor de aquellas variantes genéticas más tolerantes y adaptadas en su simbiosis a las condiciones agroecológicas propias de los diferentes sitios de origen.

El objetivo de este capítulo fue construir y establecer una colección de aislamientos noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos con características edafoclimáticas diferentes, procedentes de diez localidades del centro y norte de la República Argentina.

Los estudios sobre las poblaciones y diversidad de bacterias locales noduladoras de *Desmanthus* spp. dependieron del aislamiento inicial de los rizobios. Para poder aislar bacterias noduladoras en una población microbiana diversa, como la que habita frecuentemente en el suelo, se requiere de un método que separe claramente los microsimbiontes de las otras especies bacterianas, permitiendo a su vez un muestreo fácil

y sistemático de los nódulos. Las estructuras nodulares pueden muestrearse a partir de plantas cultivadas en el campo (colecciones *in situ*), sin embargo, esta metodología resulta muchas veces compleja en el caso de plantas hospederas perennes o leñosas (Moreira *et al.*, 1992; Odee *et al.*, 1995). Alternativamente, los simbiosites pueden aislarse a partir de nódulos generados en ensayos de nodulación en condiciones controladas, en cámara de crecimiento de plantas o en invernáculo, usando muestras de suelo o suspensiones del mismo. Cuando se quiere caracterizar la generalidad de rizobios presentes, esto es no sólo los que nodulan una especie particular de leguminosa, Moreira *et al.* (2012), sugieren capturar rizobios utilizando hospederos promiscuos. Según datos de la literatura, una planta huésped promiscua ampliamente reconocida y de fácil manipulación en condiciones controladas es *M. atropurpureum* (Vincent, 1970). En la mayoría de los casos se ha reportado que dicha especie suele establecer simbiosis con bacterias del género *Bradyrhizobium* (Woomer *et al.*, 1988), aunque puede ser nodulada por especies de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (Bromfield y Barran, 1990), *Mesorhizobium loti* (Jordan, 1984) y *Burkholderia* sp. (Lima *et al.*, 2009) (esta última una β -proteobacteria). De manera similar, también se podrían utilizar otros hospederos de baja especificidad como *V. unguiculata* (caupí), *P. vulgaris* (poroto) o especies de leguminosas nativas.

En nuestro caso, atento al objetivo central de caracterizar rizobios noduladores de *Desmanthus*, nos abocamos a la colección de rizobios de nódulos radicales de dicha especie en condiciones de campo (difícil por tratarse de arbustos perennes con raíces axonomorfas y leñosas), y muy especialmente a partir de nódulos generados en ensayos de nodulación realizados en el laboratorio con muestras de diferentes suelos de origen donde se verificó la existencia del hospedador. Ambas estrategias estuvieron dirigidas a la obtención de rizobios potencialmente adaptados a las condiciones agroecológicas de los diferentes sitios de colecta de las plantas del complejo *D. virgatus*.

II.2. Resultados y discusión.

II.2.1. Evaluación de la nodulación rizobio-complejo *D. virgatus*.

Las evaluaciones de la formación de nódulos en las raíces de las plantas (número y aspecto –tamaño/color- de los mismos) pueden proporcionar una indicación indirecta del potencial de fijación de nitrógeno de las leguminosas, pero no se pueden utilizar para cuantificar la cantidad de nitrógeno fijado. A pesar de ello, constituyen un valioso complemento a otras mediciones contribuyendo a la evaluación e interpretación de las asociaciones simbióticas rizobios-leguminosa (Peoples y Herridge, 1990).

II.2.1.1. Evaluación de la nodulación rizobio-complejo *D. virgatus* en sus hábitats naturales.

La evaluación de la nodulación en las raíces de las plantas desarrolladas a campo se realizó a partir de muestras de ejemplares de cada población del complejo *D. virgatus* extraídos con suelo rizosférico en los diferentes sitios de colecta del centro y norte de Argentina, según se describe en la sección 5.1. de Materiales y Métodos (ver en el Capítulo I precedente la descripción de las diferentes poblaciones analizadas).

Las plantas procedentes de sus hábitats naturales presentaron un gran desarrollo del xilopodio (órgano radical de reserva de agua) con un estado avanzado de lignificación y escasas raíces secundarias. Las poblaciones de *D. virgatus* (sensu estricto) se distinguieron por poseer xilopodios leñosos, cilíndricos, pero de engrosamiento reducido. Sin embargo también mostraron sus raíces con avanzado estado de lignificación.

En la Tabla II.1. se presenta la evaluación de la nodulación de las diferentes poblaciones analizadas del complejo *D. virgatus* procedentes de sus hábitats naturales. El análisis de 48 ejemplares del complejo colectados en sus sitios de origen evidenció que solamente 21 plantas presentaron estructuras nodulares en sus raíces, habiendo observado plantas sin nódulos en la especie *D. acuminatus* y en todas las poblaciones de *D. paspalaceus* y *D. virgatus* (sensu estricto).

Tabla II.1: Evaluación de la nodulación de las diferentes poblaciones de plantas del complejo *D. virgatus* provenientes de sus hábitats naturales.

| Plantas analizadas del complejo <i>D. virgatus</i> | Provincia y departamento de origen | Proporción de plantas noduladas | N° de nódulos/raíz nodulada | |
|--|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|----------|
| | | | Totales | Promedio |
| 1- <i>D. acuminatus</i> (n ^a :4) | Entre Ríos (Nogoyá) | 0:4 | 0 | 0 |
| 2- <i>D. paspalaceus</i> (n:3) | Corrientes (SantaTomé) | 0:3 | 0 | 0 |
| 3- <i>D. paspalaceus</i> (n:4) | Corrientes (SantaTomé) | 2:4 | 10 | 5 |
| 4- <i>D. paspalaceus</i> (n:7) | Misiones (Candelaria) | 2:7 | 6 | 3 |
| 5- <i>D. paspalaceus</i> (n:4) | Chaco (San Fernando) | 1:4 | 1 | 1 |
| 6- <i>D. paspalaceus</i> (n:6) | Salta (Rosario de la Frontera) | 2:6 | 2 | 1 |
| 7- <i>D. virgatus</i> (n:6) | Jujuy (El Carmen) | 5:6 | 15 | 3 |
| 8- <i>D. virgatus</i> (n:4) | Jujuy (Ledesma) | 3:4 | 15 | 5 |
| 9- <i>D. virgatus</i> (n:4) | Santiago del Estero (Rivadavia) | 3:4 | 9 | 3 |
| 10- <i>D. paspalaceus</i> (n:6) | Santa Fe (General Obligado) | 3:6 | 9 | 3 |

^a n: número de plantas colectadas a campo de la población indicada.

La capacidad de la simbiosis leguminosa-rizobio para fijar nitrógeno depende de tres componentes, la leguminosa, los rizobios y el medio ambiente. Muchos factores ambientales como las altas temperaturas, el pH, especialmente en el intervalo de acidez, la humedad y las toxinas microbianas afectarán la capacidad de los rizobios para sobrevivir en el suelo (Lowendorf, 1980). También por efectos del ambiente el proceso de infección, la efectividad de la simbiosis y la senescencia de los nódulos experimentarán asimismo los efectos del medio ambiente.

En este marco tan complejo, en el cual intervienen diferentes condiciones ambientales y edafoclimáticas propias de los sitios de origen del complejo *D. virgatus*, se pudo observar que las plantas de las poblaciones 1 y 2 no presentaron nódulos durante el crecimiento y desarrollo en sus hábitats naturales. Ya sea por ausencia de rizobios en esos suelos, o por condiciones desfavorables para la nodulación. Resultados similares fueron obtenidos en la evaluación de distintos ecotipos nativos del género *Desmanthus* en suelos de la República Oriental del Uruguay (Illarze Dive, 2011).

Por otro lado, puede observarse en la Tabla II.1. que entre 75 % y 83 % de las plantas analizadas de la especie *D. virgatus* (sensu estricto) resultaron noduladas en sus ambientes naturales, marcando una diferencia con el resto de las especies a pesar que se analizó un número limitado de individuos. El adecuado contenido de fósforo (P) hallado en los suelos de origen de dichas poblaciones (y también en el suelo de origen de la población de *D. paspalaceus* proveniente de Santa Fe, ver sección 3.3.1. del Capítulo I) puede haber contribuido favorablemente al crecimiento de las plantas y a una mejor interacción con rizobios nativos. A excepción de las plantas originarias de Corrientes (población 3), en los restantes sitios de procedencia el contenido de P fue muy bajo. El escaso contenido de P disponible en el suelo provoca síntomas de clorosis y escaso desarrollo vegetativo en las plantas de *D. virgatus* (Spies *et al.*, 1998). Así, la carencia de P que resulta limitante para el crecimiento de las plantas, también reduce la demanda de nitrógeno (N) y por tanto la necesidad de desarrollo de la simbiosis. Deberá considerarse con atención si la disminución o falta de nodulación en algunas de las poblaciones se origina en la escasez o ausencia de rizobios en sus suelos de origen, o a otros factores de estrés incluido el nutricional de P al que hemos hecho referencia. No hemos analizado si las plantas de *Desmanthus* que hemos colectado han formado asociaciones mutualistas con hongos del suelo. Diversos investigadores han sugerido que las leguminosas podrían establecer asociaciones simbióticas con hongos endomicorrícicos, favoreciendo la adquisición de fósforo en suelos con baja disponibilidad de este elemento (Requena *et al.*, 2001; Zahran, 2001; Provorov *et al.*, 2002; Lum y Hirsch, 2003). El crecimiento y desarrollo del huizachillo (*D. virgatus*) en suelos del estado de Tamaulipas, noreste de México, estaría relacionado con su capacidad de asociarse a microorganismos endosimbiontes representados por rizobios y hongos micorrícicos (de la Garza-Requena y Valdés, 2000).

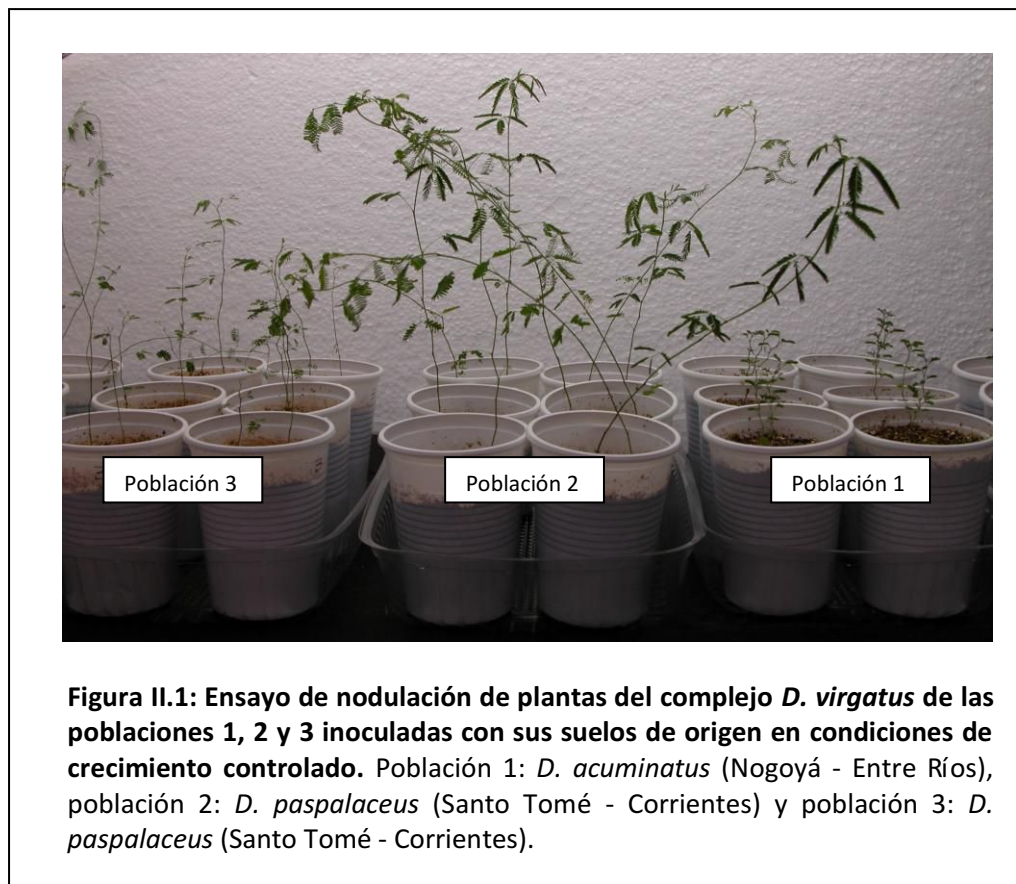
En nuestro país, lamentablemente, son escasos o nulos los estudios sistemáticos sobre los efectos benéficos de las micorrizas en el desarrollo de las especies del género *Desmanthus*.

Respecto del número de nódulos observados en las plantas noduladas de las poblaciones de *D. paspalaceus* y *D. virgatus*, los mismos fueron entre 1 y 5 por ejemplar; bajos en comparación con los estándares de nodulación observados en leguminosas forrajeras tropicales (CIAT, 1988). Además, los nódulos hallados en las plantas de campo mostraron tamaño pequeño, forma cilíndrica aplanada, color marrón oscuro y en muchas ocasiones apariencia seca y arrugada. Ninguna de esas características se condice con el aspecto esperable para nódulos en activa fijación de nitrógeno. Resultados que se presentan más adelante en este trabajo de tesis mostrarán que, más allá de estas observaciones, en suelos locales existen rizobios con capacidad de establecer una simbiosis eficiente fijadora de nitrógeno con distintas especies del complejo *D. virgatus* (ver Capítulo V).

En relación a la apariencia de los nódulos desarrollados a campo, cabe indicar que en las interacciones entre leguminosas y rizobios existen una variedad de mecanismos con el propósito de regular la nodulación, el proceso ulterior de fijación de nitrógeno, y el éxito reproductivo de los rizobios (Provorov *et al.*, 2002; Lum y Hirsch, 2003). En este aspecto, son hechos reconocidos que la planta huésped puede tanto limitar el número de infecciones (cuando ya tiene suficiente disponibilidad de nitrógeno) (Caetano Anollés y Gresshoff, 1991) como también más tardíamente monitorear la fijación de nitrógeno y regular (sancionar) la proliferación de rizobios no cooperativos (Kiers *et al.*, 2003; Simms *et al.*, 2006). Como mecanismo de sanción se ha demostrado que la leguminosa huésped es capaz de regular el suministro de oxígeno al interior del nódulo ejerciendo así una capacidad de limitar el abastecimiento de ese elemento a aquellos nódulos que no se hallen fijando nitrógeno, de tal manera de lograr una selección positiva a favor de los rizobios cooperativos eficientes (Kiers *et al.*, 2003; Denison y Kiers, 2004a). Es posible que el aspecto retraído y pequeño de los nódulos muestreados a campo refleje una pobre actividad fijadora para las cepas que -en condiciones de campo- nodularon las plantas colectadas.

II.2.1.2. Evaluación de la nodulación de las distintas poblaciones del complejo *D. virgatus* inoculadas con sus suelos de origen en condiciones de crecimiento controlado en cámara de plantas.

La evaluación de la nodulación rizobio-complejo *D. virgatus* en condiciones de crecimiento controlado se realizó mediante ensayos de laboratorio, empleando cada una de las poblaciones del complejo como planta “trampa”, y suelo de su propio lugar de origen. En las experiencias se cultivaron las plantas en macetas con vermiculita estéril y suelo de la misma procedencia, utilizando las semillas cosechadas en sus hábitats naturales, según se detalla en la sección 5.2. de Materiales y Métodos. Las plántulas permanecieron en cámaras de cultivo durante 90 días en condiciones de crecimiento controlado. A modo de ejemplo, en la Figura II.1 se muestra el aspecto de plantas de las poblaciones 1, 2 y 3 luego de 90 días de la inoculación de las mismas con sus suelos de origen.



En la Tabla II.2. se muestra la evaluación del crecimiento vegetativo inicial y la nodulación de las poblaciones del complejo *D. virgatus* cultivadas con sus respectivos suelos de origen en condiciones de crecimiento controlado.

Las plantas de las distintas poblaciones del complejo presentaron nódulos de tamaños variados, desde pequeños hasta muy grandes, con valores de 2,5 a 13,6 nódulos promedio por planta, mostrando una abundancia de categoría *escasa a mediana*, según los códigos para la evaluación de la nodulación de leguminosas forrajeras tropicales (CIAT, 1988). El grado de nodulación estaría relacionado con la combinación especie de leguminosa y cepa o cepas de rizobios simbioses (Denison y Kiers, 2004b).

Tabla II.2: Evaluación de la nodulación y del crecimiento vegetativo inicial de las poblaciones del complejo *D. virgatus* cultivadas con sus respectivos suelos de origen en condiciones de crecimiento controlado.

| Población de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> ^a | Caracteres morfológicos vegetativos ^b | | | Nodulación ^{b,c} | |
|---|--|-----------------------|-------------------------------|---------------------------|------------------|
| | Altura de planta (cm) | Longitud de raíz (cm) | Nº de hojas bipinnadas/planta | Nº nódulos/Planta | Nodulación en RP |
| 1- <i>D. acuminatus</i> | 7 | 14 | 8 | 2,5 | 3 |
| 2- <i>D. paspalaceus</i> | 37 | 11 | 7 | 13,6 | 2 |
| 3- <i>D. paspalaceus</i> | 20 | 10 | 6 | 3,7 | 3 |
| 4- <i>D. paspalaceus</i> | 32 | 13 | 10 | 4,6 | 1 |
| 5- <i>D. paspalaceus</i> | 25 | 11 | 11 | 6,7 | 3 |
| 6- <i>D. paspalaceus</i> | 24 | 21 | 8 | 8,0 | 1 |
| 7- <i>D. virgatus</i> | 23 | 23 | 7 | 5,0 | 1 |
| 8- <i>D. virgatus</i> | 24 | 17 | 8 | 4,3 | 2 |
| 9- <i>D. virgatus</i> | 23 | 19 | 10 | 4,5 | 1 |
| 10- <i>D. paspalaceus</i> | 21 | 15 | 7 | 5,0 | 2 |

^a : Provincia y departamento de origen de cada población se detallan en Tabla II.1. Las semillas de cada población cosechadas en sus hábitats naturales se pregerminaron y colocaron en macetas con vermiculita estéril y suelo de la misma procedencia, en relación 5:1. Las plántulas permanecieron 90 días en condiciones de crecimiento controlado.

^b : Los valores son promedios de 15-20 ejemplares/población.

^c : Códigos nodulación en RP (raíz principal): 3: predominante; 2: medio; 1: escaso; 0: nulo.

La población 1, representada por la especie *D. acuminatus*, proveniente de suelos arcillosos y alcalinos de Entre Ríos, presentó plantas de poca altura en concordancia con el hábito postrado o decumbente característico de dicha especie. El número de nódulos formados fue muy bajo y predominantemente en la raíz principal. Las estructuras nodulares mostraron una forma alargada y gran tamaño, en promedio 6 a 7 mm de longitud por nódulo.

Las poblaciones de *D. paspalaceus* presentaron valores promedios de 26,5 cm de altura, 13,5 cm de longitud radicular y 7 nódulos por planta en condiciones de crecimiento controlado. Las plantas procedentes de Corrientes (población 2), mostraron los mayores valores en número de nódulos y altura de planta, coincidiendo con suelos de origen que presentaron los menores contenidos de N orgánico total (ver Tabla I.4. sección 2.2.3.1. Capítulo I). De igual modo, la población 6 originaria de la provincia de Salta mostró la formación de un elevado número de nódulos por planta en suelos con un contenido de nitrógeno deficiente. La disponibilidad de nutrientes del suelo constituye un factor principal que impulsará la ocurrencia de las interacciones simbióticas de leguminosas con rizobios. En suelos con limitados contenidos de nitrógeno disponible, los costos energéticos generados por la FBN serán compensados por los beneficios obtenidos y en consecuencia se iniciará el proceso simbiótico. En ambientes con bajos niveles de nitrógeno se inicia el diálogo bioquímico entre la planta hospedadora y los rizobios con inicio de la infección y posterior nodulación (Caetano-Anollés *et al.*, 1988; Lum y Hirsch, 2003).

Las tres poblaciones de *D. virgatus* (sensu estricto) mostraron en promedio 23 cm de altura, 20 cm de longitud radicular y 4,6 nódulos por planta. Las poblaciones, originarias de las provincias de Jujuy y Santiago del Estero (7-8 y 9, respectivamente), crecieron en suelos con bajos contenidos de nitrógeno pero adecuados valores de fósforo asimilable y niveles de pHs próximos a la neutralidad, condiciones edáficas que podrían haber favorecido los procesos de nodulación y FBN.

En relación al pH, el 50 % de las poblaciones del complejo presentó suelos de origen con valores próximos a la neutralidad, indicando la existencia de condiciones que favorecerían la asimilación de nutrientes por parte de las plantas de *Desmanthus*, la actividad metabólica y sobrevivencia de los rizobios, así como también el desarrollo de

interacciones simbióticas. Las poblaciones de *D. paspalaceus* de Corrientes y Misiones fueron colectadas en suelos con niveles de pHs medianos a fuertemente ácidos, característica edáfica predominante en sus lugares de origen. Sin embargo, los bajos niveles de pHs no impidieron la sobrevivencia de los rizobios en los suelos y la ocurrencia del proceso de nodulación en condiciones de crecimiento controlado.

Las estructuras nodulares de las plantas del complejo *D. virgatus* presentaron una forma alargada y muchas veces ramificada, mostrando características típicas de los nódulos de crecimiento indeterminado. La coloración mostró variaciones desde rosado a pardo claro u oscuro y en algunas poblaciones se hallaron situados predominantemente en las raíces principales, mientras que en otras se encontraron distribuidos en las raíces secundarias (ver Figura II.2).

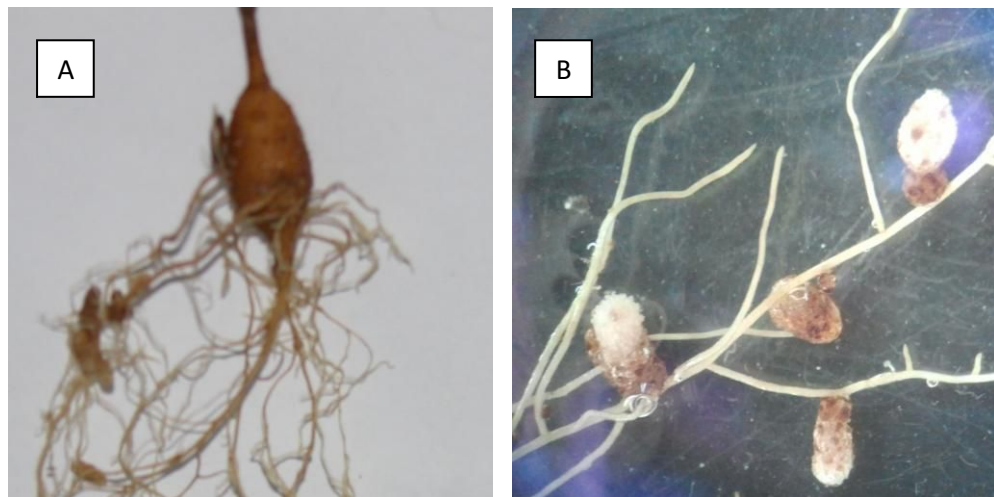


Figura II.2: Planta de *D. paspalaceus* desarrollada en condiciones de crecimiento controlado. A. Raíz nodulada mostrando la forma, color y distribución de los nódulos. B. Nódulos de tipo indeterminado.

La coloración interna de varios nódulos obtenidos en condiciones de crecimiento controlado fue rosada a roja, hecho que sugiere la presencia en el suelo de cepas de rizobios efectivas para las plantas del complejo *D. virgatus*.

La nodulación de las raíces es una característica general y frecuentemente observada en las plantas de la subfamilia Mimosoideae. Faria *et al.* (1989), examinaron 40 géneros, incluyendo *Desmanthus*, con un total de 454 especies mimosoideas y hallaron que el 90 % de las plantas presentaron nodulación. En relación al género *Desmanthus*, Allen y Allen (1981) mostraron que las especies examinadas de *D. virgatus*, *D. illinoensis*, *D. depressus*, *D. leptolobus* y *D. brachylobus* presentaron nódulos en sus raíces. Cabe señalar que, en la actualidad *D. brachylobus* se considera un sinónimo de *D. illinoensis* (Luckow, 1993).

La evaluación de la simbiosis realizada en las poblaciones del complejo *D. virgatus* colectadas en sus hábitats naturales mostró que solamente el 44 % de las plantas presentaron estructuras nodulares. El menor porcentaje de plantas con nódulos hallado en este trabajo en relación al observado en la literatura deriva principalmente de las escasas plantas noduladas de las especies *D. acuminatus* y *D. paspalaceus* en sus ambientes naturales. Contrastando con esta observación, las poblaciones de *D. virgatus* (sensu estricto) mostraron los porcentajes de nodulación más altos en relación a todas las poblaciones de la colección.

Diversos autores han descrito previamente la dificultad de obtener nódulos a campo en especies adultas perennes y leñosas potencialmente noduladoras (Faria *et al.*, 1984; Faria *et al.*, 1989; Moreira *et al.*, 1992). Estas observaciones fueron confirmadas en las experiencias realizadas en condiciones de crecimiento controlado, donde el 100 % de las plantas de las distintas especies del complejo *D. virgatus* presentaron nódulos en sus raíces.

En este trabajo, los nódulos obtenidos de las plantas de campo y en laboratorio mostraron una forma alargada y un tipo de crecimiento indeterminado con diversos grados de ramificación. Las características de los nódulos en las plantas de la subfamilia Mimosoideae son muy uniformes, presentando una estructura indeterminada, a menudo ramificada, mostrando una región central con células infectadas y no infectadas, y una corteza suberizada que los protegería contra la desecación (Sprenst, 2008).

Los nódulos observados en las plantas del complejo *D. virgatus* indicaron la presencia en el suelo de cepas de rizobios nativos capaces de nodular a *D. acuminatus*, *D. paspalaceus* y *D. virgatus* (sensu estricto). La formación de nódulos no implica necesariamente una efectiva fijación de nitrógeno pudiendo ocurrir desde situaciones de

mutualismo y completa efectividad hasta situaciones de parasitismo con escasa o nula fijación de nitrógeno (Tang, 1986; Denison y Kiers, 2004b). Dichas consideraciones justificaron la necesidad de investigar posteriormente la efectividad de las cepas simbiotes del complejo *D. virgatus* recuperadas de los suelos del centro y norte argentino, cuyos resultados se presentarán en el capítulo V de este trabajo de tesis.

II.2.2. Organización, establecimiento y preservación de una colección de aislamientos de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*.

Las estrategias empleadas para la obtención de rizobios permitieron establecer una colección de más de 1000 nódulos de las plantas del complejo *D. virgatus* en sus hábitats naturales y en condiciones de laboratorio. Un muy bajo número de nódulos pudo ser recuperado de las plantas del complejo *D. virgatus* en sus ambientes de origen, lo que sugiere que ya sea la población de rizobios nativos fue escasa, o ineficiente para la infección en las condiciones agroecológicas operantes. Más allá del bajo número de nódulos, de todos los sitios de colección de las plantas se han podido obtener nódulos con muestras de suelo en ensayos de laboratorio en condiciones de crecimiento controlado. Resultó claro que los componentes agroclimáticos condicionaron considerablemente el proceso de formación de nódulos a campo en los sitios de colección evaluados del centro y norte de nuestro país.

A partir de los nódulos obtenidos de campo y en condiciones de crecimiento controlado (ambos), se realizaron aislamientos de rizobios en medio LMA con rojo congo hasta la obtención de colonias puras. Los aislamientos bacterianos obtenidos fueron clasificados de acuerdo a la población de origen y conservados en caldo LMA con agregado de 50 % (v/v) de glicerol, a -20°C según se describe en la sección 2.2. de Materiales y Métodos. El cepario fue mantenido por criopreservación y se estableció una base de datos con las principales características vinculadas al origen de los aislamientos y la ubicación de sus sitios de origen.

II.2.2.1. Colección de aislamientos. Confirmación del fenotipo de nodulación en clones de la colección.

Las cepas aisladas fueron sometidas a pruebas de pureza para descartar la presencia de posibles contaminantes y confirmar la capacidad de producir nódulos en plantas hospedadoras. Se conservaron los aislamientos que mostraron bacilos gram negativos no esporulados. La característica de crecimiento en medio PGA no se consideró excluyente al realizar las pruebas de infección en plantas (las cepas de *Rhizobium* muestran crecimiento muy reducido en medios nutritivos con sales minerales de peptona y glucosa, sin cambios de pH (Kuykendall *et al.*, 2005)).

Finalmente, con el propósito de asegurar que todos los aislamientos tuvieran la capacidad de nodular la planta huésped *D. virgatus*, se realizaron pruebas de infección inoculando los mismos en plántulas de las respectivas poblaciones de las cuales fueron originalmente obtenidos. Las plantas permanecieron en condiciones de crecimiento controlado durante 45 días previo al procesamiento de los nódulos formados. En los ensayos de infección, se halló que las plantas mantenidas en macetas con vermiculita manifestaban un desarrollo vegetativo muy pobre, con síntomas de clorosis y senescencia, y un sistema radicular sin la aparición de nódulos. Dichas circunstancias obligaron a realizar nuevos ensayos en los cuales se modificó la composición del sustrato, de tal manera que empleando una mezcla de vermiculita: suelo estéril se logró obtener 40 - 50% de supervivencia de las plantas. Sólo se conservaron aquellas cepas de rizobios confirmadas por su capacidad de producir nódulos en la planta huésped que totalizaron aproximadamente 173 aislamientos provenientes de las diez poblaciones analizadas.

Como resultado de los ensayos descritos en esta sección se ha construido una colección de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*, en su mayoría recuperados de los suelos de origen en condiciones de crecimiento controlado.

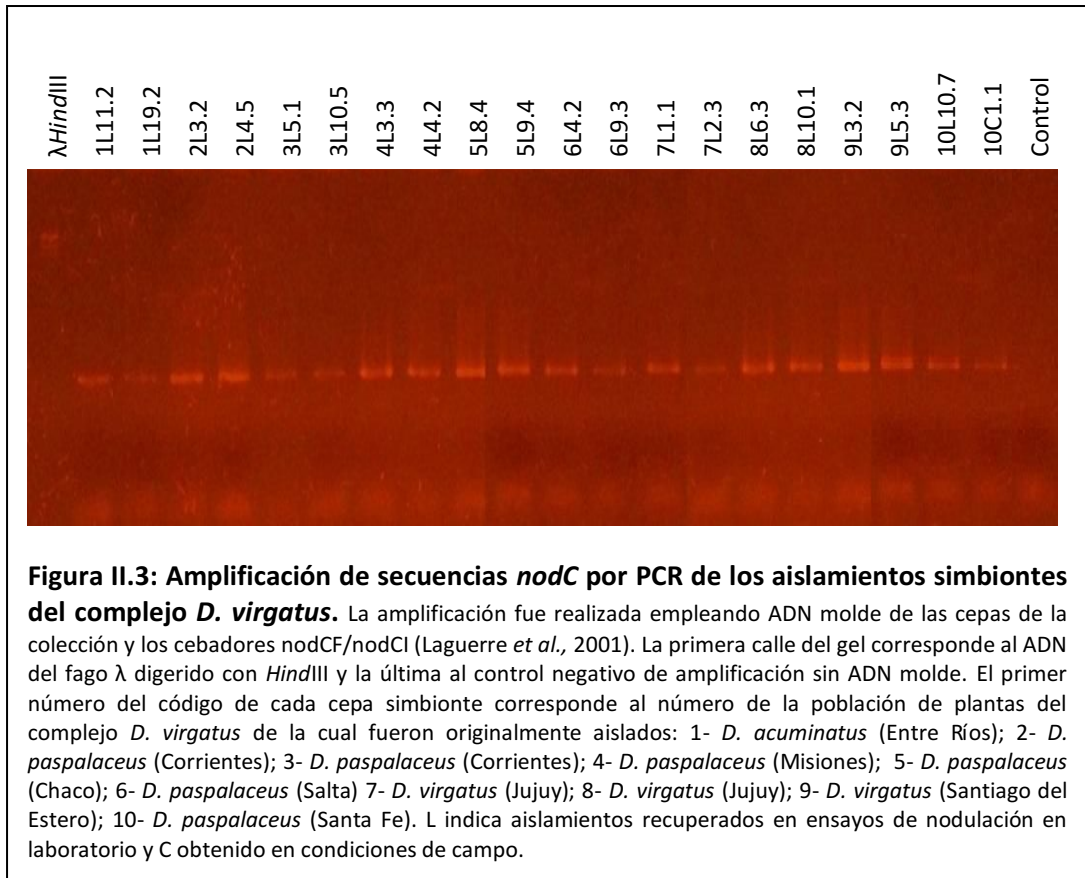
En este sentido, se aislaron cepas bacterianas simbiotes procedentes de sus hábitats naturales en tres poblaciones (5, 7 y 10) de las ocho poblaciones de plantas del complejo en las cuales se recolectaron nódulos en condiciones de campo.

Según se muestra en la Tabla II.3., se logró obtener una colección de 173 aislamientos de rizobios noduladores de las diferentes poblaciones del complejo *D. virgatus*, correspondiendo 11 cepas a las plantas de *D. acuminatus*, 110 a las plantas de *D. paspalaceus* y 52 a las de *D. virgatus* (sensu estricto).

Tabla II.3: Colección de rizobios noduladores de las poblaciones del complejo *D. virgatus* procedentes de diferentes sitios del centro y norte de Argentina.

| Población de plantas indicada | Especie del complejo <i>D. virgatus</i> | Provincia y Departamento de origen | Número de aislamientos de rizobios |
|-------------------------------|---|------------------------------------|------------------------------------|
| 1 | <i>D. acuminatus</i> | Entre Ríos (Nogoyá) | 11 |
| 2 | <i>D. paspalaceus</i> | Corrientes (Santa Tomé) | 24 |
| 3 | <i>D. paspalaceus</i> | Corrientes (Santa Tomé) | 23 |
| 4 | <i>D. paspalaceus</i> | Misiones (Candelaria) | 12 |
| 5 | <i>D. paspalaceus</i> | Chaco (San Fernando) | 15 |
| 6 | <i>D. paspalaceus</i> | Salta (Rosario de la Frontera) | 16 |
| 7 | <i>D. virgatus</i> (sensu estricto) | Jujuy (El Carmen) | 14 |
| 8 | <i>D. virgatus</i> (sensu estricto) | Jujuy (Ledesma) | 22 |
| 9 | <i>D. virgatus</i> (sensu estricto) | Santiago del Estero (Rivadavia) | 16 |
| 10 | <i>D. paspalaceus</i> | Santa Fe (General Obligado) | 20 |

En los aislamientos recuperados de nódulos de las raíces del complejo *D. virgatus* de la colección se detectó por técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) la presencia del gen de nodulación *nodC*. La Figura II.3. muestra la amplificación de secuencias *nodC* de las cepas simbiotes de las distintas poblaciones de plantas procedentes del centro y norte de Argentina.



La abundancia, diversidad y tolerancia a las condiciones ambientales de las poblaciones de rizobios nativos varían ampliamente en los diferentes suelos. Los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* fueron recuperados de diez sitios con características edafoclimáticas propias (ver Capítulo I) sugiriendo que la composición poblacional de las cepas simbiotes podría diferir entre los distintos sitios de origen. No obstante, en un mismo suelo la población de rizobios podría variar a causa de efectos intrínsecos e inducidos (Sylvester-Bradley y Valdés, 1988). En este sentido, los factores ambientales de estrés pueden producir cambios genéticos en los microsimbiontes, hecho que podría explicar la gran diversidad de rizobios nativos hallada en ciertos suelos.

Por otro lado, la variación espacial y temporal de los exudados de las leguminosas modifica de manera significativa la estructura de la comunidad rizobiana (Graham, 2008). Desde hace muchos años se conoce la capacidad de las leguminosas huéspedes para influir en el crecimiento de rizobios específicos en la rizósfera (van Egerat, 1975). Las poblaciones del complejo *D. virgatus* fueron colectadas en distintos sitios donde

predominaban vegetaciones características de los lugares de procedencia. Así, algunas poblaciones se hallaban creciendo junto a integrantes de la familia Poaceae, mientras que otras plantas se recolectaron junto a las leguminosas *D. incanum* y *G. striata* (ver sección 2.2.1. del Capítulo I). De ese modo, los exudados de las raíces estimularían el crecimiento de determinadas cepas de rizobios y, en consecuencia, la población nativa de microsimbiontes dependerá de la vegetación existente.

De acuerdo a lo expuesto en los párrafos precedentes, el análisis de la biodiversidad de los rizobios presentes en los suelos argentinos permitirá conocer las complejas relaciones ecológicas y agronómicas entre macro y microsimbiontes y seleccionar las mejores cepas adaptadas a distintos tipos de estrés ambiental, contribuyendo a optimizar la eficiencia simbiótica de la asociación rizobio - complejo *D. virgatus*.

II.3. Conclusiones.

En este capítulo se presentó el establecimiento de una colección de aislamientos de rizobios noduladores de plantas del complejo *D. virgatus* provenientes de diferentes sitios del centro y norte de nuestro país. Si bien algunos aislamientos fueron recuperados de nódulos colectados de las plantas en sus ambientes de origen, el mayor número de aislamientos fue recuperado de nódulos a partir de plantas desarrolladas con los diferentes suelos de procedencia en condiciones de crecimiento controlado. Esta situación sugiere que las condiciones a campo fueron desfavorables para el desarrollo de la simbiosis. Los rizobios obtenidos fueron mantenidos por criopreservación como reservorio de germoplasma de las bacterias simbiotes.

El establecimiento de una vasta colección de rizobios noduladores de *D. acuminatus*, *D. paspalaceus* y *D. virgatus* (sensu estricto) ha construido la base para la caracterización fenotípica y genotípica de los microsimbiontes *locales* del complejo *D. virgatus*, de su diversidad, y de sus características simbióticas.

Capítulo III

Características fenotípicas de los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos del centro y norte de la República Argentina.

III.1. Introducción

Según se ha descrito en la introducción de esta tesis, Leguminosae es una de las familias más amplias de las angiospermas, con 751 géneros y aproximadamente 19.500 especies (LPWG, 2013) distribuidas en una amplia gama de condiciones ecológicas (Doyle, 1994, Sprent, 1995). La habilidad de las leguminosas para colonizar diferentes ambientes estaría relacionada con su capacidad para asociarse con rizobios simbioses fijadores de nitrógeno atmosférico (Moreira *et al.*, 1992, Sprent, 1994). Debido a esta capacidad, las leguminosas pueden actuar como plantas pioneras en la colonización y estabilización del suelo, pueden crecer en suelos deficientes en nitrógeno (Silva y Vinuesa, 2007) y en regiones marginales, mejorando la fertilidad y previniendo la erosión y la desertificación (Zahran, *et al.*, 2013). Entre las leguminosas que conforman el paisaje natural argentino se encuentran las especies con potencial forrajero del complejo *D. virgatus*, que presentan una gran capacidad de adaptación a las condiciones edafo-climáticas de las diferentes zonas del centro y norte de nuestro país. Por lo cual, resulta de gran interés enfocar el estudio de este trabajo hacia el análisis de la biodiversidad de los rizobios simbióticos de *D. virgatus* con el propósito de seleccionar potenciales cepas inoculantes para ser utilizadas en suelos argentinos.

La búsqueda de sistemas agropecuarios ecológicos y sustentables ha incrementado el número de investigaciones sobre la diversidad rizobiana y la tolerancia a factores bióticos y abióticos. Uno de los problemas más extendidos que enfrenta la actividad agronómica es la degradación y pérdida de calidad del suelo debido a la desecación, acidificación y salinización. Los factores abióticos como temperatura extrema, acidez y salinidad del suelo pueden reducir el crecimiento y la supervivencia de los rizobios e inhibir la interacción simbiótica eficiente ocasionando una disminución en la productividad agropecuaria.

La simbiosis rizobio-leguminosa presenta un papel muy importante en la agricultura, la silvicultura y la producción de forraje sostenible. Debido a la importancia ecológica y económica de los rizobios, su biodiversidad ha sido investigada ampliamente y en los últimos años el conocimiento sobre la taxonomía rizobial ha incrementado notablemente (Martinez-Romero, 2001; Moreira, 2012). Asimismo, la interacción simbiótica eficiente ha

sido explorada en la actividad agronómica para mejorar el crecimiento y desarrollo de los cultivos y las pasturas sin la adición de fertilizantes nitrogenados (Zahran, 2009). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones se han centrado en cultivos de leguminosas de importancia agrícola, mientras que se han realizado muy pocos estudios sobre las asociaciones entre rizobios y leguminosas nativas, interacciones que presentan una gran importancia ecológica en los sistemas naturales (Zahran, 1999, Zahran *et al.*, 2003). En este sentido, Bécquer (2004) ha sugerido dirigir una atención especial a los rizobios aislados de ecosistemas sometidos a la acción de condiciones naturales adversas, ya que se ha comprobado que sus características fisiológicas se diferencian notablemente de aquellos aislados de zonas agrícolas con condiciones edafoclimáticas más favorables. Dichas características deberían ser estudiadas con fines biotecnológicos para su aplicación en sistemas agropecuarios sostenibles.

De acuerdo a datos de la literatura, las condiciones de estrés ambiental como acidez, alcalinidad o salinidad del suelo afectarían la supervivencia y diversidad de las poblaciones de rizobios nativos, así como también su capacidad de establecer interacciones simbióticas (Bala *et al.*, 2003a; Bala *et al.*, 2003b; Fall *et al.*, 2008). Las investigaciones sobre rizobios de diferentes regiones geográficas asociados con sus plantas huéspedes permitirían lograr una adecuada caracterización de las interacciones entre los microsimbiontes, las leguminosas y los factores geográficos (Liu *et al.*, 2005). De ese modo, la diversidad de los rizobios dentro de una comunidad microbiana determinada podría consolidar la capacidad de resistencia de la población a perturbaciones o estreses del medio ambiente edáfico (Bala y Giller, 2006).

Por otro lado, los estudios que permiten identificar las diferentes especies y géneros de rizobios están basados en criterios muy específicos con el fin de evitar posibles errores de clasificación (Bécquer, 2004). Debido a esta razón, existen criterios que señalan la taxonomía de los rizobios en una etapa de transición (Graham *et al.*, 1991), ya que algunos de los métodos utilizados para clasificar estas bacterias en décadas pasadas han dejado de ser únicos en su tipo y han cedido paso a técnicas de biología molecular. Sin embargo, se mantienen muchos de los análisis fenotípicos y de evaluación simbiosis leguminosa-rizobio, ya que en estos estudios se evalúan las funciones fisiológicas y ecológicas de las células (Vandamme *et al.*, 1996). De este modo, en una primera

instancia resultaría esencial la realización de estudios fenotípicos para lograr una adecuada caracterización y selección de cepas de rizobios adaptados a condiciones edafoclimáticas marginales (Zerhari *et al.*, 2000, Zahran *et al.*, 2012).

En la actualidad, el estudio y la taxonomía de los rizobios se basan en un enfoque polifásico (Gillis *et al.*, 2005) que incluye caracterizaciones de la morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia (Wang *et al.*, 2001). De ese modo, combinando los datos mencionados se podría establecer una visión global de las relaciones de las bacterias y proponer una clasificación adecuada (Willems, 2006).

En este contexto, el análisis de la biodiversidad de la colección de rizobios noduladores recuperados de distintos suelos de nuestro país construida en el capítulo precedente de esta tesis permitirá seleccionar las cepas mejor adaptadas a diferentes tipos de estreses ambientales, contribuyendo a mejorar la eficiencia simbiótica de la asociación rizobio - complejo *D. virgatus*.

El objetivo del presente capítulo fue caracterizar fenotípicamente los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*.

En una primera instancia se presenta el análisis de las características fenotípicas culturales y la tolerancia a diferentes estreses abióticos que incluyen altas temperaturas, niveles de pHs (ácidos y alcalinos) y salinidad de una vasta colección de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos del centro y norte de Argentina (por especie de planta hospedadora y por sitio y población de origen). Posteriormente, se describen y detallan las características fenotípicas y de tolerancia a condiciones de estrés de los rizobios simbiotes de *D. paspalaceus* aislados de suelos de la localidad de General Obligado, provincia de Santa Fe (población 10, plantas codificadas con el número Id 6932).

III.2. Resultados y discusión.

III.2.1. Características morfológicas de los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* aislados en este trabajo de tesis.

III.2.1.1. Morfología macroscópica.

La morfología macroscópica se observó en placas de LMA y las cepas bacterianas aisladas presentaron colonias circulares de bordes enteros y lisos, elevaciones cóncavas o convexas, colores rosados, beige o blanquecinos y translúcidas, semitranslúcidas u opacas. Las características de los aislamientos simbiotes del complejo *D. virgatus* correspondieron a las descritas para los rizobios. En la Figura III.1 se observa la morfología de seis cepas de la colección recuperadas de diferentes sitios del centro y norte argentino.

Las colonias de los microsimbiontes exhibieron una consistencia cremosa, a excepción de aquellos originarios de los suelos de la provincia de Jujuy que presentaron una consistencia mucosa con gran producción exopolisacáridos (EPS). Asimismo, algunos aislamientos de las poblaciones 1 y 10, procedentes de Chaco y Santa Fe, mostraron una típica consistencia viscosa.

La forma, transparencia y diámetro de las colonias de los rizobios dependerán en gran parte de la producción de EPS, observándose mucha diversidad entre los distintos aislamientos. Los rizobios recuperados de muestras de suelo de la provincia de Jujuy al inicio del crecimiento presentaron colonias circulares y de consistencia acuosa que en el transcurso del período de incubación se tornaron de formas irregulares a medida que fueron produciendo mayor gomosidad. Martins *et al.* (1997), sugirieron que las colonias de rizobios cuyo diámetro varía entre 1 y 2 mm son generalmente circulares, translúcidas y con poca gomosidad, mientras que las colonias de mayor tamaño tienen forma variable dependiendo de la consistencia de la gomosidad producida.

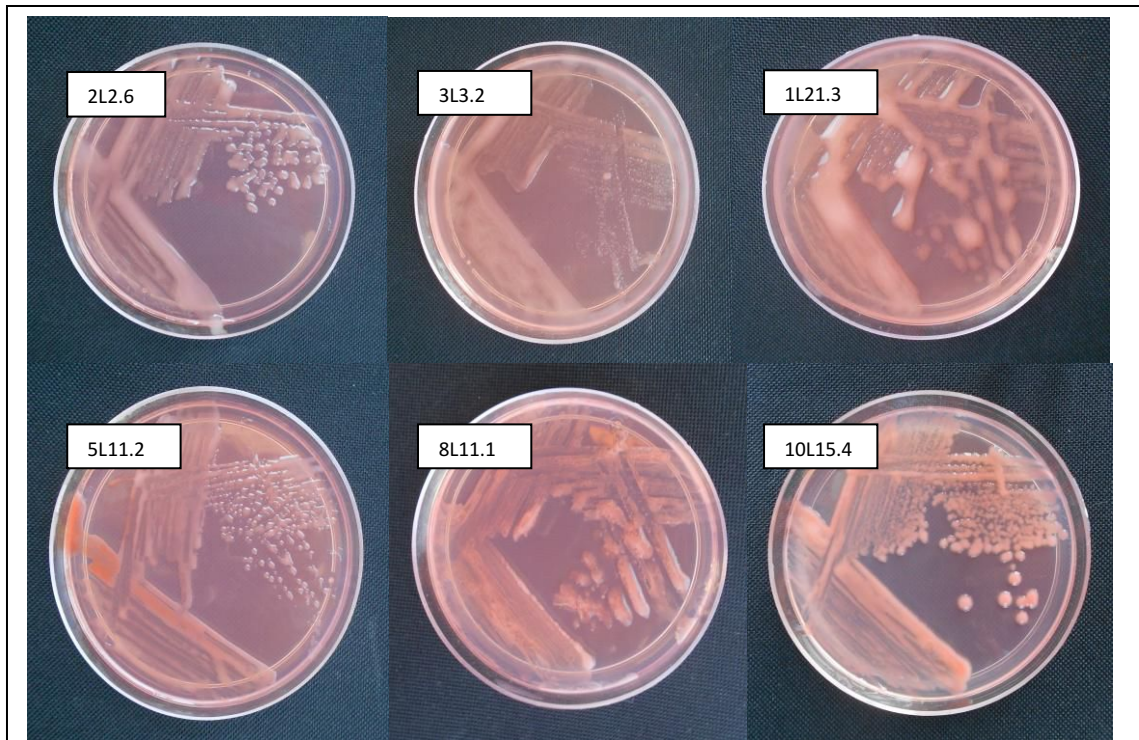


Figura III.1. Morfología macroscópica de las colonias de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos del centro y norte de Argentina. Los cultivos de rizobios ensayados se repicaron en placas con medio LMA y se incubaron a 28°C durante 5 días. El primer número del código de cada cepa simbiote corresponde al número de la población de plantas del complejo *D. virgatus* de la cual fueron originalmente aislados según se indica a continuación: 1- *D. acuminatus* (Entre Ríos), 2- *D. paspalaceus* (Corrientes); 3- *D. paspalaceus* (Corrientes); 5- *D. paspalaceus* (Chaco); 8- *D. virgatus* sensu estricto (Jujuy); 10- *D. paspalaceus* (Santa Fe). L indica aislamientos recuperados en ensayos de nodulación en el laboratorio (para detalle de la nomenclatura de los aislamientos ver Materiales y Métodos sección 6.1.)

III.2.1.2. Características morfológicas microscópicas.

La morfología celular se observó al microscopio óptico mediante la tinción diferencial de Gram. Los aislamientos simbiotes recuperados de los diferentes sitios en estudio presentaron forma de bacilos pequeños, gram negativos y no esporulados. La morfología microscópica bacteriana correspondió a la descrita para las bacterias que forman nódulos con leguminosas en el *Phylum B12* Proteobacteria (Garrity *et al.*, 2005).

III.2.2. Características fisiológicas de los rizobios nativos noduladores del complejo *D. virgatus*.

III.2.2.1. Velocidad de crecimiento de los aislamientos.

El 78 % de las colonias de los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* aparecieron entre los 2 a 4 días posteriores al aislamiento y presentaron un diámetro igual o mayor a 2 mm, mientras que el 22 % restante aparecieron entre los 5 a 6 días subsiguientes. Los géneros *Rhizobium*, *Ensifer*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium* incluyen cepas que forman colonias visibles con un diámetro de 2 a 4 mm y muestran un crecimiento rápido, de 3 a 5 días para desarrollar colonias en medio LMA a 25-30°C; mientras que las cepas del género *Bradyrhizobium* forman colonias pequeñas de diámetro inferior a 1 mm recién a los 5 a 7 días en las mismas condiciones de incubación (Holt *et al.*, 1994). La mayoría de las cepas del género *Mesorhizobium* muestran tasas de crecimiento intermedio entre las típicas especies rápidas y lentas (Young, 1996).

Consistente con los resultados obtenidos en este trabajo López *et al.*, (2000) y Teamtisong (2000) ya habían aislado rizobios de crecimiento rápido de nódulos de raíces de *D. virgatus*. Asimismo, en la provincia de Tucumán, Pedraza *et al.*, (2001) obtuvieron rizobios nativos simbiotes de plantas de *D. virgatus* cv. Jaribu que crecieron en forma rápida produciendo colonias muy gomosas.

III.2.2.2. Respuesta al cambio de coloración del medio LMA con azul de bromotimol.

Los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* acidificaron ligeramente el medio de cultivo, ocasionando el viraje del color del medio de verde a verde-amarillento. Cabe destacar que, el 21 %, 25 % y 20 % de las cepas de las poblaciones 7, 9 y 10, respectivamente, no originaron cambios de coloración en el medio nutritivo. Tan y Broughton (1981) sugirieron que los cambios de pH promovidos por los rizobios en el medio se deberían al empleo diferencial de azúcares, de tal manera que las cepas de crecimiento rápido excretan ácidos orgánicos y las de crecimiento lento compuestos nitrogenados en forma de cationes.

III.2.3. Características de tolerancia a factores abióticos de los aislamientos de la colección de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*.

III.2.3.1. Caracterización del conjunto completo de aislamientos de rizobios frente a diferentes tipos de estrés, discriminados por especie hospedadora.

Los estudios de crecimiento bacteriano en medio definido a diferentes temperaturas, niveles de pH y concentraciones de sal resultan importantes para caracterizar los efectos de factores abióticos de estrés como altas temperaturas, acidez, alcalinidad y salinidad sobre los rizobios. La utilidad de dichos ensayos se sustenta en considerar que, muy posiblemente, las cepas que son tolerantes a diferentes estreses abióticos en condiciones de suelo constituyen un subgrupo de las cepas que son tolerantes en condiciones de laboratorio. De todos modos, también es posible que las cepas que sean moderadamente resistentes en condiciones de crecimiento controlado tengan una buena supervivencia en suelos con temperaturas, pH o concentraciones de sales extremas. Esto es posible dado que la estructura del suelo ofrece micro-ambientes particulares dentro de los cuales las condiciones del entorno percibidas por las bacterias pueden ser muy distintas a las que corresponden a la fase líquida libre. Más allá de esta consideración, toda cepa que resulte más tolerante que otra a distintos tipos de estrés abiótico en condiciones de laboratorio, será seguramente más tolerante en condiciones de suelo. Por esta razón, cualquier estudio complejo de persistencia en condiciones reales de suelo debería estar precedido por ensayos más simples de caracterización de las cepas en medios de cultivo con condiciones de temperatura, pH o salinidad bien definidas.

En este trabajo de tesis los microsimbiontes del complejo *D. virgatus* fueron evaluados respecto a su habilidad para crecer en medio LMA sólidos bajo diferentes condiciones de estrés, como por ejemplo temperaturas elevadas, distintos niveles de pH y condiciones de salinidad que, en diversa medida, se registran en los suelos donde habitan naturalmente las plantas del complejo. Los rizobios noduladores de cada población y las cepas de referencia se sembraron en placas con el medio de cultivo modificado según la característica a evaluar y se incubaron en estufa durante 5 días. El crecimiento de cada

uno de los rizobios, evaluado por duplicado, se calificó según una escala numérica gradual desde 0 (ausencia de crecimiento) hasta 5 (desarrollo normal).

En la Tabla III.1. se presenta el análisis del crecimiento de los rizobios noduladores de las especies del complejo *D. virgatus* y de rizobios simbiotes de otras leguminosas en medio LMA bajo diferentes condiciones de estreses abióticos. Los resultados se expresan como el porcentaje de aislamientos que presentaron crecimiento óptimo (grado 5) en la condición analizada. El 73 a 74 % de los aislamientos noduladores de las especies *D. paspalaceus* y *D. virgatus* presentaron crecimiento óptimo a 35°C de incubación, mientras que 8% del total de las cepas fueron tolerantes a la temperatura extrema de 40°C.

Por otro lado, los microsimbiontes de *D. paspalaceus* presentaron una gran capacidad de adaptación al crecimiento en medios nutritivos con niveles de pH extremos. La ácido-tolerancia poco marcada de *S. meliloti* en relación a la de otros rizobios de referencia puede observarse en la Tabla III.1. Cabe señalar que, *S. meliloti* presentó una muy escasa capacidad de crecimiento a pH inferiores a 5,6 (Glen y Dilworth, 1994), en contraste, *R. tropici* y *R. hainanense* mostraron una marcada tolerancia a las condiciones ácidas del medio (Graham *et al.*, 1982; Martínez-Romero *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1997).

La mayoría de los microsimbiontes mostraron un crecimiento óptimo en medio nutritivo con concentraciones de 1 % (p/v) de NaCl (171 mM). En particular, los rizobios de *D. acuminatus* se destacaron por presentar el mayor porcentaje de cepas tolerantes en las concentraciones más altas de sal, mientras que ningún aislamiento de la colección fue capaz de crecer en 3 % de NaCl (513 mM). Las cepas de referencia *R. meliloti*, *R. tropici* y *R. hainanense* presentaron una tolerancia apreciable a concentraciones de 2 % de NaCl. Graham (1992) indicó que los rizobios tolerantes a la salinidad representarían un pequeño porcentaje de cepas en la mayoría de las colecciones, promoviendo por ello el aislamiento, caracterización y selección de cepas tolerantes a condiciones salinas como algunas de las aquí presentadas (varias como hemos dicho aisladas de *D. acuminatus*).

Los resultados obtenidos evidencian que las cepas simbiotes de las especies del complejo *D. virgatus* analizadas en este trabajo de tesis presentaron una gran diversidad en relación a la capacidad de crecimiento en diferentes condiciones de estreses abióticos, mostrando tolerancias destacadas a temperaturas medias a altas, a un amplio intervalo de valores de pH (desde ácidos a alcalinos) y a condiciones de salinidad de distinto grado.

Tabla III.1.: Evaluación de la tolerancia a diferentes condiciones de estreses abióticos en rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* aislados de suelos locales.

| Número de rizobios noduladores de la especie Indicada, y cepas de referencia | Rizobios tolerantes a las temperaturas (°C) indicadas ^a | | | | Rizobios tolerantes a los diferentes niveles de pH enumerados ^a | | | | | | Rizobios tolerantes a las concentraciones de NaCl (%) indicadas ^a | | | | |
|--|--|----|----|----|--|----|-----|-----|----|----|--|-----|-----|-----|-----|
| | 28 | 35 | 40 | 45 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0,01 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 3,0 |
| <i>D. acuminatus</i> (n ^b : 10) | 100 | 30 | 30 | 0 | 50 | 90 | 100 | 100 | 70 | 20 | 100 | 100 | 100 | 60 | 0 |
| <i>D. paspalaceus</i> (n ^b : 90) | 100 | 73 | 2 | 0 | 63 | 91 | 100 | 100 | 95 | 74 | 100 | 94 | 79 | 12 | 0 |
| <i>D. virgatus</i> (n ^b : 42) | 100 | 74 | 10 | 0 | 28 | 81 | 100 | 100 | 52 | 36 | 100 | 100 | 93 | 19 | 0 |
| Cepas de referencia | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>S. meliloti</i> 2011 | + | + | w | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | w | - |
| <i>S. fredii</i> 205 | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| <i>Rhizobium sp.</i> LPU83 | + | - | - | - | - | + | + | + | w | - | + | - | - | - | - |
| <i>R. hainanense</i> l66 | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>R. tropici</i> 899 | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | w |
| <i>Rhizobium sp.</i> CB3126 | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |

^a: Los datos numéricos representan el porcentaje de rizobios con crecimiento óptimo (grado 5 en la condición indicada de pH, temperatura o salinidad) recuperados de la especie indicada del complejo *D. virgatus*. Los cultivos de rizobios y las cepas de referencia se repicaron por duplicado en placas con medio LMA modificado según la característica a evaluar y se incubaron durante 5 días.

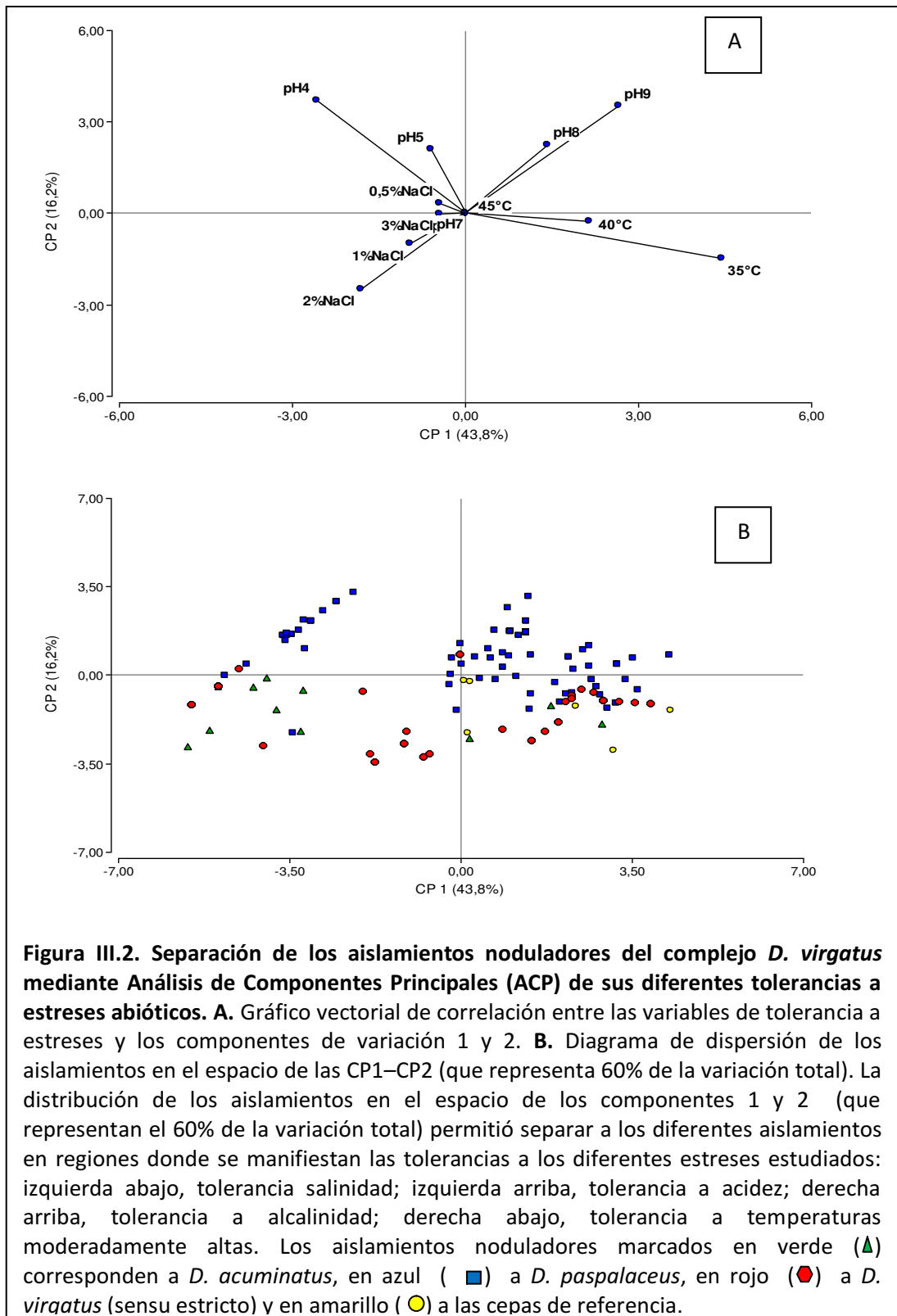
^b: número de aislamientos evaluados.

(+) óptimo crecimiento (w) débil crecimiento (-) sin crecimiento

Con el fin de caracterizar en más detalle la diversidad fenotípica de los rizobios noduladores de *Desmanthus* spp. y determinar los factores asociados a esa diversidad, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) incluyendo el total de aislamientos de la colección y todas las variables analizadas para cada uno de ellos utilizando la escala numérica gradual de crecimiento que ya hemos mencionado (desde grado 0 a grado 5). El propósito del análisis fue obtener un número reducido de combinaciones lineales de las variables estudiadas (estreses abióticos) que explicaran la mayor variabilidad (diversidad biológica) posible. Los resultados mostraron que los tres primeros componentes del ACP dan cuenta de 74 % de la variabilidad total observada. Se observó, por un lado, que la primera componente (**CP1**) explica el 44 % de la variación total y está positivamente influenciada por el **crecimiento óptimo de las cepas a una temperatura de 35°C**. La segunda componente (**CP2**), por su parte, explica el 16 % de la variación y muestra una alta correlación también positiva con la **tolerancia de los rizobios a niveles extremos de pHs 4 y 9**. La tercera componente principal (**CP3**) explica el 14 % y se halla influenciada positivamente por el **crecimiento a concentraciones de 2 % de NaCl**. De este modo, la información contenida en las variables de respuesta originales pudo ser resumida en tres variables que recolectaron la mayor información del ensayo.

En la Figura III.2 se muestra la distribución de los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* en el espacio CP1 - CP2, y el gráfico vectorial de la contribución (representado por la longitud del vector) de las variables originales a cada una de las CPs. La dispersión observada de los datos evidenció la diversidad fenotípica en la colección de germoplasma colectado. De acuerdo con la posición de los aislamientos en el plano comprendido por ambos ejes, hacia la derecha en el eje horizontal (CP1) se hallan los rizobios con mejor desempeño a altas temperaturas, mientras que en los valores positivos de la CP2 se encuentran los aislamientos con mayor tolerancia a niveles extremos de pH (ya sea los resistentes a acidez localizados en la región negativa del CP1, o los resistentes a alcalinidad para aquellos que se localizan en la región positiva de este mismo componente). **Resulta particularmente interesante el modo en el que hemos podido discriminar dentro del espacio CP1-CP2 (ver distribución de colores en el gráfico V.2.B.) el comportamiento diferencial frente a los diferentes estreses de los distintos**

aislamientos. En las secciones siguientes mostraremos las características de tolerancia a cada uno de estos estreses analizada por sitio de origen.



La capacidad de los microorganismos para crecer y desarrollarse en diferentes condiciones de cultivo puede variar ampliamente, incluso entre cepas de la misma especie. En el caso de los rizobios, ya se habían observado diferencias entre cepas de un mismo género en relación a la tolerancia a temperaturas extremas (Munevar y Wollum, 1981; Hartel y Alexander, 1984; de Lajudie *et al.*, 1994), acidez (Graham *et al.*, 1982; Graham *et al.*, 1994; Correa y Barneix, 1997), alcalinidad (Surange *et al.*, 1997) y salinidad (Bhardwaj, 1975; Zhang *et al.*, 1991). Por otra parte, estudios previos mostraron correlación entre el comportamiento de cepas de rizobios crecidas en cultivo puro bajo estrés y la performance de los mismos microorganismos en condiciones ambientales de ese mismo estrés (Kulkarni y Nautiyal, 1999). Dicha observación da soporte por tanto a la evaluación de tolerancias a estreses *in vitro* como estrategia de búsqueda de cepas de rizobios adaptadas a diferentes medio ambientes en los cuales las temperaturas, los pHs extremos y/o la excesiva salinidad limiten la fisiología normal del microsimbionte y como consecuencia de ello la propia capacidad simbiótica.

III.2.3.2. Análisis de la tolerancia a cada tipo de estrés en los aislamientos de la colección discriminados de acuerdo a su sitio y población de origen.

III.2.3.2.1. Características de tolerancia a la temperatura.

Los aislamientos noduladores del complejo *D. virgatus* presentaron un crecimiento y desarrollo óptimo en medio nutritivo a 28°C de temperatura de incubación. Resultados de la literatura habían mostrado previamente que muchas especies de rizobios presentan su crecimiento óptimo en el rango de temperaturas de 28°C a 31°C (Graham, 1992). En la Tabla III.2. se muestra la tolerancia a temperaturas por encima de la óptima, de los rizobios discriminados por población y especie de *Desmanthus* de donde fueron aislados. Los resultados obtenidos muestran que 70 % de los aislamientos de la colección presentó crecimiento a 35°C y el 8 % fue capaz de crecer a la temperatura extrema de 40°C, mientras que ninguno desarrolló a 45°C. La mayoría de los rizobios son incapaces de crecer a temperaturas cercanas a 37°C (Graham, 1992), valor de temperatura que

permite establecer diferencias entre algunas especies del género *Rhizobium*, incluyendo aquellas capaces de nodular *P. vulgaris* (Ramírez-Bahena *et al.*, 2008).

Tabla III.2. Características de tolerancia a temperaturas de crecimiento superiores a la óptima en rizobios noduladores de *Desmanthus* spp., discriminados por población y especie de planta hospedadora de donde fueron aislados.

| Sitio y población de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> de donde fueron aislados los rizobios analizados | Número de rizobios evaluados | Porcentaje de rizobios tolerantes ^a a la temperatura de crecimiento (°C) indicada | | | |
|---|------------------------------|--|-----|----|----|
| | | 28 | 35 | 40 | 45 |
| <i>Entre Ríos – Pob. 1 - D. acuminatus</i> | 10 | 100 | 30 | 30 | 0 |
| <i>Corrientes - Pob. 2 - D. paspalaceus</i> | 21 | 100 | 43 | 0 | 0 |
| <i>Corrientes-Pob. 3 - D. paspalaceus</i> | 19 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| <i>Misiones-Pob. 4 - D. paspalaceus</i> | 10 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| <i>Chaco – Pob. 5 - D. paspalaceus</i> | 10 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Salta – Pob. 6 - D. paspalaceus</i> | 10 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| <i>Jujuy – Pob. 7 - D. virgatus</i> | 12 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| <i>Jujuy – Pob. 8 - D. virgatus</i> | 17 | 100 | 100 | 18 | 0 |
| <i>S. del Estero – Pob. 9 - D. virgatus</i> | 13 | 100 | 15 | 8 | 0 |
| <i>Santa Fe – Pob. 10 - D. paspalaceus</i> | 20 | 100 | 90 | 10 | 0 |

^a: Tolerancia expresa el crecimiento bacteriano óptimo.

Los cultivos de rizobios se repicaron por duplicado en placas con medio LMA y se incubaron a distintas temperaturas durante 5 días.

Los microsimbiontes de las poblaciones 3, 4, 7 y 8, y aproximadamente la mitad de la población 2, correspondientes a las provincias de Corrientes, Misiones y Jujuy, presentaron crecimiento óptimo a 35°C. Podría pensarse que dicho comportamiento en los rizobios esté vinculado a los climas cálidos tropical y subtropical característicos de las zonas de las cuales fueron originalmente aislados. Sin embargo, 90 % de los rizobios recuperados de la localidad de General Obligado, Santa Fe (población 10), mostraron también crecimiento adecuado a 35°C, mientras que los aislamientos obtenidos de la

provincia de Chaco (población 5), no presentaron desarrollo a una temperatura superior a 28°C. En relación a estos dos últimos casos, a pesar que las plantas de las poblaciones 5 y 10 fueron colectadas en suelos de la provincia fitogeográfica chaqueña, caracterizada por su clima subtropical, las cepas simbiotes mostraron diferencias notorias en su tolerancia a altas temperaturas.

Un comentario similar cabe también a los aislamientos recuperados de los suelos de Corrientes y Misiones que fueron incapaces de crecer a 40°C, a pesar que su región de procedencia se caracteriza por presentar un clima cálido y húmedo. En relación a la combinación de estos factores Hartel y Alexander (1984) demostraron que los rizobios simbiotes de *Vigna unguiculata* aislados de zonas cálidas y secas fueron más termotolerantes que aquellos originarios de regiones húmedas, indicando que la tolerancia a la temperatura y desecación puede estar relacionada con el sitio geográfico de procedencia. Zahran (1999) sugirió que en ambientes afectados por altas temperaturas se podrían recuperar rizobios tolerantes al calor. En concordancia con esta observación, cepas aisladas de nódulos de las raíces de *A. senegal* y *P. chilensis*, en regiones cálidas y áridas de Sudán, mostraron crecimiento a temperaturas de 38°C a 44°C (Zhang *et al.*, 1991). Además, rizobios noduladores de *V. unguiculata* cultivada en suelos del norte de Colombia presentaron un crecimiento óptimo a 35°C y 40°C, hecho atribuido al clima tropical de las zonas de origen (Cuadrado *et al.*, 2009). Más allá de estas características positivas de tolerancia, observada en varios rizobios de zonas cálidas, Karanja y Wood (1988) investigaron la capacidad de adaptación de los rizobios a las altas temperaturas hallando que un gran porcentaje de cepas aisladas de los suelos de Kenia tolerantes a 45°C-47°C habían perdido capacidad infectiva. Asimismo, estudios realizados con *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* demostraron que cepas capaces de nodular *P. vulgaris* a temperaturas de 35°C-38°C formaron nódulos sin capacidad de fijar nitrógeno en las plantas (Hungria y Franco, 1993).

Según se observa en la Tabla III.2., en este trabajo hemos obtenido rizobios noduladores de cuatro poblaciones del complejo *D. virgatus* con capacidad de crecimiento a 40°C. Las colonias de estos aislamientos tolerantes a temperaturas elevadas presentaron una gran producción de EPS. Osa-Afiana y Alexander (1982) relacionaron la capacidad de crecimiento de los rizobios del grupo caupí sometidos a altas temperaturas

con la cantidad de EPS producidos por las bacterias. En nuestra colección de aislamientos, las cepas termotolerantes fueron recuperadas de suelos de distintas zonas fitogeográficas, caracterizadas por presentar diferentes tipos de climas, lo cual indica que la tolerancia a temperaturas altas de los rizobios obtenidos en este trabajo es independiente del sitio de origen, coincidiendo con los resultados obtenidos por Mpepereki *et al.*, (1996) para rizobios aislados en suelos de Zimbabue.

La temperatura máxima o más elevada a la cual es posible el crecimiento bacteriano varía entre especies. De acuerdo a los datos presentados por Lindström y Lehtomäki (1988), la temperatura máxima de crecimiento de *R. leguminosarum* fue 31 a 35°C, de *S. meliloti* 38 a 41°C, de *R. loti* 33 a 37°C, de *R. fredii* 34 a 36°C y de *R. galegae* 33 a 37°C. Se ha reportado asimismo que *R. tropici* presenta desarrollo óptimo a 37°C, llegando a tolerar temperaturas máximas de 39°C (Pinto *et al.*, 1998, Martínez-Romero *et al.*, 1991) mientras que *S. saheli* y *S. teranga* pueden crecer en cultivo aún a 44°C (de Lajudie *et al.*, 1994).

En este trabajo de tesis, se lograron recuperar rizobios noduladores de *D. acuminatus*, *D. paspalaceus* y *D. virgatus* tolerantes a una temperatura de 40°C. Estos aislamientos constituyen material valioso como potenciales candidatos para ser considerados en programas de selección de mejores rizobios inoculantes, ya que la termotolerancia es una característica importante para las zonas del centro y norte de nuestro país.

III.2.3.2.2. Características de tolerancia a pH extremos.

Los rizobios simbioses del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos del centro y norte argentino mostraron un amplio rango de tolerancia a niveles de pH extremos. Según datos de la literatura, el crecimiento bacteriano para la familia *Rhizobiaceae* se había reportado en un intervalo de pH 4,5 a 9,5 (Jordan, 1984), posteriormente se ha citado el desarrollo en un rango de pH 4 a 10 para los géneros *Mesorhizobium* y *Rhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997; Kuykendall *et al.*, 2005) y en pH 5 a 10,5 para *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988; de Lajudie *et al.*, 1994).

Los aislamientos noduladores de las diez poblaciones de *Desmanthus* evaluadas en este trabajo presentaron un crecimiento óptimo en medio de cultivo a pH 6 y 7, mostrando variaciones en términos de su tolerancia a condiciones de acidez y alcalinidad.

En general, los rizobios de crecimiento rápido se han considerado menos tolerantes a pHs ácidos que aquellos de crecimiento lento (Norris, 1965; Graham, 1992). Sin embargo, en este trabajo 88 % de las cepas de la colección mostró crecimiento normal a pH 5, y 52% presentó una marcada ácido tolerancia desarrollando óptimamente en medio nutritivo a pH 4. Cepas de rizobios con alta tolerancia a la acidez en condiciones de laboratorio fueron reportadas en *Lotus* spp. (Cooper, 1982) y en *P. vulgaris* (Graham *et al.*, 1982; Lowendorf y Alexander, 1983). Las cepas tolerantes a la acidez en medios nutritivos presentan generalmente mejor eficiencia simbiótica en suelos ácidos (Graham *et al.*, 1994). Estas afirmaciones fueron sustentadas por Keyser *et al.*, (1979) quienes obtuvieron cepas simbiotes de *V. unguiculata* sensibles a la acidez del suelo a través de su incapacidad para crecer en medio de cultivo a pH 4,5. Asimismo, Graham *et al.*, (1982) distinguieron cepas sensibles y tolerantes a la acidez en medios nutritivos relacionando en forma positiva la cepa ácido tolerante con una mejor respuesta a la inoculación de *P. vulgaris* en condiciones de campo.

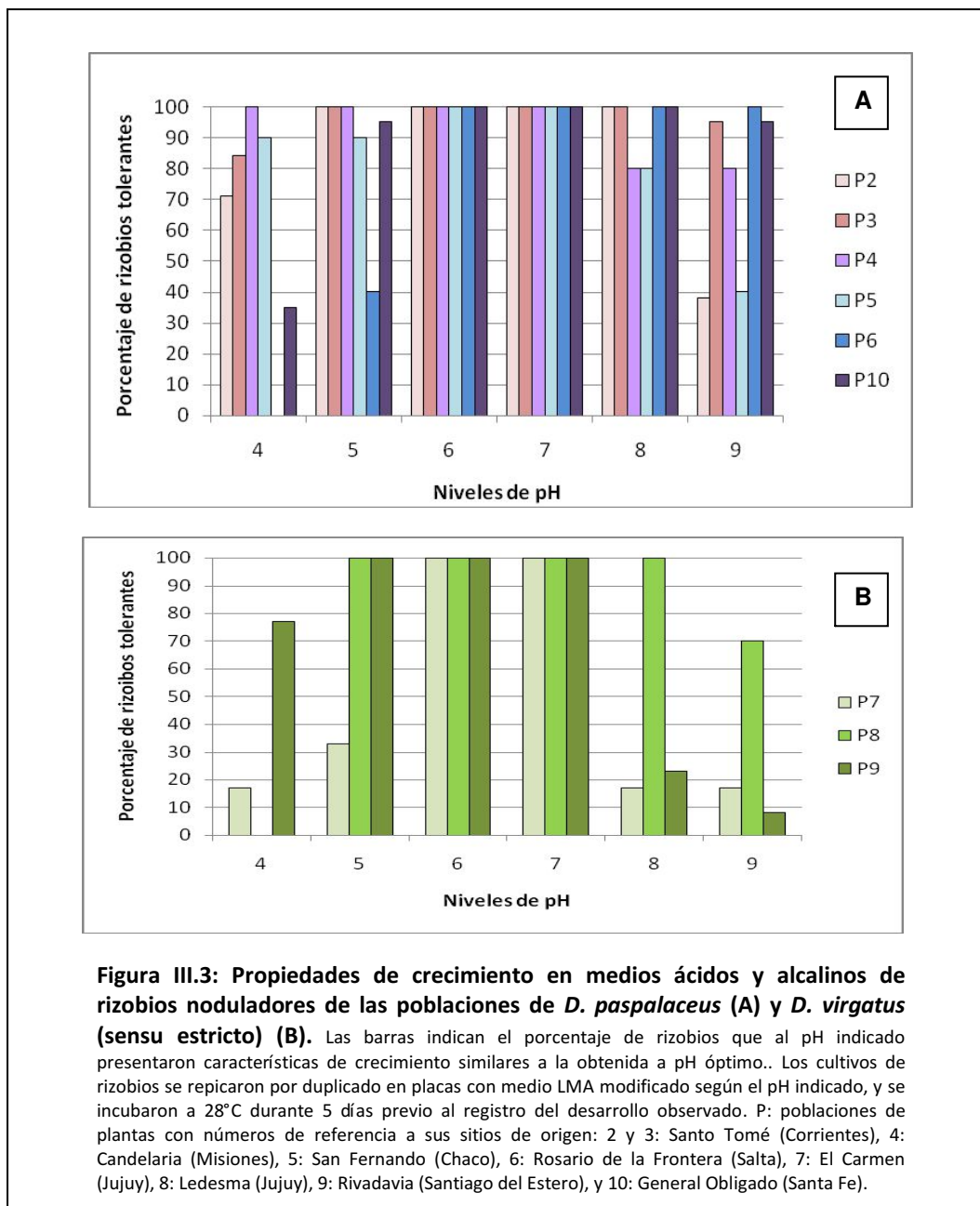
En relación a la tolerancia a la alcalinidad, 81 % y 59 % de los aislamientos simbiotes del complejo *D. virgatus* presentaron crecimiento óptimo a pH 8 y pH 9, respectivamente, mostrando una destacada capacidad de crecimiento en medios alcalinos a pesar que la mayoría de las cepas fueron recuperadas de suelos con pHs neutros o moderadamente ácidos (ver capítulo I, Tabla I.4.).

Los microsimbiontes de *D. acuminatus* (población 1, procedentes de Entre Ríos) presentaron un crecimiento normal en un amplio rango de niveles de pH, desde el valor más bajo evaluado hasta pH 8, según se muestra en la Tabla III.1. Cabe destacar en particular que 90 % y 50 % de los rizobios de la población 1 crecieron a pH 5 y 4, respectivamente, a pesar que el suelo de origen de los aislamientos mostró el valor de pH más alto de los sitios de la colección.

En la Figura III.3. se presenta el porcentaje de rizobios noduladores de las poblaciones de *D. paspalaceus* (A) y *D. virgatus* (sensu stricto) (B) tolerantes a distintos

niveles de pH en medio nutritivo. Los rizobios simbiotes de la especie *D. paspalaceus* mostraron una buena capacidad de crecimiento en medios con valores de pHs extremos.

Los aislamientos de Corrientes y Misiones (poblaciones 3 y 4) presentaron una marcada tolerancia a condiciones ácidas, coincidiendo los suelos de su lugar de origen con aquellos que presentaron los valores de pH más bajos, hecho que sugiere la posible presencia de efectos de adaptación y selección. Más allá observación, muchos de los rizobios de las poblaciones 3 y 4 (> 80 %) crecieron en un amplio rango de valores de pH (entre 4 y 9).



Los aislamientos de la población 6, recuperados de un suelo neutro con bajo contenido de materia orgánica, mostraron crecimiento óptimo en niveles neutros y alcalinos. En la Figura III.3.A se puede observar la escasa capacidad de crecimiento de las cepas simbiotes procedentes de la provincia de Salta en medios de cultivo ácidos.

Los rizobios de las poblaciones de *D. virgatus* (sensu stricto) mostraron diferentes respuestas en relación al crecimiento óptimo en los distintos niveles de pH evaluados. La mayoría de las cepas de la población 7 recuperadas de la localidad de El Carmen (Jujuy) pudieron crecer solamente en torno a la neutralidad, presentando un margen de tolerancia a pHs extremos muy pequeño y evidenciando marcada sensibilidad tanto a la acidez como a la alcalinidad. Los rizobios noduladores de la población 8 aislados de la ciudad de Ledesma (Jujuy) y procedentes de la misma región fitogeográfica que los anteriormente mencionados, mostraron un desarrollo óptimo en un rango más amplio de niveles de pH. Por otro lado, según se muestra en la Figura III.3.B las cepas nativas de la provincia de Santiago del Estero presentaron marcada tolerancia a la acidez. Los rizobios simbiotes de *D. virgatus* (sensu stricto) fueron recuperados de suelos molisoles con pH neutro, lo cual indicaría que no existió una correlación entre el pH del suelo del cual fueron originalmente aisladas las cepas y la tolerancia a pHs extremos en condiciones de laboratorio.

De acuerdo a datos de la literatura, diferentes investigaciones han demostrado que distintas cepas de una misma especie de rizobio pueden presentar variaciones en su tolerancia a diferentes niveles de pH (Graham and Parker, 1964; Keyser y Munns 1979; Lowendorf *et. al.*, 1981; Glenn y Dilworth, 1994). Los resultados obtenidos en el análisis y evaluación de la tolerancia de las rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* a la acidez y/o alcalinidad del medio ponen en evidencia que las cepas de la colección presentan una gran diversidad en su tolerancia a pHs extremos. En algunos casos, como en los aislamientos de la provincia de Corrientes y de Salta, se ha observado correlación entre el fenotipo de tolerancia y los pH de los suelos de los lugares de origen.

Las pruebas de tolerancia a factores abióticos presentadas en este Capítulo mostraron que muchas cepas nativas crecieron en niveles extremos de acidez. Desde lo agronómico, dado que muchos rizobios pueden ser más sensibles a pH bajos que sus propias plantas hospedadoras (Zahram, 1999), la selección de rizobios ácido tolerantes

como la que aquí hemos enfocado representa una estrategia posible para mejorar la calidad de los inoculantes para suelos ácidos, mejorar la simbiosis, y a raíz de ello la tolerancia a la acidez y persistencia de los cultivos bajo esa condición.

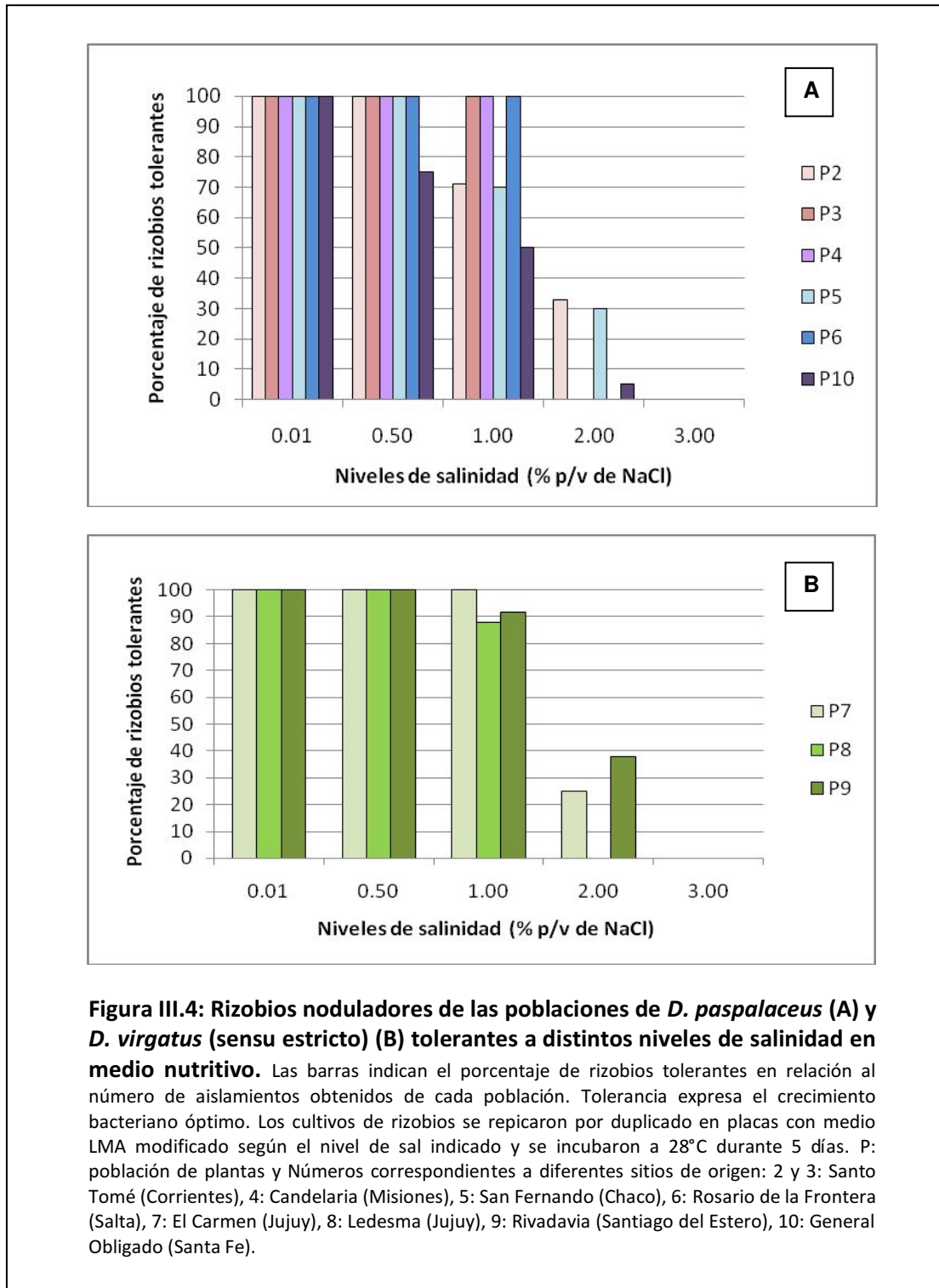
III.2.3.2.3. Características de tolerancia a condiciones de salinidad.

Los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* que hemos caracterizado en este trabajo y las cepas de referencia presentaron su crecimiento óptimo en concentraciones de 0,01 % y 0,5 % p/v de NaCl (equivalente a 17,1 y 85,5 mM NaCl respectivamente), mostrando una reducción del crecimiento a medida que incrementaba la concentración salina en el medio nutritivo (ver Tabla III.1.).

El crecimiento óptimo de los rizobios puede ser inhibido en concentraciones de 100 mM de NaCl (Singleton *et al.*, 1982; Yelton *et al.*, 1983; Zhang *et al.*, 1991). Sin embargo, 84,5 % de las cepas simbiotes del complejo *D. virgatus* presentaron desarrollo adecuado a 1 % p/v de NaCl (171 mM), 18% de las cepas nativas toleraron 2 % p/v de NaCl (342 mM), mientras que ningún aislamiento fue capaz de crecer en niveles extremos de 3 % p/v de NaCl (513 mM). Diversos investigadores han descrito el crecimiento bacteriano en concentraciones de sal superiores a 300 mM para cepas de *S. meliloti* (Graham y Parker, 1964; Sauvage *et al.*, 1983), *B. japonicum* USDA 191 (Yelton *et al.*, 1983) y en concentraciones extremas de 500 mM de NaCl para rizobios de *Acacia* sp. de regiones áridas de Marruecos (Zerhari *et al.*, 2000) y simbiotes de *A. senegal*, *P. chilensis*, y *L. leucocephala* de la República de Sudan (Zhang *et al.*, 1991).

Los resultados obtenidos en la evaluación de la tolerancia al estrés salino de acuerdo a la especie de la que los rizobios fueron aislados (ver Tabla III.1.) mostraron que la especie *D. acuminatus* presentó el mayor porcentaje de cepas simbiotes con capacidad para crecer en medios nutritivos a concentraciones de 1 y 2 % p/v de NaCl. En la Figura III.4. se muestra el porcentaje de cepas simbiotes de las poblaciones de *D. paspalaceus* (A) y de *D. virgatus* sensu stricto (B) tolerantes a diferentes niveles de salinidad en medio LMA, de acuerdo a su sitio y población de origen. Los rizobios noduladores de *D. paspalaceus* procedentes de Corrientes, Misiones y Salta (poblaciones 3, 4 y 6) mostraron un crecimiento óptimo en concentraciones de hasta 1 % de NaCl, mientras que no

toleraron niveles de salinidad superiores. Por el contrario, los simbiosntes recuperados de los suelos de Corrientes, Chaco y Santa Fe exhibieron una amplia variación en su tolerancia a la salinidad, incluso entre cepas obtenidas del mismo sitio de origen.



Las cepas simbiotes de las tres poblaciones de *D. virgatus* mostraron un crecimiento óptimo en medio nutritivo con contenidos de hasta 1 % de NaCl, según se muestra en la Figura III.4.B. Cabe destacar que 25 % y 38 % de los aislamientos recuperados de suelos de la localidad de El Carmen (población 7) y de la ciudad de Rivadavia (población 9) respectivamente, presentaron marcada tolerancia a concentraciones 2 % de NaCl.

Los suelos de los sitios de origen de las poblaciones del complejo *D. virgatus* son suelos no salinos (ver sección 3.3.1. del Capítulo I). Dicha situación indica que la tolerancia a la salinidad de los rizobios noduladores de la colección es independiente de la concentración salina de los suelos de procedencia. Elsheikh, (1998) indicó que la tolerancia a la salinidad de diferentes cepas de rizobios no estaría relacionada con las condiciones ecológicas de la zona de origen. Tal observación es concordante con los resultados que hemos obtenido para los aislamientos locales del complejo *D. virgatus*

III.2.3.3. Análisis y reconocimiento de las cepas de la colección de rizobios con características de tolerancia a diferentes factores abióticos adversos.

Las características del suelo como temperatura, humedad, composición química y física varían dentro de pequeñas áreas, y estas variaciones afectan a las poblaciones bacterianas del suelo (Willems *et al.*, 2006). De ese modo, las diferentes respuestas relacionadas con la acidez, alcalinidad, alta temperatura y salinidad pueden ser características distintivas de las bacterias del suelo e influir en la persistencia y capacidad de nodulación en las plantas leguminosas.

Los criterios básicos a considerar en el proceso de selección de cepas son la capacidad de sobrevivencia en el suelo, la adaptación o tolerancia a situaciones de estrés, la infectividad (formación de nódulos) y efectividad (fijación de nitrógeno). Uno de los puntos más importantes para la selección de cepas de rizobios con potencial uso como inoculante es su capacidad de tolerancia a condiciones ambientales adversas. Así, con el propósito de identificar aislamientos que muestren tolerancia destacada a más de un estrés abiótico, realizamos un relevamiento de la colección completa de rizobios con los resultados que se presentan en la Tabla III.3. Los aislamientos fueron seleccionados en función de su tolerancia, a, al menos, dos factores de estrés.

Tabla III.3. Identificación de los aislamientos locales de rizobios noduladores de *Desmanthus* spp. con tolerancia destacada a varios factores de estrés abiótico de importancia agronómica.

| Población de plantas hospedadoras | Cepa de rizobio* | Tolerancia a la condición de estrés abiótico indicada | | | |
|-----------------------------------|------------------|---|---------------|---|---------------------------|
| | | Temperatura 40°C | Niveles de pH | | Concentración 2% p/v NaCl |
| | | | 4 | 9 | |
| 1- <i>D. acuminatus</i> | 1L2.2 | + | - | + | + |
| | 1L4.1 | + | - | + | + |
| | 1L6.2 | - | + | - | + |
| | 1L10.1 | + | - | - | - |
| | 1L19.2 | - | + | - | + |
| | 1L21.2 | - | + | - | + |
| 2- <i>D.paspalaceus</i> | 2L1.2 | - | + | + | + |
| | 2L1.6 | - | + | + | + |
| | 2L1.8 | - | + | + | + |
| | 2L4.2 | - | + | + | + |
| | 2L8.1 | - | + | + | - |
| | 2L9.2 | - | + | + | - |
| 3-<i>D. paspalaceus</i> | 3L1.1 | - | + | + | - |
| | 3L1.2 | - | + | + | - |
| | 3L2.1 | - | + | + | - |
| | 3L2.2 | - | + | + | - |
| | 3L3.2 | - | + | + | - |
| | 3L3.3 | - | + | + | - |
| | 3L5.1 | - | + | + | - |
| | 3L5.2 | - | + | + | - |
| | 3L5.4 | - | + | + | - |
| | 3L6.1 | - | + | + | - |
| | 3L6.3 | - | + | + | - |
| | 3L8.2 | - | + | + | - |
| | 3L9.2 | - | + | + | - |
| | 3L9.3 | - | + | + | - |
| 3L10.1 | - | + | + | - | |
| 3L10.5 | - | + | + | - | |
| 4-<i>D. paspalaceus</i> | 4L1.1 | - | + | + | - |
| | 4L1.2 | - | + | + | - |
| | 4L3.3 | - | + | + | - |
| | 4L6.1 | - | + | + | - |
| | 4L6.3 | - | + | + | - |
| | 4L6.4 | - | + | + | - |
| | 4L6.5 | - | + | + | - |
| | 4L6.6 | - | + | + | - |
| 5-<i>D. paspalaceus</i> | 5L8.4 | - | + | + | - |
| | 5L9.4 | - | + | + | - |
| | 5L11.1 | - | + | + | + |
| | 5L11.2 | - | + | + | + |
| 7- <i>D. virgatus</i> | 7C3.1 | - | + | + | - |
| | 7C4.4 | - | + | + | - |
| 8- <i>D. virgatus</i> | 8L12.1 | + | - | + | - |
| | 8L12.3 | + | - | + | - |
| | 8L14.1 | + | - | + | - |
| 9- <i>D. virgatus</i> | 9L4.2 | - | + | - | + |
| | 9L22.2 | + | + | - | - |
| | 9L25.4 | - | + | - | + |
| | 9L26.2 | - | + | - | + |
| 10-<i>D.paspalaceus</i> | 10L1.8 | - | + | + | - |
| | 10L4.2 | - | + | + | - |
| | 10L6.1 | - | + | + | - |
| | 10L9.2 | - | + | + | - |
| | 10L11.4 | + | - | + | - |
| | 10L14.3 | - | + | + | - |
| | 10L15.3 | - | + | + | - |
| | 10L15.4 | + | + | + | - |

*seleccionadas en base a su tolerancia al menos a dos factores abióticos adversos.

(+): Crecimiento óptimo (-) : Sin crecimiento

El análisis de la Tabla III.3. muestra la existencia de un número muy importante de aislamientos con resistencias marcadas a distintas combinaciones de tres de las cuatro condiciones ensayadas, circunstancia que presenta a la lista de cepas finalmente seleccionadas como un material muy valioso para ser explorado de modo sistemático en programas de selección de rizobios inoculantes de *Desmanthus* para zonas edáficas marginales.

III.2.4. Características fenotípicas de los rizobios noduladores de *D. paspalaceus* recuperados de plantas de la provincia de Santa Fe (población 10).

La colección de rizobios noduladores de *D. paspalaceus* recuperados de la localidad de General Obligado, provincia de Santa Fe, fue constituida por un total de 20 aislamientos, según se ha descrito en la sección 3.2. del capítulo precedente. A partir de los nódulos de las plantas crecidas en el campo se obtuvieron solamente 2 aislamientos de rizobios, y mediante ensayos de nodulación en condiciones de crecimiento controlado empleando *D. paspalaceus* (Id 6932) como planta “trampa” y suelo de su propio lugar de origen se obtuvieron 18 aislamientos de un total de 17 plantas trampa.



Figura III.5. Morfología macroscópica de las colonias de rizobios noduladores de *D. paspalaceus* recuperados de la localidad de General Obligado, provincia de Santa Fe. Los cultivos de rizobios ensayados se repicaron en placas con medio LMA y se incubaron a 28°C durante 5 días.

III.2.4.1. Características morfológicas de los rizobios.

La morfología macroscópica se observó en placas de LMA y los aislamientos mostraron colonias circulares de bordes enteros y lisos, elevaciones cóncavas o convexas, colores blanquecinos a rosados y más rojizos, semitranslúcidas brillosas y mucilaginosas. En la Figura III.5. se muestra la diversidad en el aspecto macroscópico de los rizobios recuperados de los suelos de la localidad de General Obligado, provincia de Santa Fe.

La morfología celular se observó al microscopio óptico mediante la tinción diferencial de Gram y las cepas simbiotes presentaron forma de pequeños bacilos, Gram negativos y no esporulados.

III.2.4.2. Tolerancia a factores abióticos de los rizobios noduladores de *D. paspalaceus* recuperados de plantas de la provincia de Santa Fe.

Las características fisiológicas representadas por la tolerancia a diferentes factores abióticos son rasgos intrínsecos de cada rizobio y la variación entre las cepas puede ser lo suficientemente amplia como para permitir la distinción entre aislamientos de diferentes nódulos. Dichas variaciones se han observado en rizobios de crecimiento rápido y lento para la tolerancia a temperaturas extremas, salinidad, acidez y alcalinidad, siendo características más específicas de cepa que de especies (Amarger, 2001).

En la Tabla III.4. se presenta el crecimiento de los rizobios noduladores de *D. paspalaceus* aislados de suelos de la localidad de General Obligado, Santa Fe, evaluados bajo diferentes condiciones de estreses abióticos en medio LMA.

La mayoría de los rizobios presentaron crecimientos óptimos en un amplio intervalo de niveles de pHs, sin mostrar una clara relación con las características químicas del suelo de origen (ver sección 3.3.1. del capítulo I). Los aislamientos 10L1.8, 10C1.1 y en menor medida 10L6.1, 10L9.2 y 10C1.8 fueron capaces de crecer normalmente dentro de un intervalo de pH 4 a pH 9. Los aislamientos 10L4.2 y 10L5.3 mostraron la capacidad combinada para crecer en los niveles de pH 4 y 9, y en las concentraciones 1 y en menor medida 2 % de NaCl. Si bien la mayoría de las cepas mostraron un desarrollo óptimo en presencia de una cantidad moderada de sal (0,5 % de NaCl p/v), **los aislamientos 10L3.1 y 10C1.8 fueron capaces de crecer en medio suplementado con 2% de NaCl (p/v)**. Sin embargo, cabe señalar que la cepa 10L3.1 mostró un muy pobre crecimiento a pH 4,0. Por otro lado, **90 % los rizobios mostraron crecimiento normal a 35°C y los aislamientos nativos 10L11.4 y 10L15.4, y la cepa de referencia CB3126 fueron capaces de crecer a 40°C, una temperatura registrada con frecuencia en la zona fitogeográfica habitada naturalmente por las plantas de *D. paspalaceus*.**

Tabla III.4. Crecimiento de rizobios noduladores de *D. paspalaceus* de la provincia de Santa Fe (población 10) evaluados bajo distintas condiciones de estreses abióticos en medio LMA.

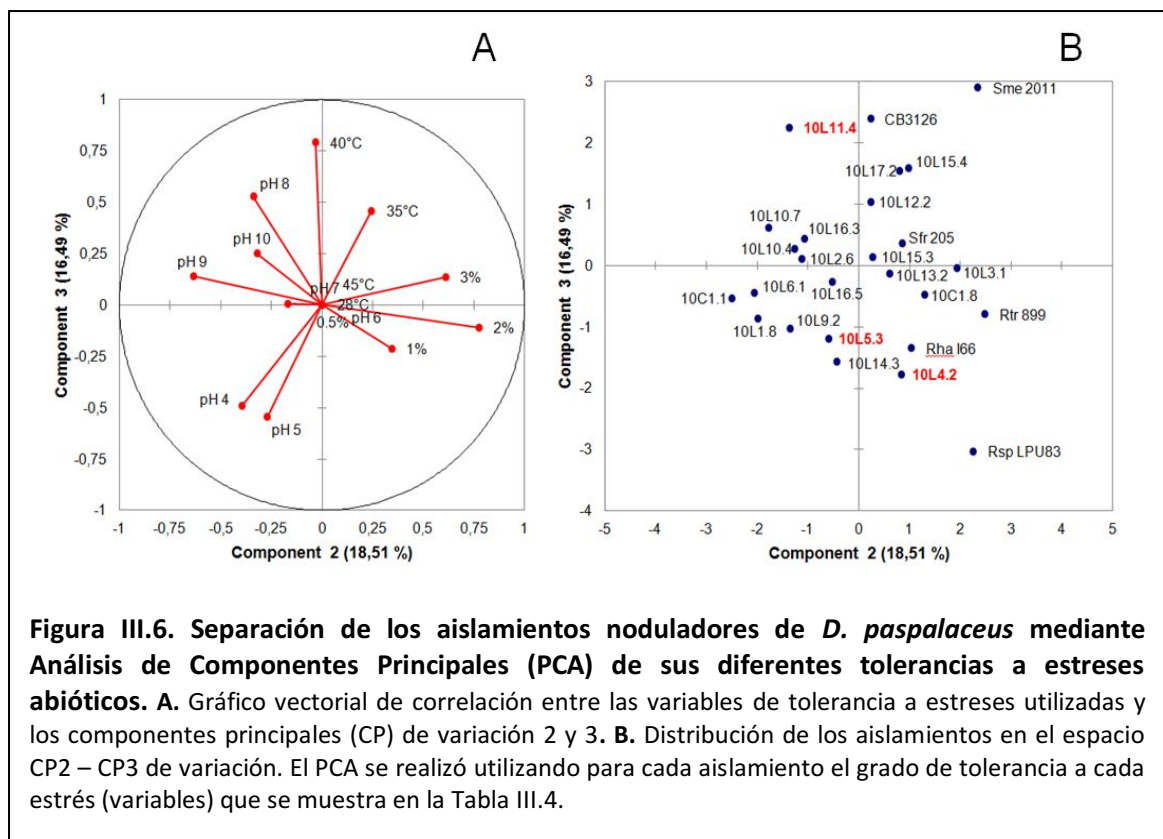
| Cepas ^b | Crecimiento a la temperatura indicada (°C) | | | | Crecimiento al nivel de pH indicado | | | | | | | Crecimiento a la concentración de NaCl (% p/v) indicada | | | |
|--------------------|--|-----|-----|-----|-------------------------------------|---|---|---|---|---|----|---|----|----|----|
| | 28° | 35° | 40° | 45° | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 0.5% | 1% | 2% | 3% |
| 10C1.1 | 5 | 4 | 1 | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2 | 5 | 1 | 0 | 0 |
| 10L6.1 | 5 | 4 | 1 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3 | 5 | 4 | 0 | 0 |
| 10L5.3 | 5 | 4 | 0 | 0 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1 | 5 | 4 | 2 | 0 |
| 10L1.8 | 5 | 4 | 1 | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2 | 5 | 4 | 0 | 0 |
| 10L10.4 | 5 | 4 | 1 | 0 | 2 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2 | 5 | 4 | 0 | 0 |
| 10L10.7 | 5 | 4 | 1 | 0 | 2 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2 | 5 | 1 | 0 | 0 |
| 10L14.3 | 5 | 3 | 0 | 0 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 0 | 4 | 3 | 1 | 0 |
| 10L15.4 | 5 | 4 | 4 | 0 | 2 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 2 | 4 | 4 | 2 | 2 |
| 10C1.8 | 5 | 5 | 1 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 5 | 4 | 3 | 3 |
| 10L2.6 | 5 | 4 | 1 | 0 | 2 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 5 | 2 | 0 | 0 |
| 10L3.1 | 5 | 5 | 0 | 0 | 1 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2 | 5 | 5 | 4 | 3 |
| 10L13.2 | 5 | 5 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| 10L16.5 | 5 | 3 | 2 | 0 | 1 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| 10L12.2 | 5 | 5 | 3 | 0 | 1 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 0 | 2 | 2 | 1 | 0 |
| 10L15.3 | 5 | 4 | 2 | 0 | 2 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 0 | 4 | 4 | 1 | 0 |
| 10L9.2 | 5 | 4 | 1 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 5 | 4 | 0 | 0 |
| 10L4.2 | 5 | 5 | 1 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4 | 0 | 5 | 4 | 2 | 0 |
| 10L11.4 | 5 | 5 | 4 | 0 | 2 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1 | 5 | 1 | 0 | 0 |
| 10L17.2 | 5 | 4 | 2 | 0 | 1 | 2 | 5 | 5 | 5 | 3 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 10L16.3 | 5 | 4 | 2 | 0 | 1 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Sme</i> 2011 | 5 | 5 | 3 | 0 | 0 | 2 | 5 | 5 | 5 | 4 | 2 | 5 | 4 | 3 | 2 |
| <i>Sfr</i> 205 | 5 | 5 | 0 | 0 | 1 | 3 | 5 | 5 | 5 | 4 | 0 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| <i>Rsp</i> LPU83 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 | 5 | 5 | 3 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Rha</i> 166 | 5 | 5 | 0 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 5 | 5 | 4 | 0 |
| <i>Rtr</i> 899 | 5 | 5 | 1 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 0 | 5 | 5 | 4 | 3 |
| <i>Rsp</i> CB3126 | 5 | 5 | 4 | 0 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 4 | 2 | 1 | 0 |

a: Escala de graduación: desde 5 (coloración oscura) hasta 0 (sin coloración) indican la capacidad de los rizobios para crecer bajo la condición investigada.

S mel: *S. meliloti* 2011 *Sfr*: *S. fredii* 205 *Rha*: *R. hainanense* 166 *Rtr*: *R. tropici* 899

En la Figura III.6. se presenta la separación de los aislamientos noduladores de *D. paspalaceus* mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP) de sus diferentes tolerancias a estreses abióticos. El ACP realizado a partir de los resultados mostrados en la Tabla III.4. evidenció que las tres primeras componentes explican 67 % de la variación fenotípica total observada.

La distribución de los rizobios en el espacio de los componentes 2 y 3, que representan más de 32 % de la variación total existente, permitió separar a los diferentes aislamientos en regiones donde se manifiestan las tolerancias a los diferentes estreses estudiados: izquierda abajo, tolerancia a acidez; izquierda arriba tolerancia a alcalinidad; arriba centro, tolerancia a temperaturas moderadamente altas; derecha al centro, tolerancia a salinidad.



Los resultados obtenidos indicaron que la colección de cepas incluyó aislamientos con diferentes grados de tolerancia a distintos estreses abióticos. De ese modo, los rizobios noduladores recuperados de la provincia de Santa Fe constituyeron candidatos adecuados para una evaluación posterior de sus propiedades simbióticas (ver capítulo V).

III. 3. Conclusiones.

Una de las estrategias utilizadas para incrementar la FBN es el aislamiento y la selección de cepas de rizobios y la posibilidad de introducir estos microorganismos en el suelo a través de la inoculación. Desde un punto de vista agronómico, la selección de cepas de rizobios eficientes, tolerantes a situaciones de estrés y con una adecuada supervivencia en el suelo y en las semillas constituyen la base para la producción de inoculantes microbianos que estimulen la producción vegetal.

En el presente Capítulo se determinaron y analizaron las características de tolerancia a diferentes estreses abióticos de la colección de rizobios noduladores de distintas especies del complejo *D. virgatus* en condiciones de laboratorio. Las cepas simbiotes mostraron una gran diversidad fenotípica, presentando en muchos casos tolerancia destacada a elevadas temperaturas, crecimiento en un amplio intervalo de valores de pHs y desarrollo en diferentes concentraciones de sal. Desde un punto de vista práctico, la termotolerancia de las cepas simbiotes constituye un rasgo positivo que favorecerá la supervivencia rizobiana en el suelo y en la superficie de las semillas inoculadas en zonas de climas tropicales y subtropicales.

Además, un grupo de aislamientos de la colección presentó marcada tolerancia a varios de los estreses abióticos anteriores frecuentemente presentes en los sitios del centro y norte de nuestro país en los que habitan las plantas del complejo *D. virgatus*. Sobre la base de estas observaciones y consideraciones, los resultados obtenidos en esta parte del trabajo presentan a la colección de rizobios que hemos obtenido y caracterizado como un recurso valioso para la búsqueda y selección de cepas eficientes en fijación de nitrógeno para la elaboración de inoculantes bacterianos que estimulen la producción vegetal de *D. virgatus*.

Capítulo IV

Biodiversidad genotípica de los rizobios simbiotes del complejo *D. virgatus* presentes en de suelos del centro y norte de Argentina.

IV.1. Introducción.

Los rizobios noduladores de plantas leguminosas fijadores de nitrógeno en simbiosis con ellas, son miembros genética y fisiológicamente diversos de las clases alfa- y beta-proteobacterias. De acuerdo a datos de la literatura, en muchas ocasiones las poblaciones de estos microsimbiontes presentan un alto nivel de diversidad genética que estaría asociado con un fuerte desequilibrio en la evolución de sus linajes (Eardly *et al.*, 1990; Demezas *et al.*, 1991; Demezas *et al.*, 1995; Eardly *et al.*, 1995) proporcionando evidencia de intercambio genético en las poblaciones. Las investigaciones realizadas sobre las estructuras genéticas de las poblaciones bacterianas del suelo sugieren la hipótesis que la recombinación jugaría un rol muy importante en la generación de nuevos genotipos (Dykhuizen y Green, 1991).

La evolución de la estructura de una población de rizobacterias simbióticas se halla influenciada por las condiciones ambientales que sirven de barreras biológicas para el intercambio de genes. El aislamiento geográfico, el tipo de suelo o el genotipo de la planta hospedadora (Miranda-Sánchez *et al.*, 2015) son parámetros importantes en el estudio de la evolución de un organismo (Demezas *et al.*, 1995). Un elemento adicional que también desempeña un papel crítico en la evolución de las poblaciones de rizobios es la ocurrencia de grandes plásmidos que pueden tener una historia evolutiva diferente en relación a la filogenia de las cepas actuales (Schofield *et al.*, 1987; Young y Wexler, 1988). Cabe destacar que, los plásmidos pueden experimentar reordenamientos y recombinaciones en altas frecuencias, aumentando la variabilidad genética de una población (Young y Wexler, 1988; Demezas *et al.*, 1995).

En el transcurso de los últimos años, el uso de técnicas moleculares ha estimulado el desarrollo de métodos simples y rápidos de caracterización de las poblaciones microbianas del suelo. Así, los métodos moleculares utilizados en los estudios de diversidad se han constituido en una herramienta muy útil en la investigación de una amplia variedad de rizobios asociados a *Phaseolus* spp. (Grange y Hungria, 2004), *Medicago sativa* (Gandee *et al.*, 1999; Carelli *et al.*, 2000; Roumiantseva *et al.*, 2002), *Medicago* sp. (Jebara *et al.*, 2001), *Hedysarum* spp. (Kishinevsky *et al.*, 2003) y las mimosoideas *Acacia seyal* (Diouf *et al.*, 2007), *Acacia senegal* (Fall *et al.*, 2008; Bakhoun *et al.*, 2014) y *Leucaena leucocephala* (Wang *et al.*, 1999c).

A pesar del gran potencial productivo de las plantas de *Desmanthus* spp. reconocido como una alternativa forrajera para regiones subhúmedas y semiáridas (Gardiner y Burt, 1995; Jones y Brandon, 1998; Fischbach *et al.*, 2005; Zabala *et al.*, 2008), son escasos los estudios sobre la diversidad genética de los rizobios que se asocian con estas leguminosas.

Las nuevas tecnologías para la caracterización genotípica de microorganismos basadas en métodos moleculares, han alcanzado una amplia difusión debido fundamentalmente a la rapidez y sensibilidad de los ensayos, al gran número de muestras que pueden ser procesadas simultáneamente y en un corto período de tiempo, y a la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Los métodos genotípicos más usados actualmente en los estudios de diversidad en rizobios son los perfiles de plásmidos (Wernegreen *et al.*, 1997), polimorfismo de los fragmentos de restricción de ADN (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Bromfield *et al.*, 1995; Odee *et al.*, 2002; Grange y Hungria, 2004), perfiles de lipopolisacáridos, técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) (Richardson *et al.*, 1995; Gandee *et al.*, 1999; Laranjo *et al.*, 2002; Vachot-Griffin y Thies, 2005), y más recientemente secuenciamientos genómicos masivos de aislamientos pre-seleccionados sobre la base de datos de campo y/o estudios moleculares rápidos (Sugawara *et al.*, 2013).

En particular, es muy amplia la aplicación de técnicas moleculares basadas en el uso de PCR (Saiki *et al.*, 1988). Dicha reacción puede resultar en un único producto de amplificación al utilizar cebadores oligonucleotídicos específicos de cepas, especies, géneros o grupos de bacterias. Esos productos pueden ser comparados en su tamaño o en su secuencia nucleotídica, ya sea por secuenciamiento directo o por técnicas como SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*) o DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Alternativamente, la PCR puede dar lugar a varios productos de amplificación si se emplean cebadores adecuados. Estos productos de amplificación que pueden ser muy variados en tamaño e intensidad, son usados frecuentemente para definir “huellas digitales de ADN” (*fingerprints*) en geles de agarosa o acrilamida que son característicos de una determinada cepa o aislamiento. Este tipo de perfiles de amplificación pueden ser obtenidos con cebadores cortos de secuencias arbitrarias DAF

(*DNA Amplification Fingerprinting*) (Caetano Anollés *et al.*, 1991), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990), o con cebadores que poseen secuencias conservadas y repetidas en genomas de bacterias (Versalovic *et al.*, 1991; de Bruijn *et al.*, 1992). En relación a estos últimos, han sido muy utilizadas como cebadores las secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP, *Repetitive Extragenic Palindromic sequences*) y las secuencias intergénicas consenso repetidas en enterobacterias (ERIC, *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences*) (Versalovic *et al.*, 1991; de Bruijn *et al.*, 1992). Los elementos ERIC fueron descubiertos en regiones intergénicas no codificantes de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Hulton *et al.*, 1991). Estas son unidades repetitivas pequeñas que contienen una región central conservada. Versalovic *et al.*, (1991), utilizando los cebadores complementarios a las secuencias conservadas, demostraron que pueden generarse perfiles complejos de amplificación usando la técnica de PCR en bacterias pertenecientes a Enterobacteriaceae. Sin embargo, hibridaciones *Southern* y amplificaciones por la técnica de PCR indicaron una amplia distribución de las secuencias ERIC (y similares a ERIC) en otras eubacterias.

Además de las metodologías mencionadas, existen otras que están dirigidas al estudio de la sistemática de bacterias más que a la caracterización de la diversidad genética entre cepas relacionadas. Entre los métodos que se emplean para establecer el género y especie de bacterias y en particular de rizobios se destaca el estudio de la secuencia (parcial o total) de nucleótidos de genes que codifican el ARN ribosómico 16S (Weisburg *et al.*, 1991), el gen *recA*, *atpD* (Gaunt *et al.*, 2001) y otros de modo de ensayar una taxonomía multilocus (Maiden *et al.*, 1998; Gevers *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2009a). La conservación del ARN ribosómico, por ser parte fundamental del ribosoma, como la existencia de variabilidad en alguno de sus dominios hacen de la secuencia de genes del ARN ribosómico (5S, 16S y 23S) una herramienta muy útil para la genocaracterización de organismos y la inferencia de sus filogenias (Martínez-Romero, 1994). La región que codifica estos genes es altamente conservada entre las bacterias y al mismo tiempo, lo suficientemente variable e informativa como para inferir relaciones filogenéticas entre especies bacterianas (Willems y Collins, 1993). La secuenciación parcial de ADN ribosómico (ADNr) 16S fue el criterio fundamental para proponer nuevas especies, como es el caso de *Rhizobium etli* (Segovia *et al.*, 1993), y también para agrupar especies bajo

un mismo género, como es el caso de *Sinorhizobium fredii* y *S. meliloti* (de Lajudie *et al.*, 1994). La secuenciación total de ADNr 16S ha sido en su momento el principal criterio para separar las especies de *S. medicae* y *S. meliloti* (Rome *et al.*, 1996). La secuenciación parcial y total de ADNr 16S, a partir de amplificadores obtenidos por PCR con cebadores específicos ha sido una de las técnicas más utilizadas para la genotipificación de rizobios (Young *et al.*, 1991; Yanagi y Yamasoto, 1993), siendo luego incorporada como una de las secuencias de análisis multilocus junto a otros marcadores de valor taxonómico. Los esquemas de identificación y análisis filogenético de bacterias a través de la metodología MLSA (*Multi Locus Sequence Analysis*), que incluyen el análisis de varios genes de funciones basales (*housekeeping*), se han aplicado a grupos de rizobios como *Ensifer* (Martens *et al.*, 2007; Martens *et al.*, 2008, Degefu *et al.*, 2012), *Rhizobium* (Ribeiro *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2012) y *Bradyrhizobium* (Menna *et al.*, 2009; Rivas *et al.*, 2009b; Delamuta *et al.*, 2012). En la actualidad, dichas aproximaciones comienzan a ser sustituidas, cuando es posible, por análisis de secuencias genómicas *core* (decenas de genes) resultantes del secuenciamiento masivo de múltiples aislamientos (Sugawara *et al.*, 2013; Azevedo *et al.*, 2015).

El objetivo del presente capítulo fue caracterizar genotípicamente los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*.

En una primera instancia se describe el análisis de los megaplásmidos presentes en los aislamientos de rizobios y el estudio de la diversidad genética de los aislamientos simbioses a través de técnicas de *fingerprint* de ADN total por métodos de PCR. Posteriormente, se presenta la posición taxonómica de varios de los aislamientos noduladores del complejo *D. virgatus* que se han presentado en los capítulos precedentes a través de análisis de secuencias parciales 16S.

IV.2. Resultados y discusión.

IV.2.1. Características genotípicas de los aislamientos de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*.

IV.2.1.1. Análisis de los megaplásmidos presentes en los aislamientos de rizobios discriminados de acuerdo a su sitio y población de origen.

Con el propósito de caracterizar los elementos extracromosomales presentes en los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*, se investigó el tipo y diversidad de plásmidos presentes en un grupo de treinta aislamientos representativos de nuestra colección (conformado por tres cepas tomadas al azar de cada sitio y población de origen). Cada aislamiento fue analizado utilizando la técnica de electroforesis en geles de agarosa tipo Eckhardt según se detalla en la sección 8.1. de Materiales y Métodos.

En la tabla IV.1. se muestra la evaluación de la presencia de megaplásmidos en los aislamientos de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*, discriminados de acuerdo a su sitio y población de origen. Los aislamientos que evidenciaron la presencia de elementos extracromosomales (27 % de los rizobios analizados) fueron en su mayoría simbioses de la especie *D. virgatus* recuperados de suelos de Jujuy y Santiago del Estero. En los microsimbioses de *D. acuminatus* y *D. paspalaceus* aislados de las provincias de Corrientes, Entre Ríos, Chaco y Salta no se detectaron plásmidos con la metodología utilizada. Puede ocurrir de todos modos que plásmidos muy grandes no hayan sido detectados.

Tabla IV.1: Evaluación de la presencia de megaplásmidos en rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*, discriminados según su sitio de origen y población de planta hospedadora.

| Sitio y población de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> de donde fueron aislados los rizobios analizados | Aislamiento ^{1,2} | Presencia de plásmidos ³ |
|---|----------------------------|-------------------------------------|
| Entre Ríos - Población 1 - <i>D. acuminatus</i> | 1L11.2 | ND |
| | 1L19.2 | ND |
| | 1L21.3 | ND |
| Corrientes - Población 2 - <i>D. paspalaceus</i> | 2L3.2 | ND |
| | 2L4.5 | ND |
| | 2L8.1 | ND |
| Corrientes - Población 3 - <i>D. paspalaceus</i> | 3L5.1 | ND |
| | 3L6.3 | ND |
| | 3L10.5 | ND |
| Misiones - Población 4 - <i>D. paspalaceus</i> | 4L3.3 | ND |
| | 4L4.2 | ND |
| | 4L6.3 | ND |
| Chaco - Población 5 - <i>D. paspalaceus</i> | 5L8.4 | ND |
| | 5L9.4 | ND |
| | 5C1.1 | ND |
| Salta - Población 6 - <i>D. paspalaceus</i> | 6L4.2 | ND |
| | 6L6.1 | ND |
| | 6L9.3 | ND |
| Jujuy - Población 7 - <i>D. virgatus</i> | 7L2.2 | SI |
| | 7L4.2 | SI |
| | 7C5.7 | SI |
| Jujuy - Población 8 - <i>D. virgatus</i> | 8L6.3 | SI |
| | 8L10.1 | SI |
| | 8L12.1 | SI |
| Santiago del Estero - Población 9 - <i>D. virgatus</i> | 9L22.2 | SI |
| | 9L25.4 | ND |
| | 9L26.2 | ND |
| Santa Fe - Población 10 - <i>D. paspalaceus</i> | 10L5.3 | ND |
| | 10L11.4 | SI |
| | 10C1.1 | ND |
| Cepa de referencia | CB3216 | ND |

¹ L indica aislamientos recuperados en ensayos de nodulación en el laboratorio y C obtenido en condiciones de campo (para detalle de la nomenclatura ver Materiales y Métodos sección 6.1.).

² Los aislamientos fueron evaluados utilizando la técnica de Eckhardt (1978).

³ ND indica no detectada la presencia de plásmidos, y SI indica presencia de al menos un plásmido.

La Figura IV.1. muestra los perfiles plasmídicos obtenidos y pone en evidencia la presencia de un patrón de bandas similar en los aislamientos de rizobios recuperados de suelos de Jujuy (poblaciones 7 y 8). En los perfiles de los aislamientos 9L22.2, procedente de Santiago del Estero, y 10L11.4, de Santa Fe, se observa la presencia de una y dos bandas plasmídicas respectivamente.

Debe considerarse que cada banda del gel corresponde al menos a una especie plasmídica, pudiendo ocurrir que una única banda contenga a más de un plásmido de

similar movilidad electroforética. Desconocemos hasta el momento si alguno de los plásmidos detectados es portador de información asociada a genes de nodulación o de fijación de nitrógeno.



IV.2.1.2. Estudio de la diversidad genética de los aislamientos simbiotes a través de técnicas de huellas digitales de ADN total por métodos de PCR.

El análisis de la diversidad del germoplasma asociado al complejo *D. virgatus* se realizó a través de la generación de huellas digitales de ADN empleando como cebadores secuencias conservadas de bacterias (BOXA1R - MBOREP1).

Los resultados obtenidos del análisis revelaron siete tipos de perfiles de amplificación BOXA1R diferentes evidenciando una marcada diversidad genética entre los aislamientos simbiotes de *D. virgatus*. En la Figura IV.2. se presentan los resultados de

un análisis UPGMA realizado en base a presencia/ausencia de bandas observadas en el gel para los productos de amplificación de cada uno de los aislamientos.

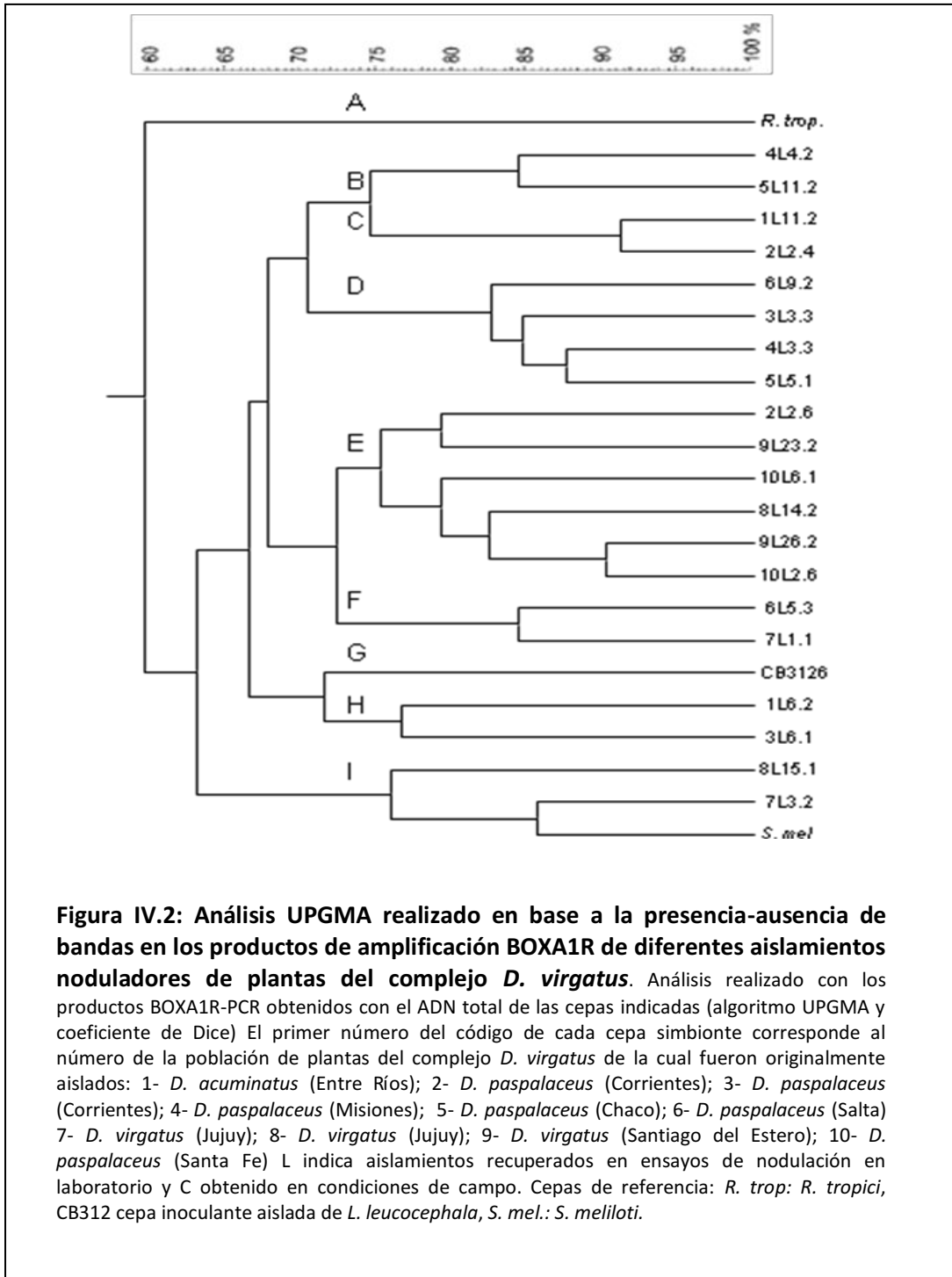


Figura IV.2: Análisis UPGMA realizado en base a la presencia-ausencia de bandas en los productos de amplificación BOXA1R de diferentes aislamientos noduladores de plantas del complejo *D. virgatus*. Análisis realizado con los productos BOXA1R-PCR obtenidos con el ADN total de las cepas indicadas (algoritmo UPGMA y coeficiente de Dice) El primer número del código de cada cepa simbiote corresponde al número de la población de plantas del complejo *D. virgatus* de la cual fueron originalmente aislados: 1- *D. acuminatus* (Entre Ríos); 2- *D. paspalaceus* (Corrientes); 3- *D. paspalaceus* (Corrientes); 4- *D. paspalaceus* (Misiones); 5- *D. paspalaceus* (Chaco); 6- *D. paspalaceus* (Salta) 7- *D. virgatus* (Jujuy); 8- *D. virgatus* (Jujuy); 9- *D. virgatus* (Santiago del Estero); 10- *D. paspalaceus* (Santa Fe) L indica aislamientos recuperados en ensayos de nodulación en laboratorio y C obtenido en condiciones de campo. Cepas de referencia: *R. trop.*: *R. tropici*, CB312 cepa inoculante aislada de *L. leucocephala*, *S. mel.*: *S. meliloti*.

El perfil tipo "E" está representado por 30 % de las cepas recuperadas de cuatro sitios del centro y norte argentino, mientras que cinco perfiles BOXA1R se hallan representados solo por dos aislamientos procedentes de suelos diferentes. Las cepas de referencia *R. tropici* y CB3126 mostraron perfiles BOXA1R distintos a los observados en los aislamientos simbiotes de *D. virgatus*.

De acuerdo a datos de la literatura, diversos estudios han reportado una amplia diversidad genética a nivel de cepa en otros rizobios como por ejemplo en *S. meliloti* (Paffetti *et al.*, 1996; Gandee *et al.*, 1999; Carelli *et al.*, 2000; Jebara *et al.*, 2001; Roumiantseva *et al.*, 2002; Zribi *et al.*, 2005). Paffetti *et al.* (1996) analizaron la diversidad genética de cepas de *S. meliloti* aisladas a partir de nódulos de diferentes cultivares de alfalfa establecidas en suelos de Italia y hallaron que el tipo de suelo y el cultivar eran responsables de una alta variación genética. Diversos investigadores sostienen que el tipo de suelo constituye asimismo un factor determinante sobre la diversidad genética de poblaciones de *R. leguminosarum* (Strain *et al.*, 1994) y *Sinorhizobium* spp. (Zribi *et al.*, 2005).

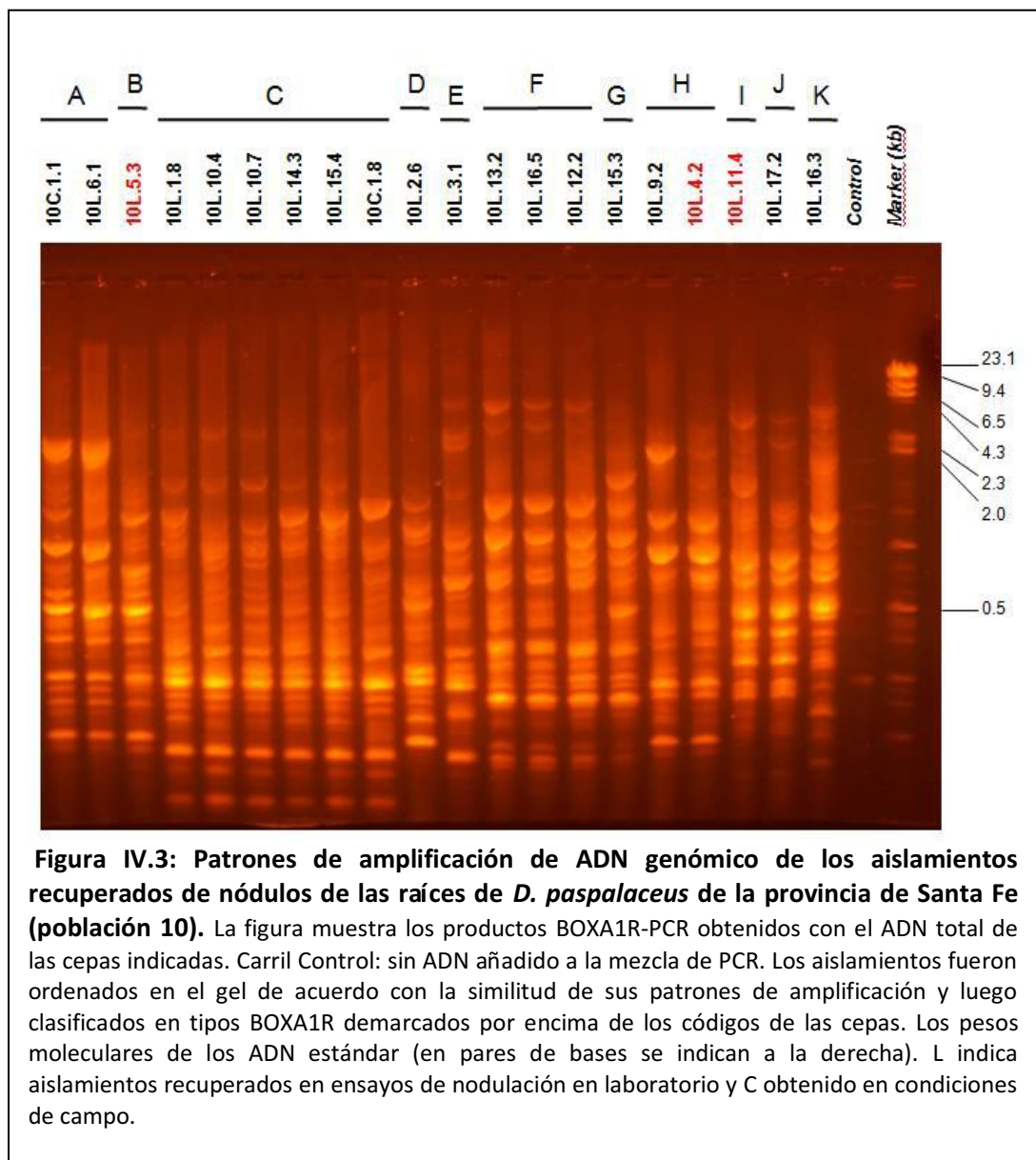
IV.2.1.2.1. Análisis de la diversidad genética de los aislamientos simbiotes discriminados de acuerdo a su sitio y población de origen.

Con el fin de investigar en más detalle la diversidad genética de los rizobios noduladores de *Demanthus* spp. se analizaron los perfiles de amplificación genómico de los aislamientos simbiotes de distintas poblaciones del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos de diferentes provincias fitogeográficas.

El análisis de la diversidad de las bacterias simbiotes de *D. paspalaceus* (población 10 de este trabajo) se realizó con 20 aislamientos recuperados de Santa Fe, provincia fitogeográfica Chaqueña, a través de la generación de huellas digitales BOXA1R por PCR. La Figura IV.3. muestra los resultados de este análisis, donde se pueden distinguir al menos 11 patrones de amplificación diferentes (desde "A" a "K"), evidenciando una notable diversidad genética.

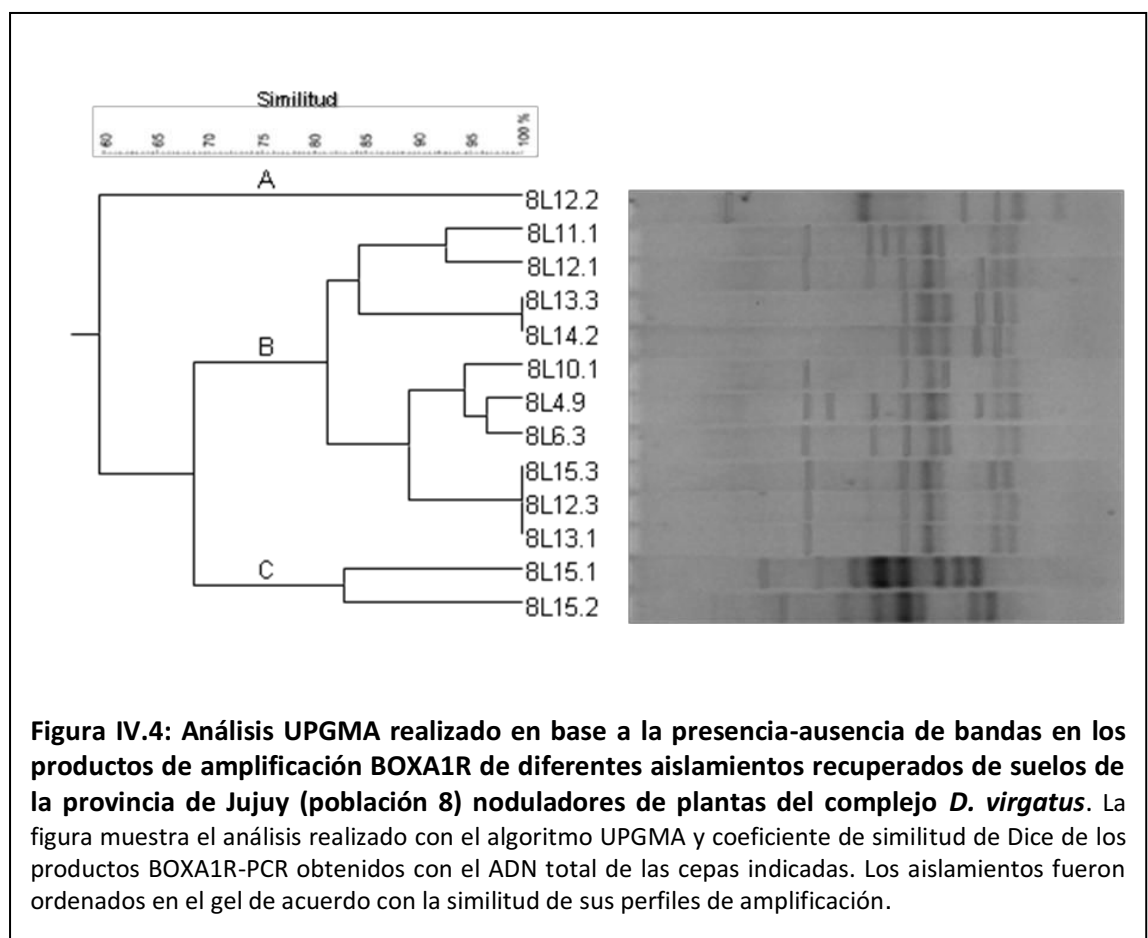
Los aislamientos simbiotes de *D. paspalaceus* presentes en la localidad de General Obligado, Santa Fe (características químicas de suelo se detallan en la Tabla I.4., sección

2.2.3.1., Capítulo I) resultaron ser genéticamente diversos. De acuerdo con las huellas digitales de ADN genómico los rizobios pueden agruparse dentro de 11 tipos de perfiles BOXA1R diferentes, uno incluyendo el 30 % de las cepas (tipo C) y 7 perfiles representados por un único aislamiento. Según datos de la literatura, en el caso particular de *S. meliloti* también es muy frecuente que existan diferencias genotípicas aún entre aislamientos de un mismo suelo (Kosier *et al.*, 1993; Segundo *et al.*, 1999).



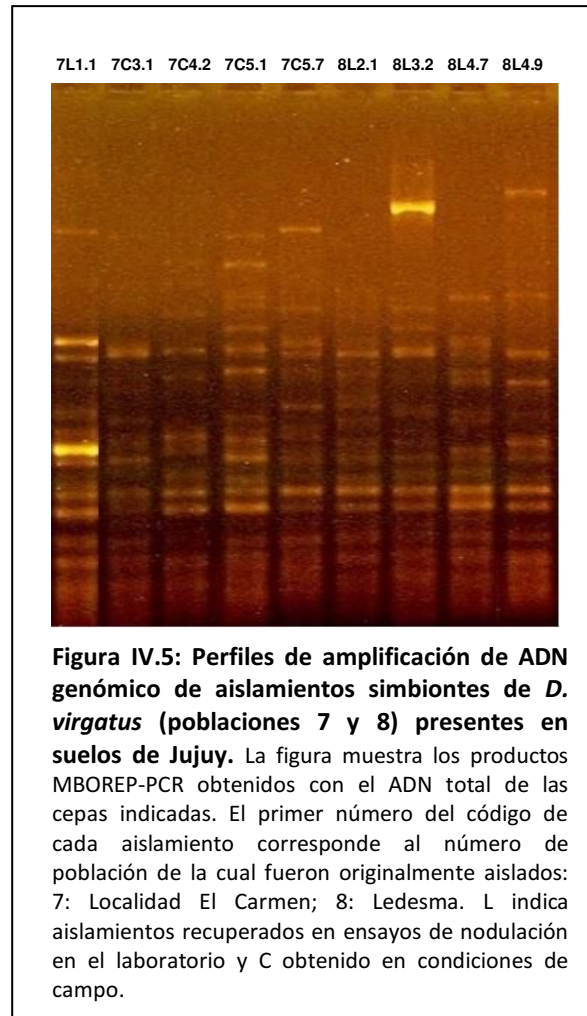
El análisis del germoplasma colectado mostró, en concordancia con los análisis fenotípicos y de tolerancia a distintas condiciones de estreses abióticos (ver Tabla III.4., sección 2.4.2. del Capítulo III) una marcada diversidad entre los aislamientos presentes en una misma provincia fitogeográfica como la chaqueña, en suelos de la provincia de Santa Fe.

El análisis de la diversidad genética de los rizobios simbios de *D. virgatus* (población 8) recuperados de la localidad de Ledesma, Jujuy, provincia fitogeográfica de las Yungas, se presenta en la Figura IV.4. El análisis estadístico realizado evidenció la separación de los aislamientos en tres tipos principales de perfiles BOXA1R diferentes (similitud de 75 % para el valor de corte). El perfil tipo "B" incluye el 77 % de los aislamientos, mientras que los perfiles "A" y "C" se hallan representados solo por una y dos cepas respectivamente.



Según se muestra en la Figura IV.5., los perfiles de amplificación de ADN genómico utilizando como cebador MBOREP-1 de las cepas simbiotes de *D. virgatus* (sensu estricto) presentes en suelos molisoles, bien provistos en materia orgánica y contenido de nutrientes, también mostraron resultados análogos a los obtenidos con el cebador BOX A1R evidenciando una escasa diversidad genética (salvo en algunos casos que se observan leves diferencias en la intensidad relativa de las bandas).

La aparente similitud genética a nivel plasmídico de los aislamientos recuperados de los suelos de las localidades de El Carmen y Ledesma, provincia de Jujuy (ver Figura IV.1.) se extendería al resto del genoma de los simbiotes de *D. virgatus* analizados en este trabajo.



En la Figura IV.6. se presenta el análisis de la diversidad genética del germoplasma asociado con *D. paspalaceus* recuperado de la localidad de Santa Tomé, Corrientes (población 3), provincia fitogeográfica Paranaense. De acuerdo con las huellas digitales de ADN genómico los rizobios pudieron agruparse dentro de 6 tipos de perfiles BOXA1R diferentes, uno de ellos que incluyó 35 % de las cepas (tipo "C") y 3 perfiles representados por un único aislamiento.

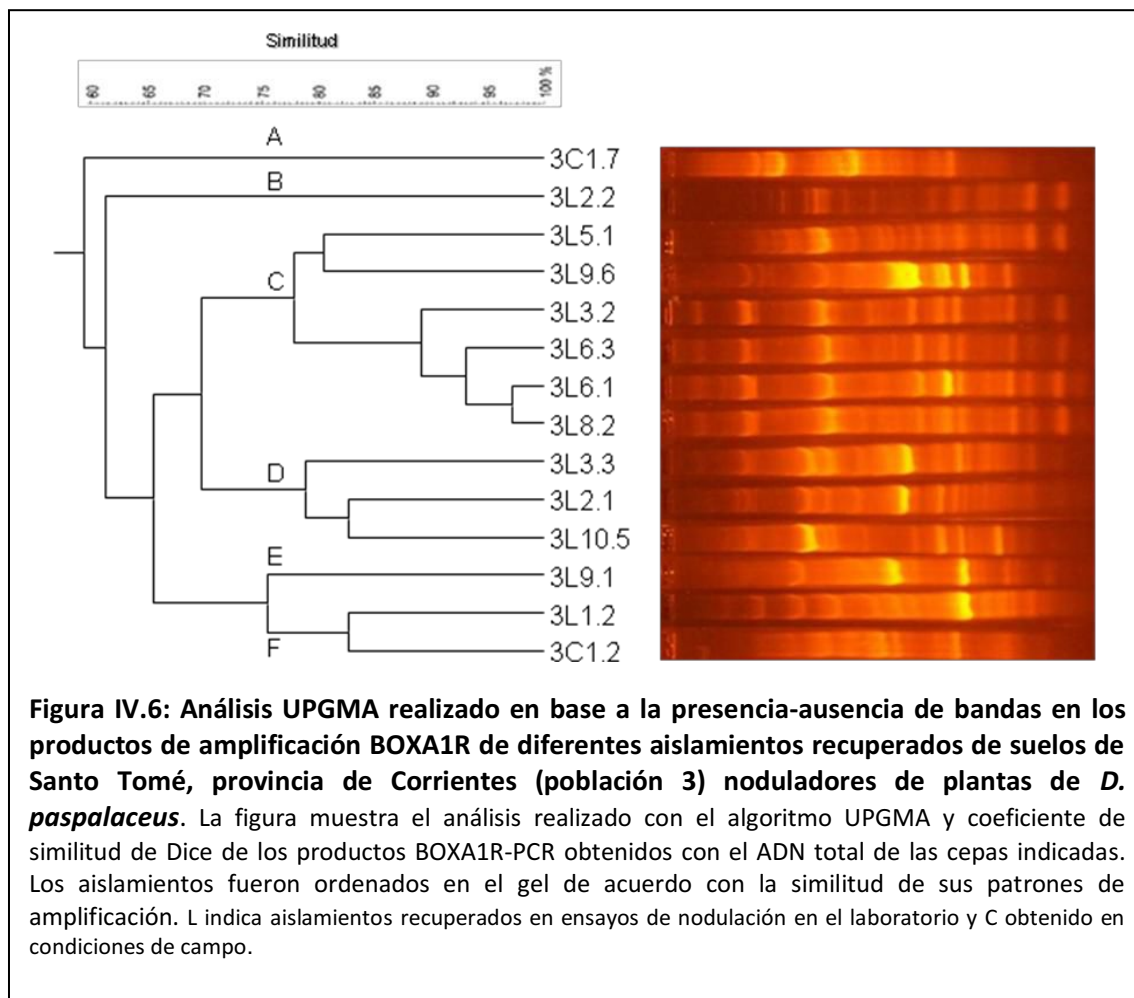


Figura IV.6: Análisis UPGMA realizado en base a la presencia-ausencia de bandas en los productos de amplificación BOXA1R de diferentes aislamientos recuperados de suelos de Santo Tomé, provincia de Corrientes (población 3) noduladores de plantas de *D. paspalaceus*. La figura muestra el análisis realizado con el algoritmo UPGMA y coeficiente de similitud de Dice de los productos BOXA1R-PCR obtenidos con el ADN total de las cepas indicadas. Los aislamientos fueron ordenados en el gel de acuerdo con la similitud de sus patrones de amplificación. L indica aislamientos recuperados en ensayos de nodulación en el laboratorio y C obtenido en condiciones de campo.

La marcada diversidad genética de los rizobios noduladores de *D. paspalaceus* presentes en los suelos asociados a la población 3 -pobres en contenido de fósforo y con pH bajos (ver Tabla I.4., sección 2.2.3.1. del Capítulo I) característicos de la provincia fitogeográfica Paranaense-, también pudo observarse en el germoplasma recuperado del suelo asociados a *D. paspalaceus* de la población 2 de la misma provincia, según se muestra en la Figura IV.7.

2L1.2 2L1.6 2L1.8 2L2.4 2L2.6 2L3.2 2L3.3 2L3.6 2L4.2 2L4.5 2L7.5 2L8.1 2L8.3 2L8.4 2L9.2 2L9.4

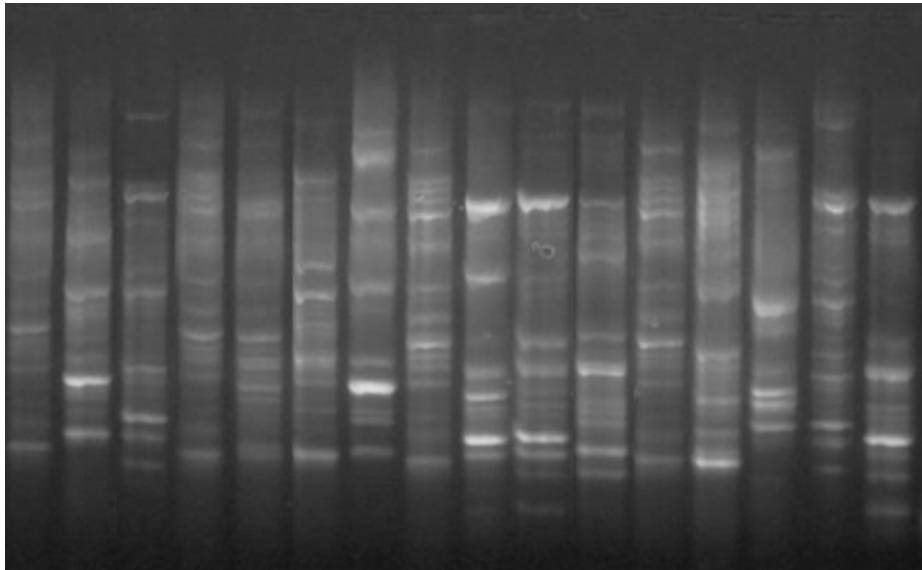


Figura IV.7: Patrones de amplificación de ADN genómico de los aislamientos recuperados de nódulos de *D. paspalaceus* de la provincia de Corrientes (población 2). La figura muestra los productos BOXA1R-PCR obtenidos con el ADN total de las cepas indicadas. L significa aislamientos recuperados en ensayos de nodulación en el laboratorio (para detalle de la nomenclatura ver Materiales y Métodos sección 6.1.).

Los estudios que hemos presentado muestran una marcada diversidad en los simbioses locales de plantas del complejo *D. virgatus*, con variaciones en el grado de diversidad que dependen del sitio particular de origen de los mismos. La diversidad genética observada resulta de especial interés atento a la posibilidad de explorar dentro de la misma diferentes características simbióticas y de adaptabilidad a ambientes específicos. Como ya ha sido reportado, la diversidad de rizobios puede determinar la capacidad de ciertas especies de leguminosas de habitar un determinado ecosistema. Estudios realizados por Béna *et al.*, (2005) indican que la distribución geográfica de *S. medicae* y *S. meliloti*, genéticamente diversos, ejerce una fuerte influencia sobre la distribución de especies de *Medicago* y la capacidad para colonizar nuevas áreas. En este contexto, se reafirma la importancia del estudio de la biodiversidad de los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*, no sólo por su rol como microsimbioses de leguminosas con reconocido potencial forrajero, sino también como un factor biótico potencialmente importante para el establecimiento con fines productivos de especies de

Desmanthus en nuestros suelos. La amplia diversidad genética observada en los aislamientos locales muestra poblaciones de rizobios simbiotes de *Desmanthus* spp muy complejas, y pone de manifiesto la dificultad de predecir la interacción de los distintos genotipos con el ambiente y con la planta huésped, hacia la selección de una eventual cepa inoculante.

IV.2.1.3. Posición filogenética de los aislamientos simbiotes de *D. paspalaceus* recuperados de suelos de la localidad de General Obligado, provincia de Santa Fe.

IV.2.1.3.1. Secuenciación parcial y análisis de los genes ADNr 16S y *nodC*.

Con el propósito de inferir la posición taxonómica de las cepas simbiotes de *D. paspalaceus* en comparación con la de otras especies de rizobios, se analizaron las secuencias de nucleótidos de productos de amplificación parcial del gen ADNr 16S (ver sección 8.6. de Materiales y Métodos) de los aislamientos 10L4.2, 10L5.3 y 10L11.4, junto con la de la cepa de referencia CB3126).

La Figura IV.8. muestra un árbol filogenético obtenido (*neighbor joining*), donde los aislamientos 10L4.2 y 10L5.3 se incluyen en un clado que incluye varios mesorizobios (cerca a *M. plurifarum*) y el aislamiento 10L11.4 en un clado de rizobios cerca de *R. alamii*, *R. mesosinicum* y *R. gallicum*. De acuerdo con la secuenciación del ADNr 16S, la cepa de referencia CB3126 ha sido identificada como *Sinorhizobium terangae* (el fragmento analizado presentó 100 % de identidad de secuencia con el homólogo de la cepa *S. terangae* LMG 7834). Anteriormente, Beyhaut *et al.* (2006b) reportaron que *Rhizobium giardinii* y *R. leguminosarum* habían sido capaces de nodular *Desmanthus illinoensis*.

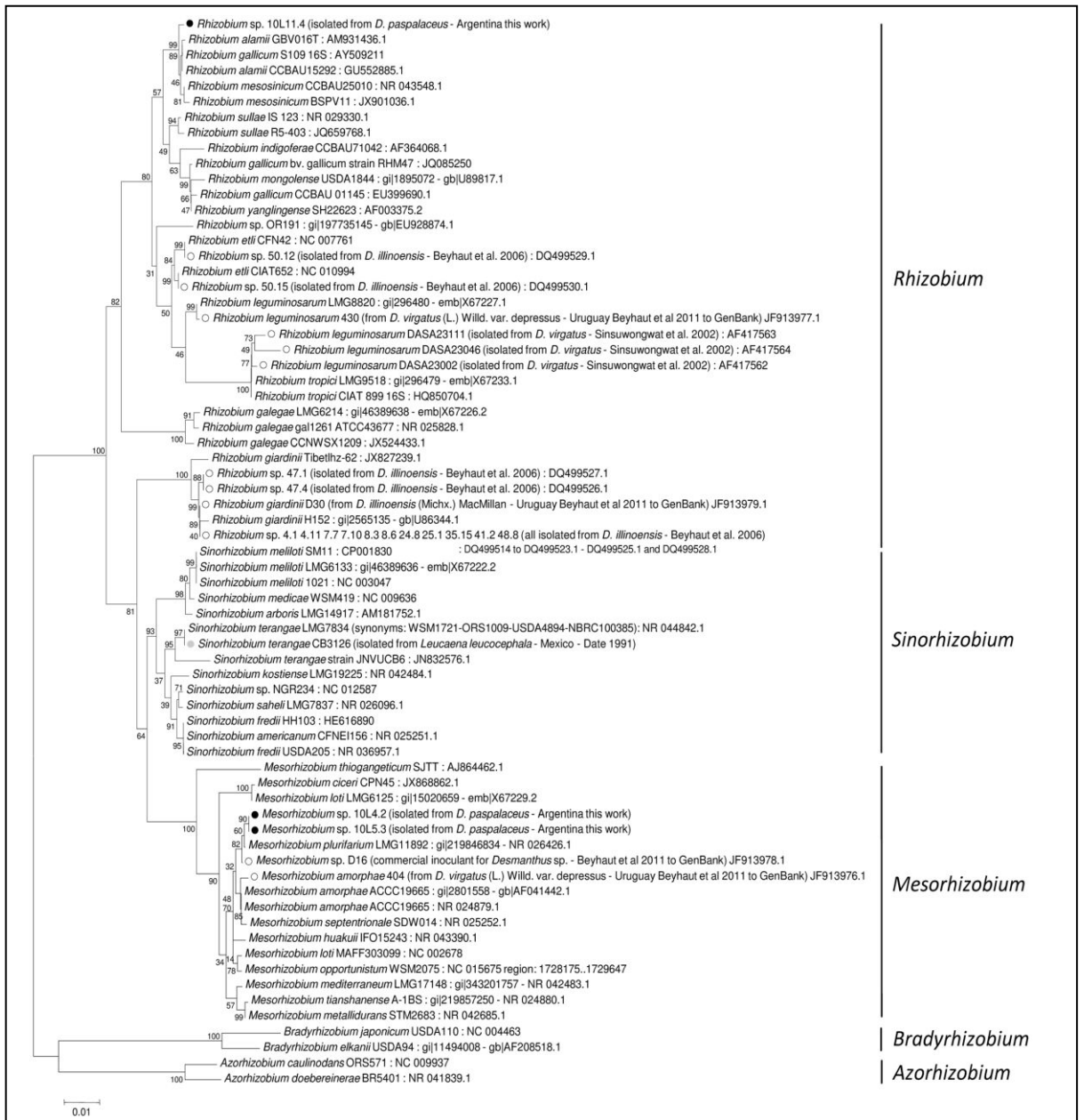


Figura IV.8: Relaciones filogenéticas (*neighbor-joining*) entre las regiones ADNr 16S de diferentes rizobios incluyendo los simbiosites de *D. paspalaceus* presentes en suelos de General Obligado, Santa Fe. Las secuencias de rDNA fueron analizadas con el programa MEGA 5.05 (Clustal, *neighbor-joining method*). La filogenia fue reconstruida a partir de fragmentos de rDNA amplificados con los primers fd1 yrD1 (Weisburg, *et al.*, 1991). El árbol consenso corresponde a una inferencia realizada con una *bootstrap* de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). El porcentaje de replicas (árboles) en los que los que cada taxa se agrupo de manera conjunta se muestra junto a cada punto de ramificación. El árbol está dibujado en escala con la longitud de de las ramificaciones en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferior el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas mediante el método de corrección de Poisson (Zuckerkanld y Pauling, 1965) y están en unidades sustitución nucleotídica/sitio. Las secuencias de ADN de referencia fueron obtenidas de GenBank con los números de acceso que se indican a la derecha del nombre de cada uno de los rizobios. Círculos negros (●) indican cepas caracterizadas en este trabajo, círculos blancos (○) cepas simbiosites de *D. virgatus* y *D. illinoensis* y círculo gris (◐) corresponde a la cepa inoculante CB3126 aislada de *L. leucocephala*.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la población de *D. paspalaceus* presente en la provincia de Santa Fe puede ser nodulada por rizobios y mesorizobios (ver Figura IV.8.). Cabe destacar que en ensayos de nodulación realizados en el laboratorio los mesorizobios 10L4.2 y 10L5.3, y el rizobio 10L11.4 no fueron capaces de nodular *L. leucocephala*, *P. vulgaris*, *Macroptilium lathyroides*, *Macroptilium erythroloma*, *Vicia sativa*, *Vicia villosa* ni *Medicago sativa*.

Tabla IV.2: Análisis de los grupos Tipo BOXA1R y géneros bacterianos de los aislamientos simbiotes de *D. paspalaceus* recuperados de Santa Fe.

| Aislamiento simbiote de <i>D. paspalaceus</i> | Tipo BOXA1R ^a | Género del aislamiento indicado ^b |
|---|--------------------------|--|
| 10C1.1 | A | <i>Mesorhizobium</i> sp. |
| 10L6.1 | A | <i>Mesorhizobium</i> sp. |
| 10L5.3 | B | <i>Mesorhizobium</i> sp. (*) |
| 10L1.8 | C | <i>Mesorhizobium</i> sp. |
| 10L10.4 | C | <i>Mesorhizobium</i> sp. |
| 10L10.7 | C | <i>Mesorhizobium</i> sp. |
| 10L14.3 | C | ND |
| 10L15.4 | C | <i>Mesorhizobium</i> sp. |
| 10C1.8 | C | <i>Mesorhizobium</i> sp. |
| 10L2.6 | D | <i>Mesorhizobium</i> sp. |
| 10L3.1 | E | <i>Mesorhizobium</i> sp. |
| 10L13.2 | F | <i>Rhizobium</i> sp. |
| 10L16.5 | F | <i>Rhizobium</i> sp. |
| 10L12.2 | F | <i>Rhizobium</i> sp. |
| 10L15.3 | G | <i>Rhizobium</i> sp. |
| 10L9.2 | H | <i>Mesorhizobium</i> sp. |
| 10L4.2 | H | <i>Mesorhizobium</i> sp. (*) |
| 10L11.4 | I | <i>Rhizobium</i> sp. (*) |
| 10L17.2 | J | <i>Rhizobium</i> sp. |
| 10L16.3 | K | <i>Rhizobium</i> sp. |

^a: tipos BOXA1R según las huellas genómicas mostradas en la Figura IV.3.

^b: Género del aislamiento deducido de las PCR 1 y PCR 2 utilizadas para amplificar una secuencia parcial del ADNr 16S desde los aislamientos tipo 10L4.2 y 10L5.3 (*Mesorhizobium* sp.) y 10L11.4 (*Rhizobium* sp.), respectivamente. Para los aislamientos tipo (*) un fragmento de 1440 pb de su ADNr 16S se amplificó por PCR con los cebadores fD1 y rD1 y fueron secuenciados *Mesorhizobium* (PCR-1-positivo), *Rhizobium* (PCR-2-positivo), ND: negativo para las PCR 1 y PCR 2.

Según se muestra en la Tabla IV.2. 60 % de los aislamientos noduladores de *D. paspalaceus* fueron mesorizobios incluyendo las cepas que pertenecían al grupo genómico "tipo C" BOXA1R más abundante.

Sobre la base de los resultados que indicaron que diversas especies de rizobios fueron capaces de nodular *Desmanthus*, investigamos los genotipos *nodC* de los aislamientos 10L4.2 y 10L5.3 como representantes de los mesorizobios locales de *D. paspalaceus*, y el genotipo *nodC* de la cepa CB3126 originalmente recuperada de nódulos de las raíces de *L. leucocephala* (Date, 1991) y genotificada en esta tesis como *S. teranga*. La Figura IV.9. muestra que el gen *nodC* de la cepa CB3126 *S. teranga* agrupó dentro de un clado *nodC* que incluye varios simbioses de *Phaseolus* (p. ej. *R. etli*, *R. giardinii*, *S. meliloti* bv. *mediterraneanse*) y *Mimosa* (p. ej. *Rhizobium* sp. TJ167 y TJ173). Por el contrario, el fragmento *nodC* de los mesorizobios 10L4.2 y 10L5.3 (el mismo fragmento de 848 pb en ambos aislamientos) no pudieron agruparse con ninguna de las variantes *nodC* de rizobios/brady-/azorizobios previamente reportados. Desafortunadamente, ninguno de los pares de cebadores reportados por Laguerre *et al.*, (2001) permitió amplificar el fragmento *nodC* de la cepa local 10L11.4 *Rhizobium* sp., lo cual sugiere que dicho aislamiento lleva posiblemente una variante alélica *nodC* diferente de las presentes en los simbioses mesorizobios y sinorizobios caracterizados en este trabajo. Los resultados obtenidos muestran que las plantas de *D. paspalaceus* fueron noduladas por diversos rizobios (distintos géneros), y que portan además genes *nodC* filogenéticamente diversos.

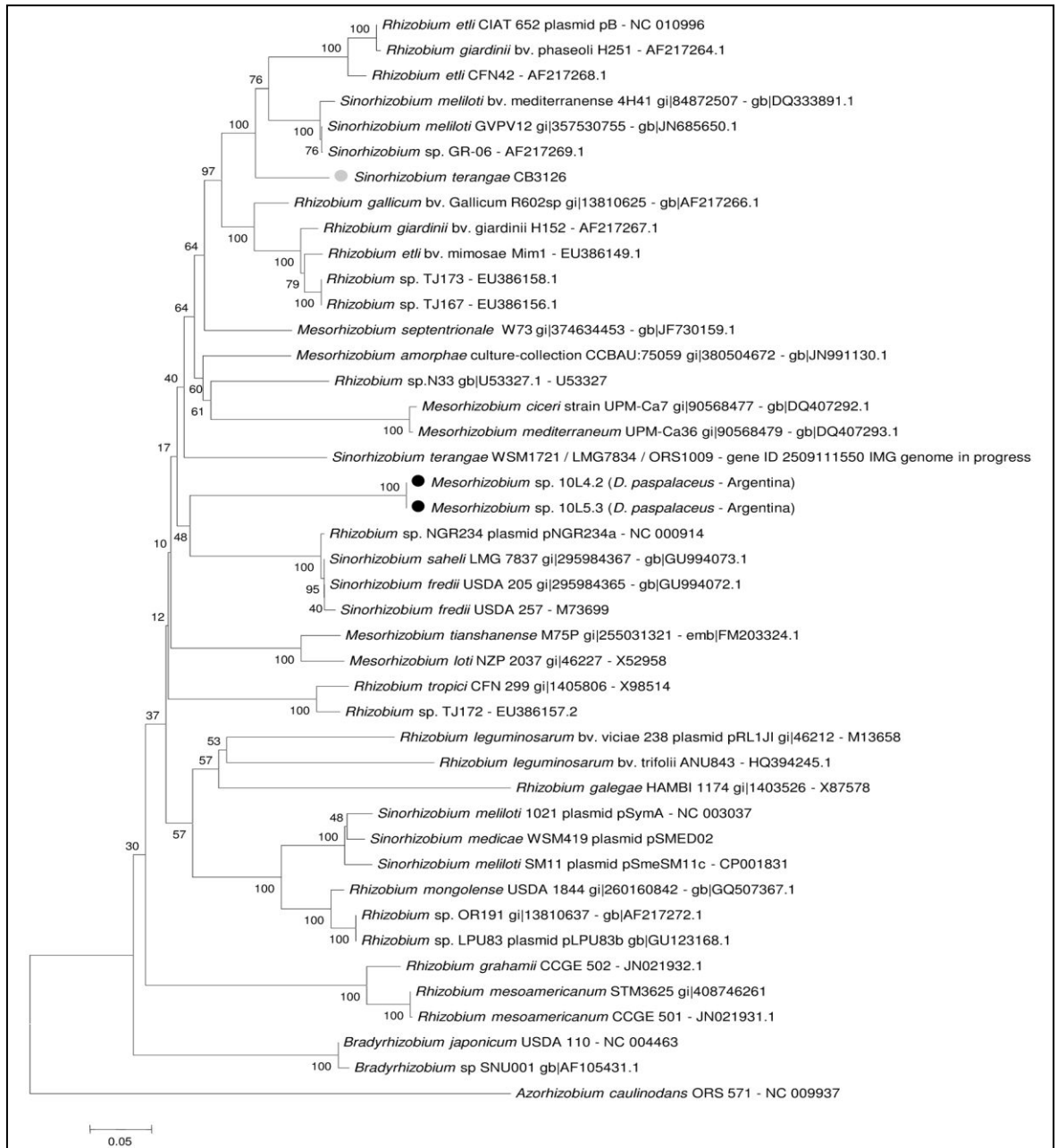


Figura IV.9: Relaciones filogenéticas (*neighbor-joining*) entre fragmentos de los genes *nodC* de diferentes rizobios incluyendo los simbiosites de *D. paspalaceus* presentes en suelos de General Obligado-Santa Fe. Las secuencias *nodC* fueron analizadas con el programa MEGA 5.05 (Clustal, *neighbor-joining method*). La filogenia fue reconstruida a partir de fragmentos *nodC* amplificados según Laguerre *et al.*, (2001). El árbol consenso corresponde a una inferencia realizada con un *bootstrap* de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). El porcentaje de replicas en los que los que cada taxa se agrupo de manera conjunta se muestra junto a cada punto de ramificación. El árbol está dibujado en escala con la longitud de de las ramificaciones en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferior el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron computadas mediante el método de corrección de Poisson (Zuckerandl y Pauling, 1965) y están en unidades sustitución nucleotídica/sitio. Las secuencias de ADN de referencia fueron obtenidas de GenBank con los números de acceso que se indican a la derecha del nombre de cada uno de los rizobios. Círculos negros (•) indican cepas caracterizadas en este trabajo y círculo gris (⊖) corresponde a la cepa inoculante CB3126 aislada de *L. leucocephala*.

IV.2.1.3.2. Análisis de las relaciones filogenéticas entre diferentes especies de rizobios incluyendo los simbioses de *D. paspalaceus*.

En el presente Capítulo se analizaron las características genotípicas de los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de diferentes sitios del centro y norte argentino. Los perfiles de amplificación de ADN genómico (*fingerprints*) evidenciaron una marcada diversidad genética entre los aislamientos analizados.

De acuerdo a datos de la literatura, Sinsuwongwat *et al.*, (2002) reportaron el aislamiento de cepas de *R. leguminosarum* de los nódulos de las raíces de *D. virgatus* en Tailandia. Posteriormente, un estudio realizado por Beyhaut *et al.* (2006b) demostró que los rizobios recuperados de los nódulos de *D. illinoensis* en EE.UU. e identificados a través del análisis de la secuencia del gen ADNr 16S, en la mayoría de los casos pertenecían a la especie *R. giardinii*, mientras que solo dos aislamientos fueron caracterizados como cercanos a *R. leguminosarum*, *R. etli* y *R. tropici*. Lamentablemente, no existen secuencias *nod* disponibles para ninguno de los aislamientos de *D. illinoensis*.

El análisis filogenético de los rizobios simbioses de *D. paspalaceus* presentes en suelos de Santa Fe realizado a partir de la secuenciación parcial del ADNr 16S, reveló la presencia de rizobios y mesorizobios. Según hemos mostrado en la sección anterior por análisis de ADNr 16S, los aislamientos 10L4.2 y 10L5.3 se agruparon cercanos a la cepa tipo de *M. plurifarum* LGM 11892 (GenBank NR_026426) conocida por nodular *Acacia* spp. y *L. leucocephala* (de Lajudie *et al.*, 1994; de Lajudie *et al.*, 1998b), mientras que el aislamiento 10L11.4 demostró estar relacionado con *R. alamii* GBV016T (aislado de la rizósfera de *Arabidopsis thaliana*) (Berge *et al.*, 2009), CCBAU15292 (aislado de *Albizia julibrissin*) (Wu *et al.*, 2011) y con *R. mesosinicum* CCBAU25010 (aislado de *Glycine max*) (Lin *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos y los datos de la literatura en conjunto indican que diferentes especies de *Desmanthus* pueden ser noduladas por cepas de:

a) *Rhizobium*: por ejemplo, *D. illinoensis* por *R. giardinii* y rizobios relacionados con *R. leguminosarum* (Beyhaut *et al.*, 2006b); *D. virgatus* por *R. leguminosarum* (Sinsuwongwat *et al.*, 2002); *D. paspalaceus* por los simbioses también del género *Rhizobium* pero relacionados con *R. alamii* y *R. mesosinicum* (este trabajo).

b) *Mesorhizobium*: como los aislamientos 10L4.2 y 10L5.3 de este trabajo, y dos cepas reportadas a GenBank por Beyhaut *et al.*, en el año 2011 (ver Figura IV.8).

c) *Sinorhizobium*, como se demostró a través de la tipificación del ADNr 16S de la cepa CB3126 infectiva en *D. virgatus* y originalmente aislada de *L. leucocephala* (Date, 1991).

Además de la diversidad de microsimbiontes que infectan *Desmanthus* spp., Beyhaut *et al.* (2006b) mostraron que las cepas de *R. giardinii* 56.6 y 35.1 recuperadas de *D. illinoensis* en los EE.UU. fueron incapaces de nodular *D. virgatus*. Sin embargo, dichas cepas pudieron establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno con leguminosas que pertenecen a otros géneros, tales como *L. leucocephala*, *Dalea purpurea*, *Psoralea esculenta*, y *Prosopis juliflora* (Beyhaut *et al.*, 2006b). Como ya hemos mostrado en la sección precedente, no tenemos evidencias que nuestros aislamientos sean capaces de nodular otras leguminosas. Aunque no hemos evaluado hasta el momento si nuestros aislamientos son capaces de nodular *D. Illinoensis*, las características simbióticas de nuestros rizobios y mesorizobios parecen claramente diferentes a las de los rizobios aislados en EE.UU. de esta última leguminosa.

Con el propósito de avanzar en la caracterización genotípica de nuestros rizobios asociadas a la simbiosis, analizamos el tipo de variantes *nodC* presentes en aislamientos representativos de los diferentes géneros encontrados. Los resultados presentados en la Figura VI. 9 muestran que el *nodC* de la cepa CB3126 de *S. teranga* forma parte de un clado que incluye varias secuencias *nodC* de rizobios que nodulan *Phaseolus*, una observación consistente con la evidencia previa de que otros *Desmanthus* fueron nodulados por *R. giardinii* (Beyhaut *et al.*, 2006b), una especie también infectiva en *Phaseolus* (Amarger *et al.*, 1997). Desafortunadamente, no se hallaron disponibles las secuencias *nodC* de los aislamientos de *R. giardinii* recuperados de *D. illinoensis* por Beyhaut *et al.*, (2006b) con el fin de evaluar dichos genes en comparación con el tipo de genes *nodC* presentes en la cepa CB3126 de *S. teranga*.

Es particularmente interesante que el gen *nodC* de la cepa CB3126 de *S. teranga* que indujo la formación de nódulos en *D. paspalaceus* no se halló relacionado con el *nodC* de la cepa *S. teranga* WSM1721 (sinónimos LMG 7834, ORS1009) originalmente aislada de *A. laeta* (de Lajudie *et al.*, 1994). La secuenciación de las variantes *nodC* presentes en

cepas como *R. giardinii* 56.6 y 35.1 que nodularon *D. illinoensis* y otras leguminosas pero no *D. virgatus* (Beyhaut *et al.*, 2006b); serviría para evaluar si los mismos son similares o diferentes a los alelos *nodC* de las cepas locales 10L4.2 y 10L5.3 caracterizadas *Mesorhizobium* sp. simbioses de *D. paspalaceus* y de rango simbiótico menos extendido y de la cepa CB3126 de *S. terengae*. Una variante alélica diferente que deberá ser motivo de análisis posterior es la del gen *nodC* de la cepa 10L11.4 *Rhizobium* sp que no pudo ser amplificado con los cebadores de PCR propuestos por Laguerre *et al.*, (2001).

Finalmente, una cuestión interesante fue la observación de variantes *nodC* en los aislamientos *Mesorhizobium* sp. 10L4.2 y 10L5.3 que no exhibieron relación preferencial con ninguna de las variantes *nodC* descritas previamente. Al considerar que las filogenias de los genes *nod* de los rizobios se correlacionan con las especies de las leguminosas huéspedes (Rogel *et al.*, 2011), la distancia filogenética observada entre las variantes *nodC* presentes en la cepa *S. terengae* CB3126 y la de los aislamientos *Mesorhizobium* sp 10L4.2 y 10L5.3 (ver Figura IV.9) resultó llamativa. Las variantes de alelos *nodC* aquí presentadas para simbioses de una misma especie de *Desmanthus* (variantes que posiblemente se extienden a otros genes del cluster *nod* que aun no hemos caracterizado), plantean la cuestión respecto de si dichos simbioses con genes de nodulación diferentes producen una misma familia de moléculas señal, o alternativamente, familias distintas de factores de nodulación pero todas simbióticamente activas sobre *Desmanthus*.

IV.3. Conclusiones.

Los resultados obtenidos en el presente capítulo muestran por primera vez para suelos de Argentina las características de diversidad genotípica de los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* y la posición filogenética de los simbioses de *D. paspalaceus*.

El análisis del germoplasma asociado al complejo *D. virgatus* evidenció una marcada diversidad en los simbioses, con variaciones que dependieron del sitio de origen. La

diversidad genética observada permitirá explorar dentro de la misma diferentes características simbióticas y de adaptabilidad a ambientes específicos.

En particular, el análisis filogenético de los rizobios simbioses de *D. paspalaceus* recuperados de suelos de la localidad de General Obligado, provincia de Santa Fe, reveló la presencia de rizobios y mesorizobios.

Las evidencias disponibles permitirán escoger aislamientos representativos de la diversidad local colectada hacia su caracterización simbiótica en el laboratorio y como inoculantes a campo.

Capítulo V

Características simbióticas de los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos del centro y norte de la República Argentina.

V.1. Introducción

La simbiosis rizobios noduladores-complejo *D. virgatus* en suelos argentinos. Caracterización simbiótica y selección de cepas inoculantes.

En las últimas décadas, numerosas especies del género *Desmanthus* han demostrado presentar un importante potencial como leguminosas forrajeras en la alimentación del ganado (Gardiner *et al.*, 2004; Fischbach *et al.*, 2005; Rangel y Gomide, 2005). Sobre la base de estas investigaciones, se han liberado varios cultivares forrajeros de distintas especies de *Desmanthus* en Australia (Jones y Clem, 1997; Gardiner *et al.*, 2013), en Texas (Muncrief y Heizer, 1985) y zonas templadas de EE.UU. (Ocumpaugh *et al.*, 2004b), como así también en el sureste de Asia (Horne y Stür, 1999), (ver detalles de especies y cultivares en sección 2.1. de Introducción General).

A pesar de los antecedentes mencionados, en Argentina son escasos los estudios sobre el potencial forrajero del género *Desmanthus* (Hack *et al.*, 2005; Zabala *et al.*, 2008). En particular, *D. virgatus (sensu lato)* es un complejo en el que actualmente se reconocen cuatro especies nativas del centro-norte argentino: *D. acuminatus* Benth., *D. paspalaceus* (Lindm.) Burkart, *D. virgatus* y *D. tatuhyensis* Hoehne (Luckow, 1993; Zuloaga y Morrone, 1999). Según se ha descrito en la introducción de esta tesis, las tres primeras especies son las de mayor potencial forrajero. Recientemente, Zabala *et al.* (2008) han informado la colección y evaluación agronómica de distintas accesiones del complejo *D. virgatus*. Cabe destacar que, una referencia del importante valor del germoplasma local es que varios accesos de *D. virgatus*, *D. paspalaceus*, y *D. acuminatus* han sido evaluados en otros países, incluyendo el material vegetal a partir del cual se desarrolló el cultivar Marc originalmente colectado en Argentina (Jones y Clem, 1997).

La reconocida capacidad de las especies de *D. virgatus (sensu lato)* para adaptarse a nuestras condiciones edafoclimáticas y su importante potencial forrajero señalan a los miembros de este complejo de leguminosas como una alternativa prometedora para la alimentación animal en las regiones del centro y norte de Argentina. En este contexto, se ha planteado la necesidad de investigar la naturaleza y características de la simbiosis

rizobios-complejo *D. virgatus* procedentes de distintos sitios de nuestro país en los cuales habitan naturalmente estos macro y microsimbiontes.

De acuerdo a datos de la literatura, en evaluaciones de eficiencia simbiótica bajo condiciones de crecimiento controlado y a campo realizadas en Australia, las plantas de *D. virgatus* respondieron diferencialmente a la inoculación con aislamientos obtenidos de *L. leucocephala*, dependiendo del sitio de origen y de la presencia de rizobios en los suelos (Date, 1991; Bahnisch *et al.*, 1998; Brandon *et al.*, 1998). Por otro lado, Tang *et al.* (1994) demostraron la ausencia de nódulos en las raíces de *D. virgatus* cultivadas en un suelo ferralítico de Cuba y sugirieron la necesidad de realizar futuros estudios de selección de rizobios capaces de fijar eficientemente el nitrógeno. Cabe destacar que, según Jones y Clem (1997) se conoce muy poco sobre la habilidad de *D. virgatus* para formar nódulos efectivos con cepas autóctonas.

Sobre la base de los resultados mencionados, la obtención de aislamientos de rizobios eficientes y adaptados a las condiciones edafoclimáticas de nuestro país constituye una opción interesante para el mejoramiento e implantación de pasturas forrajeras de *D. virgatus*. Además, parecería razonable suponer que los rizobios presentes en los suelos argentinos, como los que se han aislado en esta investigación, serían portadores de germoplasma valioso para la adaptación y simbiosis de la bacteria en condiciones locales. De ese modo, en la búsqueda de dicho germoplasma se ha construido la colección de aislamientos noduladores presentada en el capítulo II de este trabajo. Los resultados obtenidos de los análisis sobre las características fenotípicas y de tolerancia a diferentes situaciones de estreses abióticos (ver Capítulo III) permitieron distinguir cepas con capacidad de crecimiento en condiciones que se consideran adversas y que sugieren una mayor flexibilidad fisiológica y capacidad de adaptación a las condiciones ambientales. Asimismo, se ha investigado la diversidad genotípica de aislamientos simbiontes originarios de diferentes regiones geográficas (ver Capítulo IV). Será deseable entonces seleccionar cepas que, además de presentar características fenogenotípicas de relevancia, también manifiesten una destacada eficiencia para la FBN y al mismo tiempo sean competitivas para la nodulación de las plantas de *D. virgatus*.

La selección de rizobios infectivos y efectivos consta de diferentes etapas. La primera se realiza en cámaras de crecimiento de cultivo mediante condiciones ambientales

controladas y permite elegir las cepas que presenten mayor capacidad potencial de FBN. La segunda etapa de selección es la de campo, que permitirá probar el comportamiento y adaptación al medio ambiente real de las cepas destacadas en la etapa anterior.

El objetivo del presente capítulo fue caracterizar y comparar los comportamientos simbióticos de cepas representativas de la colección de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos argentinos.

En una primera instancia se presenta un conjunto de ensayos de estimación de la fijación biológica de nitrógeno de aislamientos de rizobios representativos con distintas poblaciones del complejo *D. virgatus* en condiciones de crecimiento controlado. Posteriormente, se describen los resultados de la evaluación de competitividad para la nodulación de las cepas que mostraron una alta eficiencia para la FBN en simbiosis con plantas del complejo *D. virgatus*.

V.2. Resultados y discusión.

V.2.1. Eficiencia simbiótica de los aislamientos de rizobios en cámaras de crecimiento de cultivo.

En los ensayos que se presentan en esta sección, se ha comparado la eficiencia para la FBN de aislamientos representativos de las poblaciones de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos argentinos. En la literatura existe información muy abundante sobre distintas metodologías para estimar la FBN que van desde medidas de reducción del acetileno en ensayos de laboratorio hasta el empleo del isótopo ^{15}N en condiciones de campo. Para la comparación de cepas en ensayos de laboratorio una de las metodologías más utilizadas para estimar la FBN ha sido la comparación del peso seco de plantas inoculadas vs. plantas control no inoculadas (crecidas en un medio mineral con y sin nitrógeno). Esta metodología es la que se ha utilizado en los ensayos de estimación de FBN realizados en este trabajo.

En una etapa inicial de las evaluaciones, aislamientos representativos de las distintas poblaciones del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos del centro y norte de Argentina se inocularon en plántulas de las respectivas poblaciones de las cuales fueron originalmente aislados. En todos los ensayos de estimación de FBN se incluyeron plantas de cada población con nitrógeno y sin inocular (controles), permaneciendo en condiciones de crecimiento controlado durante 80 días, según se describe en la sección 9.1. de Materiales y Métodos. En tales condiciones, las plántulas provenientes de diferentes sitios geográficos presentaron un desarrollo vegetativo poco vigoroso, con la aparición de hojas jóvenes de color amarillo a verde pálido que al transcurrir el tiempo se tornaban uniformemente amarillas, manifestando síntomas de clorosis notorios, caída de hojas y senescencia de las plantas. En todos los casos se repitieron los ensayos de laboratorio y los resultados obtenidos evidenciaron muy bajas tasas de sobrevivencia de las plantas. Dicha dificultad puede atribuirse a una o varias causas que serán descriptas y analizadas a continuación.

En primer lugar, existe una importante variabilidad genética en las especies del género *Desmanthus*, dado que se trata de semillas de leguminosas que presentan un reducido período de domesticación y aún no han sido seleccionadas genéticamente. Las semillas utilizadas en los ensayos de eficiencia simbiótica fueron cosechadas manualmente durante el período de maduración fisiológica de las diferentes poblaciones del complejo *D. virgatus* mantenidas en cultivo (ver sección 4.1. de Materiales y Métodos). Una vez obtenidas las semillas, se realizó una selección de acuerdo con la uniformidad de tamaño y características externas, con el propósito de descartar aquellas que presentaban alteraciones y/o malformaciones. Posteriormente, la característica de dormancia exógena por impermeabilidad de las cubiertas seminales al agua fue reducida a través de tratamientos pregerminativos con agua hirviendo. El análisis del poder germinativo (PG) de las semillas de las distintas poblaciones del complejo utilizadas en los ensayos mostró valores superiores a 70 %. A pesar que estos valores se consideraron aceptables, se observaron semillas que presentaban coloraciones desde verdes con diferentes matices hasta marrones con tonalidades claras y oscuras, evidenciando diferentes grados de maduración.

Por otro lado, las leguminosas forrajeras perennes presentan un crecimiento inicial lento dando lugar a que el establecimiento de las plántulas sea una etapa crucial para lograr una implantación exitosa. A su vez, el tamaño pequeño de las semillas perennes como las del complejo *D. virgatus* dificulta aún más el establecimiento de las plantas debido a sus reservas seminales escasas.

Cabe mencionar que, el escaso desarrollo vegetativo y los síntomas de clorosis y senescencia observados en las plántulas de las diferentes poblaciones del complejo *D. virgatus* pueden atribuirse a un requerimiento nutricional aún no investigado.

V.2.1.1. Estimación de la fijación biológica de nitrógeno de los rizobios en simbiosis con el complejo *D. virgatus*.

Sobre la base de las consideraciones expuestas en la sección precedente, se realizaron ensayos de estimación de la FBN con el propósito de evaluar los comportamientos simbióticos de rizobios representativos de distintas poblaciones del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos de tres provincias fitogeográficas. Los ensayos de estimación de las asociaciones rizobio-complejo *D. virgatus* realizados en cámara de crecimiento de cultivo correspondieron a las localidades de General Obligado (Santa Fe), Ledesma (Jujuy) y Santo Tomé (Corrientes), pertenecientes a las provincias fitogeográficas Chaqueña, de las Yungas y Paranaense respectivamente.

Los aislamientos de rizobios analizados en los ensayos de estimación de la FBN se seleccionaron en función de sus características fenotípicas, tolerancia a distintos estreses abióticos y diversidad genotípica. De acuerdo a las condiciones edafoclimáticas de las zonas de implantación de las especies de *Desmanthus*, una alternativa fue priorizar la selección de cepas nativas adaptadas a altas temperaturas con el objetivo de minimizar los efectos adversos de este parámetro sobre la nodulación y FBN.

V.2.1.1.1. Estimación de la FBN de los rizobios simbiotes de *D. paspalaceus* recuperados de suelos de la provincia de Santa Fe.

La evaluación de la eficiencia simbiótica de los rizobios noduladores de *D. paspalaceus* presentes en suelos de la localidad de General Obligado, Santa Fe (provincia fitogeográfica Chaqueña) se realizó a través de la cuantificación del número de nódulos formados y de la determinación de la biomasa vegetal. Los aislamientos se seleccionaron de una colección de veinte cepas que mostraron una marcada diversidad fenotípica y genotípica, utilizando como criterio de elección aquellos aislamientos que presentaron características diferenciales de tolerancia a factores abióticos (temperaturas de 40°C, pH 4 y 1 % p/v NaCl) y una destacada diversidad genotípica (ver Tabla III.4., sección 2.4.2. del Capítulo III y Figura IV.3., sección 2.1.2.1. del Capítulo IV).

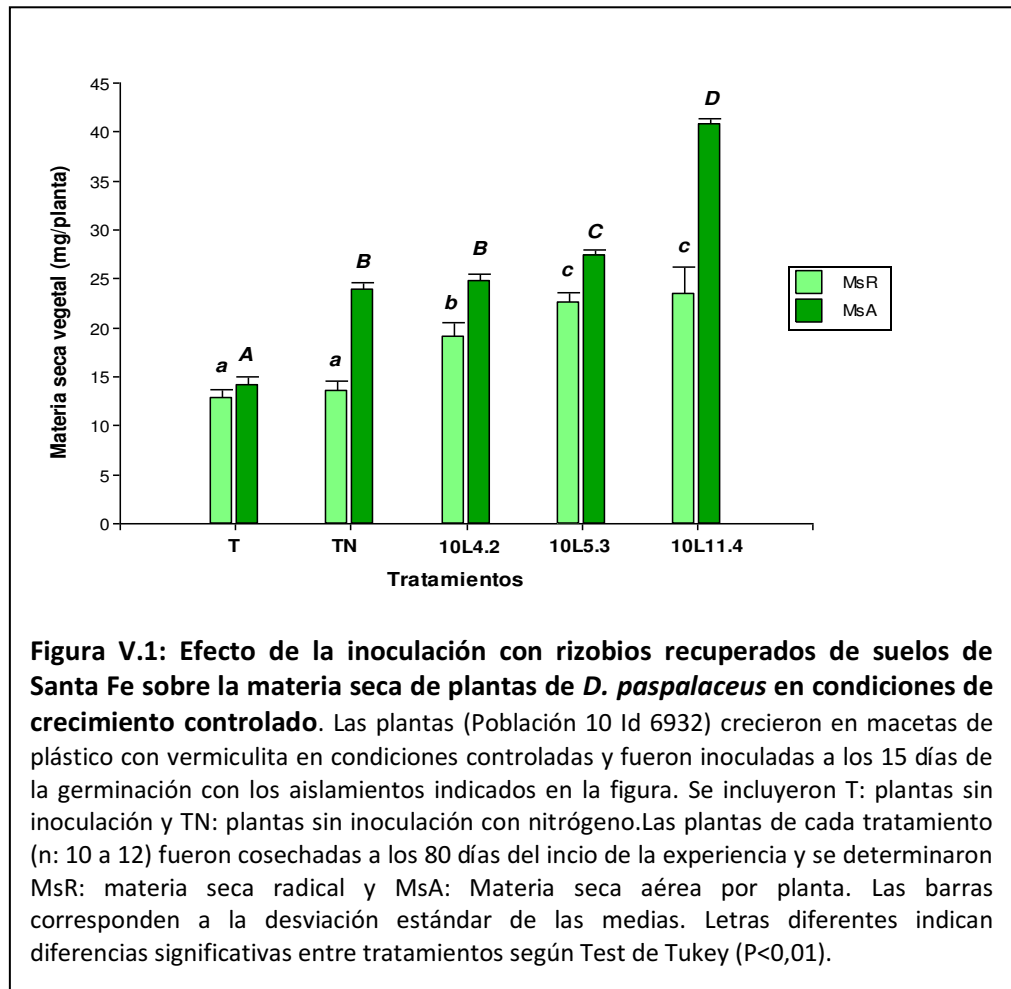
Las plantas de *D. paspalaceus* inoculadas con las cepas seleccionadas 10L4.2, 10L5.3 y 10L11.4 a los 80 días de crecimiento en cámaras de cultivo formaron 8, 10 y 16 nódulos promedio por planta respectivamente, mostrando diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, según el test de Tukey ($P < 0,01$).

En la Figura V.1. se observa el efecto de la inoculación con los aislamientos de rizobios seleccionados sobre la biomasa vegetal de *D. paspalaceus*. El peso seco radical y aéreo de las plántulas fue superior en todos los pares simbióticos respecto al control sin inocular, evidenciando la ausencia de asociaciones de tipo parasitarias o simbióticas poco eficientes.

El valor promedio de la biomasa aérea de las plantas inoculadas con el aislamiento 10L4.2 fue similar al de las plantas sin inocular con el agregado de nitrógeno. A su vez la cepa de rizobio 10L11.4 fue notoriamente más eficiente que los otros aislamientos seleccionados en producción de biomasa vegetal aérea, generando un incremento de materia seca de 70 % y 190 % comparado con los tratamientos fertilizado con nitrógeno y testigo respectivamente.

El peso seco de la parte aérea de las plantas correlacionó positivamente con el número de nódulos inducidos por cada aislamiento de rizobio (datos no mostrados), sugiriendo que la mayor biomasa vegetal observada en las plantas inoculadas con la cepa

10L11.4 sería atribuible no sólo a una mejor capacidad de fijación de nitrógeno sino también a una mayor capacidad de nodulación.



Los valores de materia seca radical de los tratamientos inoculados presentaron diferencias significativas respecto de aquellos sin inoculación. El peso promedio de las raíces de las plantas inoculadas con los aislamientos 10L5.3 y 10L11.4 fue 22,6 y 23,5 mg/pl respectivamente, mostrando valores superiores a los restantes tratamientos, sucedidos por un peso de 19,1 mg/pl obtenido con la inoculación de la cepa 10L4.2. La estimación de la eficiencia simbiótica de los rizobios recuperados de suelos de Santa Fe evidenció un efecto favorable de la inoculación sobre el crecimiento de las raíces, lo cual sugiere que las cepas nativas podrían producir sustancias que estimularían el desarrollo radicular de *D. paspalaceus*.

El rendimiento de materia seca total de las plantas inoculadas con la cepa 10L11.4 presentó un valor de 64,1 mg/pl, seguido por los tratamientos 10L5.3 y 10L4.2 con

promedios de 49,9 y 43,9 mg/pl respectivamente. A su vez, la biomasa de las plantas testigo y fertilizadas con N mostraron promedios de 26,9 y 37,6 mg/pl. Cabe destacar que, los tratamientos presentaron valores de biomasa vegetal total que mostraron diferencias estadísticas significativas entre ellos.

Con respecto a las proporciones de materia seca aérea y radical en relación a la biomasa total, las plantas inoculadas con la cepa 10L11.4 y las fertilizadas con N mostraron una biomasa aérea que representó el 63 % y 64 % de la materia seca total. De ese modo, el mayor porcentaje de biomasa aérea evidenció que la planta favoreció en una mayor proporción la translocación de fotosintatos hacia la formación de nuevas hojas. En los tratamientos testigo e inoculados con los aislamientos 10L5.3 y 10L4.2 la biomasa aérea representó el 52 % a 57 % de la materia seca total, mostrando una tendencia hacia el equilibrio entre la parte aérea y radical de las plantas.

V.2.1.1.2. Estimación de la FBN de los rizobios noduladores de *D. virgatus* (sensu estricto) presentes en suelos de la provincia de Jujuy.

La evaluación de la inoculación con rizobios presentes en suelos de la localidad de Ledesma, Jujuy (provincia fitogeográfica de las Yungas) sobre la biomasa vegetal de *D. virgatus* (sensu estricto) se presenta en la Figura V.2. Los aislamientos inoculados a las plántulas se seleccionaron de una colección de cepas de rizobios en función de las características fenotípicas, tolerancia a estreses abióticos (con prioridad en el factor alta temperatura) y perfiles de amplificación de ADN genómico (ver más adelante Tabla V.1. del presente capítulo y Figura IV.4., sección 2.1.2.1. del Capítulo IV).

Las plantas de *D. virgatus* inoculadas con los aislamientos seleccionados 8L12.3, 8L10.1 y 8L12.1 formaron 6, 13 y 14 nódulos promedio por planta respectivamente (datos no mostrados), presentando diferencias significativas entre el tratamiento inoculado con la cepa 8L12.3 y los restantes tratamientos, según el test de Tukey ($P < 0,01$).

La materia seca aérea de las plantas inoculadas con la cepa nativa 8L12.1, determinada a los 80 días de crecimiento en condiciones controladas, fue significativamente superior a la obtenida con la inoculación de los rizobios 8L10.1 y

8L12.3. Las plantas testigos y las inoculadas con el aislamiento 8L12.3 mostraron los menores valores de biomasa seca vegetal.

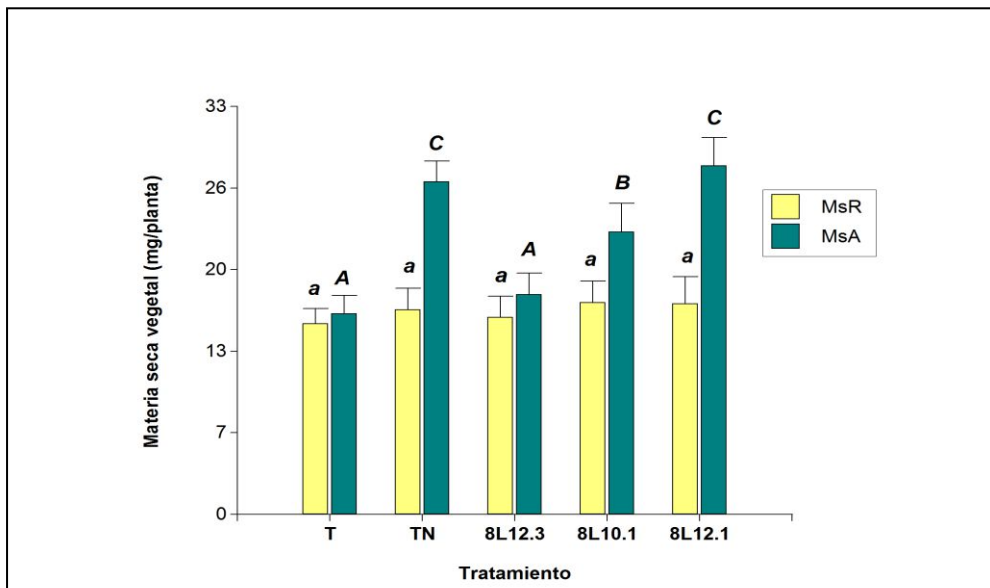


Figura V.2: Efecto de la inoculación con rizobios presentes en suelos de Jujuy sobre la materia seca vegetal de *D. virgatus* en condiciones de crecimiento controlado. Las plantas de *D. virgatus* (Población 8 Id 7059) crecieron en macetas con vermiculita y fueron inoculadas a los 15 días de la germinación con los aislamientos indicados en la figura. Se incluyeron T: plantas sin inoculación y TN: plantas sin inoculación con nitrógeno. Las plantas de cada tratamiento (n:10 a 12) fueron cosechadas a los 80 días del inicio de la experiencia y se determinaron MsR: materia seca radical por planta y MsA: Materia seca aérea por planta. Las barras corresponden a la desviación estándar de las medias. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según Test de Tukey ($P < 0,01$).

Los valores de materia seca radical de los diferentes tratamientos evaluados en este ensayo fueron similares, sin mostrar diferencias significativas entre ellos.

Las plantas inoculadas con los rizobios 8L10.1 y 8L12.1, y las fertilizadas con N mostraron una biomasa aérea que representó entre 57 % y 62 % de la materia seca total, mientras que las plantas testigo y las inoculadas con la cepa 8L12.3 mostraron una tendencia al equilibrio entre el peso de las raíces y el peso de tallos y hojas.

Los resultados obtenidos en el ensayo de estimación de FBN presentado en esta sección demostraron que la inoculación de *D. virgatus* con las cepas de rizobios 8L12.1 y 8L10.1 produjeron incrementos de biomasa aérea vegetal de 73 % y 40 % respectivamente, en comparación con las plantas testigos.

Tabla V.1: Crecimiento de rizobios noduladores de *D. virgatus* de la provincia de Jujuy (población 8) evaluados bajo diferentes condiciones de estreses abióticos en medio LMA.

| Cepas ^a | Crecimiento a la temperatura indicada (°C) | | | | Crecimiento al nivel de pH indicado | | | | | | Crecimiento a la concentración de NaCl (% p/v) indicada | | | | |
|--------------------|--|-----|-----|-----|-------------------------------------|---|---|---|---|---|---|------|----|----|----|
| | 28° | 35° | 40° | 45° | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0.01% | 0.5% | 1% | 2% | 3% |
| 8L2.2 | 5 | 5 | 1 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 4 | 3 | 5 | 5 | 4 | 2 | 0 |
| 8L4.2 | 5 | 5 | 1 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 4 | 3 | 5 | 5 | 4 | 3 | 0 |
| 8L4.5 | 5 | 5 | 1 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 4 | 3 | 5 | 5 | 4 | 3 | 0 |
| 8L4.9 | 5 | 5 | 1 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 4 | 3 | 5 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| 8L6.3 | 5 | 5 | 1 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 4 | 3 | 5 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| 8L10.1 | 5 | 5 | 2 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| 8L11.1 | 5 | 5 | 2 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| 8L12.1 | 5 | 5 | 5 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| 8L12.2 | 5 | 5 | 2 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| 8L12.3 | 5 | 5 | 5 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| 8L12.4 | 5 | 4 | 3 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 3 | 1 | 0 |
| 8L13.1 | 5 | 5 | 3 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| 8L13.3 | 5 | 5 | 2 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| 8L14.1 | 5 | 5 | 4 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| 8L14.2 | 5 | 4 | 2 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 3 | 2 | 0 |
| 8L15.1 | 5 | 4 | 2 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| 8L15.2 | 5 | 5 | 1 | 0 | 1 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| <i>Sme</i> 2011 | 5 | 5 | 3 | 0 | 0 | 2 | 5 | 5 | 5 | 4 | 2 | 5 | 4 | 3 | 2 |
| <i>Sfr</i> 205 | 5 | 5 | 0 | 0 | 1 | 3 | 5 | 5 | 5 | 4 | 0 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| <i>Rsp</i> LPU83 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 | 5 | 5 | 3 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Rha</i> I66 | 5 | 5 | 0 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 5 | 5 | 4 | 0 |
| <i>Rtr</i> 899 | 5 | 5 | 1 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 0 | 5 | 5 | 4 | 3 |
| <i>Rsp</i> CB3126 | 5 | 5 | 4 | 0 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 4 | 2 | 1 | 0 |

Escala de graduación: desde 5 (coloración oscura) hasta 0 (sin coloración) indican la capacidad de los rizobios para crecer bajo la condición investigada. a: *Sme*, *Sinorhizobium meliloti*; *Sfr*, *S. fredii*; *Rsp*, *Rhizobium* sp.; *Rha*, *R. hainanense*; *Rtr*, *R. tropici*.

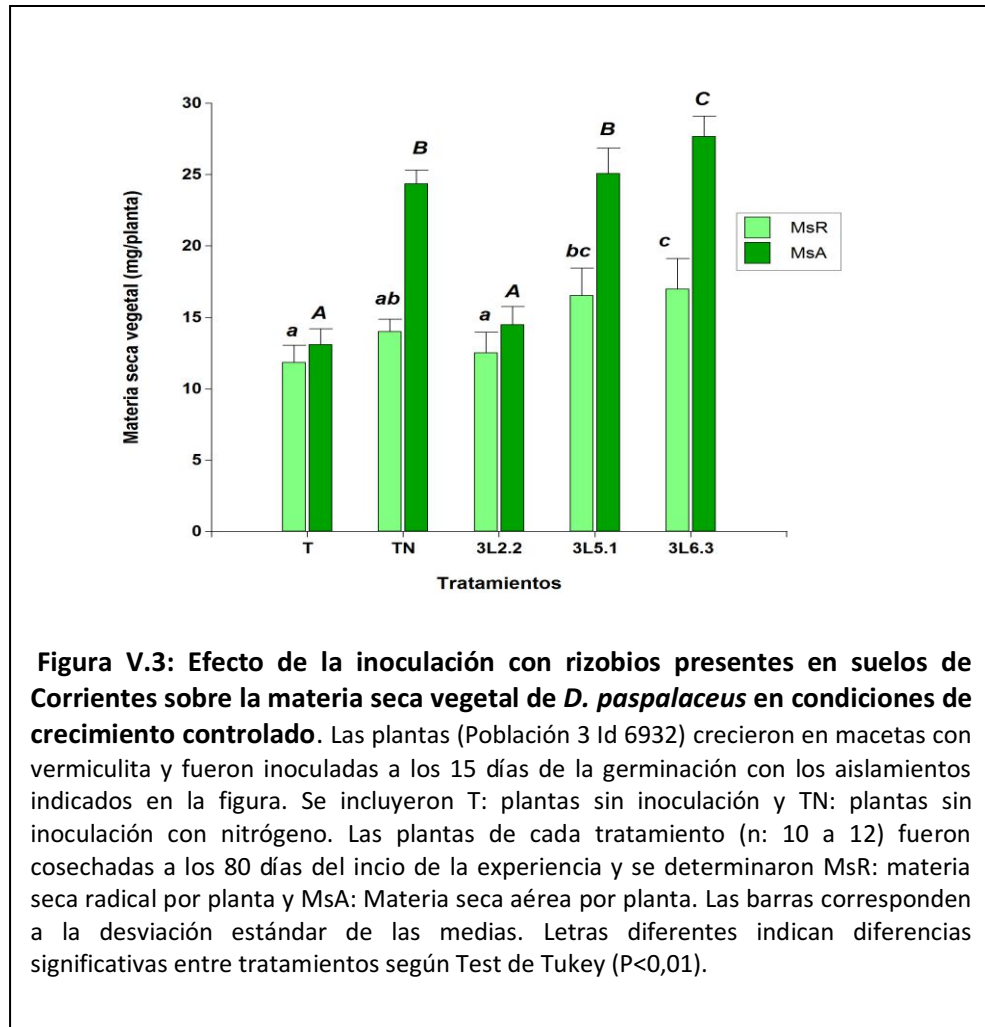
V.2.1.1.3. Estimación de la FBN de los aislamientos simbiotes de *D. paspalaceus* recuperados en suelos de la provincia de Corrientes.

El efecto de la inoculación con los aislamientos de rizobios 3L2.2, 3L5.1 y 3L6.3 presentes en los suelos de Corrientes (provincia fitogeográfica Paranaense) sobre la biomasa radical y aérea de las plantas de *D. paspalaceus* se muestra en la Figura V.3. Los aislamientos se seleccionaron de una colección de rizobios simbiotes de *D. paspalaceus* (población 3) que presentaron características fenotípicas y tolerancia a factores abióticos muy homogéneas, pero una marcada diversidad genotípica (ver Tabla V.2. del presente capítulo y Figura IV.6., sección 2.1.2.1. del Capítulo IV).

Las plantas inoculadas con las cepas seleccionadas recuperadas de los suelos lateríticos de la localidad de Santo Tomé, Corrientes, presentaron 6 a 7 nódulos promedio por planta (datos no mostrados). Sin embargo, la materia seca total de las plántulas inoculadas con la cepa nativa 3L6.3, determinada a los 80 días de crecimiento en condiciones controladas, fue significativamente superior a la obtenida en los restantes tratamientos. Las plantas testigos y las inoculadas con el aislamiento 3L2.2 mostraron los menores valores de biomasa seca vegetal, sin presentar diferencias entre ellas.

Los valores promedios de peso seco aéreo de los tratamientos inoculados presentaron diferencias significativas respecto al testigo, a excepción del tratamiento inoculado con la cepa 3L2.2. Las plantas inoculadas con el aislamiento 3L6.3 mostraron un peso aéreo de 27,66 mg/pl, significativamente superior a los tratamientos inoculados y control evaluados en esta experiencia. Asimismo, la biomasa aérea del tratamiento inoculado con la cepa 3L5.1 resultó similar a la de las plantas fertilizadas con nitrógeno.

Los resultados obtenidos demostraron que la inoculación de *D. paspalaceus* con la cepa 3L6.3 produjo un incremento de biomasa aérea vegetal de 111 %, comparado con las plantas testigos. A su vez la inoculación con la cepa 3L5.1 originó un aumento de materia seca de la parte aérea de 91 %, mientras que la 3L2.2 generó solamente un incremento de 10 % en promedio. Estas observaciones presentan a la cepa de rizobio 3L2.2 como ineficiente para la FBN. Los valores de materia seca radical de los tratamientos inoculados con las cepas 3L6.3 y 3L5.1 fueron 40 a 42 % superiores al valor de peso seco de las raíces de las plantas sin inoculación.



En relación a los porcentajes de materia seca radical y aérea se observó que en las plantas inoculadas con los aislamientos 3L6.3 y 3L5.1 la biomasa aérea representó el 57 a 58 % de la materia seca total. El tratamiento fertilizado con N mostró mayor amplitud entre los valores promedios de biomasa radical y aérea, similar a lo ocurrido en los ensayos de estimación de FBN presentados en las secciones anteriores. A su vez, las proporciones de materia seca vegetal de las plantas testigo y las inoculadas con el aislamiento 3L2.2 mostraron una tendencia hacia el equilibrio entre la parte radical y aérea.

Tabla V.2.: Crecimiento de rizobios noduladores de *D. paspalaceus* de la provincia de Corrientes (población 3) evaluados bajo condiciones de estreses abióticos en medio LMA.

| Cepas ^a | Crecimiento a la temperatura indicada (°C) | | | | Crecimiento al nivel de pH indicado | | | | | | Crecimiento a la concentración de NaCl (% p/v) indicada | | | | |
|--------------------|--|-----|-----|-----|-------------------------------------|---|---|---|---|---|---|------|----|----|----|
| | 28° | 35° | 40° | 45° | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 0.01% | 0.5% | 1% | 2% | 3% |
| 3L1.1 | 5 | 4 | 1 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3L1.2 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3L2.1 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3L2.2 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3L3.2 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3L3.3 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3L5.1 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3L5.2 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3L5.4 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3L6.1 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3L6.3 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3L8.2 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3L8.3 | 5 | 4 | 2 | 0 | 3 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 4 | 2 | 1 |
| 3L9.1 | 5 | 5 | 3 | 0 | 2 | 5 | 5 | 5 | 5 | 3 | 5 | 5 | 4 | 2 | 1 |
| 3L9.2 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3L9.3 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| 3L10.1 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 1 | 1 |
| 3L10.2 | 5 | 4 | 2 | 0 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 2 | 1 |
| 3L10.5 | 5 | 4 | 2 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 1 |
| <i>Sme</i> 2011 | 5 | 5 | 3 | 0 | 0 | 2 | 5 | 5 | 5 | 4 | 2 | 5 | 4 | 3 | 2 |
| <i>Sfr</i> 205 | 5 | 5 | 0 | 0 | 1 | 3 | 5 | 5 | 5 | 4 | 0 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| <i>Rsp</i> LPU83 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 | 5 | 5 | 3 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Rha</i> I66 | 5 | 5 | 0 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 5 | 5 | 4 | 0 |
| <i>Rtr</i> 899 | 5 | 5 | 1 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 0 | 5 | 5 | 4 | 3 |
| <i>Rsp</i> CB3126 | 5 | 5 | 4 | 0 | 0 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 1 | 4 | 2 | 1 | 0 |

Escala de graduación: desde 5 (coloración oscura) hasta 0 (sin coloración) indican la capacidad de los rizobios para crecer bajo la condición investigada

a: *Sme*, *Sinorhizobium meliloti*; *Sfr*, *S. fredii*; *Rsp.*, *Rhizobium* sp.; *Rha*, *R. hainanense*; *Rtr*, *R. tropici*.

V.2.1.2. Evaluación de la capacidad simbiótica de los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*.

Los ensayos de estimación de FBN que se han presentado en las secciones precedentes revelaron un amplio rango de variación en la producción de biomasa vegetal, lo cual indica la diferencia en el potencial de fijación de nitrógeno que poseen las cepas de rizobios en simbiosis con el complejo *D. virgatus*. Con el propósito de poder visualizar mejor las posibles diferencias entre las cepas se calculó la capacidad simbiótica (Cs) de cada rizobio (ver sección 9.2. de Materiales y Métodos). La evaluación de la capacidad simbiótica de los aislamientos de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos de las provincias de Corrientes, Jujuy y Santa Fe se presenta en la Tabla V.3.

Tabla V.3: Evaluación de la capacidad simbiótica de los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*, discriminados según su sitio de origen y población de planta hospedadora.

| Sitio y población de plantas del complejo <i>D. virgatus</i> de donde fueron aislados los rizobios analizados | Cepa de rizobio | Capacidad ^{1,2} simbiótica (Cs) |
|---|-----------------|--|
| Corrientes - Población 3 - <i>D. paspalaceus</i> | 3L2.2 | 0,16 e- |
| | 3L5.1 | 1,06 E |
| | 3L6.3 | 1,29 E |
| Jujuy - Población 8 - <i>D. virgatus</i> (sensu estricto) | 8L10.1 | 0,62 e |
| | 8L12.1 | 1,12 E |
| | 8L12.3 | 0,14 e- |
| Santa Fe - Población 10 - <i>D. paspalaceus</i> | 10L4.2 | 1,09 E |
| | 10L5.3 | 1,35 E |
| | 10L11.4 | 2,72 E |

¹Cs de cada rizobio fue determinada según $(I - T) / (TN - T)$ donde I: promedio materia seca aérea de plantas inoculadas con la cepa indicada; T: promedio materia seca aérea plantas sin inocular; TN: promedio materia seca aérea plantas fertilizadas con nitrógeno.

² Escala propuesta por Brockwell *et al.*, (1966) donde E: alta; e: moderada; e-: baja; i: nula

La clasificación de los valores de Cs según la escala propuesta por Brockwell *et al.*, (1966) permite catalogar a seis cepas de rizobios presentes en suelos argentinos y obtenidas en este trabajo de tesis como eficientes para la FBN en simbiosis con plantas del complejo *D. virgatus*.

De acuerdo a datos de la literatura, reportes de fijación de nitrógeno realizados en cámaras de crecimiento de cultivos han demostrado que los patrones de respuesta de eficiencia simbiótica de distintos aislamientos de rizobios fueron variables entre especies e incluso accesiones del género *Desmanthus*. Así, Date (1991), en un estudio de eficiencia de fijación de nitrógeno en 48 accesiones de distintas especies de *Desmanthus* demostró que los patrones de respuesta a la inoculación con rizobios simbiotes de *Leucaena* spp.; *Gliricidia* sp.; *Neptunia* spp.; *Desmanthus* spp. y *Prosopis chilensis* recuperados de diferentes sitios variaron entre las distintas accesiones del género. Posteriormente, Illarze Dive (2011) informó que rizobios presentes en suelos de Uruguay inoculados en las especies *D. velutinus*, *D. bicornutus*, *D. pubescens*, *D. leptophyllus*, *D. virgatus*, *D. illinoensis* y *D. depressus* también mostraron una respuesta variable entre las especies con aumentos significativos en la materia seca aérea de las plantas. En particular, Beyhaut *et al.*, (2006a) obtuvieron incrementos de 100 % de biomasa vegetal de *D. illinoensis* con respecto a plantas sin inocular y sin el agregado de nitrógeno en ensayos de FBN con rizobios recuperados de suelos de la región noroeste de EE.UU.

En este trabajo de tesis, la inoculación de las plantas del complejo *D. virgatus* con aislamientos de rizobios presentes en suelos del centro y norte de Argentina evidenció incrementos de la biomasa aérea vegetal desde 10 % hasta 190 % comparado con las plantas sin inocular. Los resultados obtenidos coinciden con diversos estudios que han demostrado la amplia variación existente en términos de efectividad simbiótica en cepas nativas de *S. meliloti* (Ballard y Charman, 2000; Bradic *et al.*, 2003). Asimismo, se informaron diferencias significativas en la efectividad simbiótica de rizobios asociados a alfalfa aislados de suelos ácidos de Argentina y Uruguay, concluyendo que la cepa LPU63 puede ser utilizada como un inoculante efectivo para alfalfa en suelos ácidos (Segundo *et al.*, 1999). Claramente, estos reportes destacan la importancia que tienen los rizobios simbiotes adaptados a las condiciones locales como fuente primaria de nuevos inoculantes.

El amplio rango de efectividad que presentan las cepas nativas de rizobios también ha sido informado en estudios de poblaciones simbiotes de *Lotus* spp. (Baraibar *et al.*, 1999; Howieson *et al.*, 2011) y *Phaseolus vulgaris* (Giongo *et al.*, 2007; Cardoso *et al.*, 2012) reflejando la heterogeneidad genética de las poblaciones de rizobios en los suelos.

En relación al desarrollo radical de las plántulas del complejo *D. virgatus*, la inoculación en macetas con vermiculita permitió una inspección sistemática del tamaño de la raíz que reveló un efecto de promoción del crecimiento radical (con un aumento de más del 75 % en masa radical en comparación a las raíces de las plantas sin inocular o fertilizadas con nitrógeno).

Según datos de la literatura, es probable que las cepas inoculadas podrían haber producido una o varias fitohormonas, tal como se ha demostrado en rizobios de crecimiento rápido (Datta y Basu, 2000; Ghosh y Basu, 2002; Ghosh *et al.*, 2008; Spaepen *et al.*, 2009) y lento (Boiero *et al.*, 2007). Asimismo, Xu *et al.*, (2012) demostraron que cepas de *S. meliloti* modificadas genéticamente sintetizaron citoquininas que mejoraron significativamente la tolerancia de la planta hospedante a estrés por sequía. Recientemente, Glick (2015) y Gopalakrishnan *et al.*, (2015) reportaron una revisión detallada sobre los mecanismos de acción de rizobios que pertenecen a las familias *Rhizobiaceae* (excluyendo *Frankia* sp.), *Bradyrhizobiaceae* y *Phyllobacteriaceae* involucrados en la promoción del crecimiento vegetal.

V.2.2. Competitividad para la nodulación de las cepas de rizobios en simbiosis con el complejo *D. virgatus*.

Un parámetro importante para estimar el comportamiento relativo de dos rizobios frente a la planta hospedante es su competitividad para la ocupación de nódulos. Dado que los ensayos de coinoculación requieren identificar a cada uno de los rizobios que se recuperaron de los nódulos, en una etapa preliminar se han obtenido derivados resistentes a diferentes antibióticos para las cepas simbiotes presentes en los distintos sitios geográficos analizados en este trabajo de tesis. Posteriormente, en las experiencias de coinoculación realizadas en macetas con vermiculita solamente se utilizaron las cepas

resistentes a antibióticos recuperadas de los suelos de las provincias de Santa Fe, Jujuy y Corrientes que mostraron mayor capacidad simbiótica.

De este modo, en la evaluación de la capacidad competitiva de los simbiontes de *D. paspalaceus* presentes en suelos de Santa Fe se ha utilizado un derivado resistente a ampicilina para la cepa 10L11.4 y un derivado resistente a estreptomicina para el caso de la cepa 10L5.3. En los ensayos de coinoculación de los microsimbiontes de *D. virgatus* (sensu estricto) se utilizaron un derivado resistente a gentamicina para la cepa 8L12.1 y un derivado resistente a estreptomicina para el aislamiento 8L10.1. En la evaluación de la capacidad competitiva de los rizobios presentes en suelos de Corrientes se emplearon un derivado resistente a estreptomicina para la cepa 3L5.1 y uno resistente a gentamicina para el aislamiento 3L6.3.

Las distintas cepas fueron inoculadas en combinación en una relación de número 1:1 y a los 80 días post-inoculación se cortaron los nódulos de la raíz principal, se desinfectaron y se analizó en cada uno de ellos el tipo de bacterias contenidas en su interior de acuerdo a los patrones de resistencia a antibióticos que se ha detallado.

En la Figura V.4 se presentan los porcentajes relativos de ocupación de nódulos para cada uno de los ensayos de coinoculación. En relación a los simbiontes presentes en suelos de Santa Fe, se observó que la cepa 10L5.3 fue desplazada por la cepa 10L11.4 que resultó altamente competitiva.

El análisis de la competitividad de los rizobios presentes en Jujuy evidenció que el aislamiento 8L12.1 ocupaba el 67 % de los nódulos en

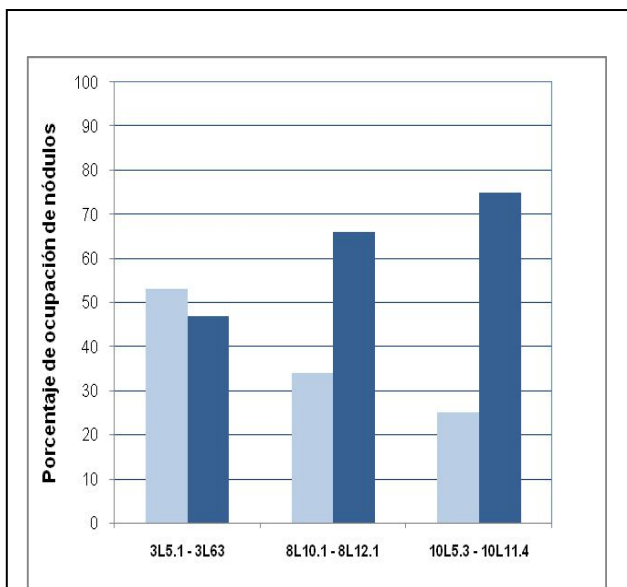


Figura V.4: Evaluación de la competitividad de los rizobios simbiontes del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos de Corrientes (3), Jujuy (8) y Santa Fe (10). Los ensayos de coinoculación se realizaron inoculando de a pares las cepas indicadas en una relación 1:1 ($10^6:10^6$ aproximadamente) y la ocupación de los nódulos fue analizada según se detalla en Materiales y Métodos sección 10. La identificación de cada rizobio presente en los nódulos se realizó en base a patrones diferenciales de resistencia a antibióticos según se indica en el texto.

relación a la cepa 8L10.1. Un comportamiento diferente resultó del ensayo de coinoculación con los aislamientos recuperados de suelos de Corrientes que mostraron un número similar de nódulos ocupados por cada una de las cepas.

El alto porcentaje de ocupación de los nódulos de las raíces sugiere que las cepas 10L11.4 y 8L12.1 tendrían una mayor capacidad de reconocimiento simbiótico de las raíces de las plantas durante las etapas tempranas de preinfección del complejo *D. virgatus*.

Investigaciones realizadas por Segundo *et al.*, (1999) y Del Papa (2001) reportaron que la cepa LPU63 eficiente para la FBN en asociación con *M. sativa* también era altamente competitiva frente a *S. meliloti* 2011, independientemente del pH del medio. Asimismo, Mostasso *et al.*, (2002) hallaron que cepas identificadas como altamente eficientes en simbiosis con *P. vulgaris* cvv. Carioca y Negro Argel mostraron competitividad ya que ocuparon el 40 % a 55 % de los nódulos en ensayos de coinoculación con la cepa de referencia CIAT899.

Los resultados obtenidos muestran que las cepas 10L11.4 y 8L12.1 presentaron una alta competitividad para colonizar las raíces y nodular las plantas, y resultan por tanto de interés práctico, ya que aparecen como un buen material de análisis para investigar en más detalle el desarrollo de la simbiosis rizobio- complejo *D. virgatus*.

V.3. Conclusiones.

Los ensayos de inoculación de plantas realizados en cámara de crecimiento de cultivo evidenciaron que en los suelos del centro y norte de nuestro país se encuentran poblaciones de rizobios con una amplia variación en términos de efectividad simbiótica para el complejo *D. virgatus*.

Los resultados obtenidos mostraron que rizobios recuperados de suelos argentinos presentaron muy buena capacidad potencial de FBN y competencia por el nicho simbiótico. Cabe destacar el comportamiento de las cepas 10L11.4 y 8L12.1 constituyendo una simbiosis de alta eficiencia en fijación de nitrógeno con *D. paspalaceus*

y *D. virgatus* (sensu estricto). Estas cepas establecieron una nodulación eficiente en fijación de nitrógeno y además presentaron una alta competitividad.

Asimismo, se demostró un efecto favorable sobre el crecimiento de la raíz por los rizobios inoculados que podría favorecer la tolerancia de las plantas al estrés nutricional y la sequía mediante la mejora de la absorción de nutrientes y agua a través de la generación de un mayor desarrollo radical.

Las características simbióticas descritas en este Capítulo y la capacidad de tolerancia a condiciones de estreses abióticos (ver Capítulo III) de los rizobios 10L11.4, 8L12.1 y 3L6.3 justifican su evaluación futura en condiciones reales de campo.

Capítulo VI

Evaluación de la performance a campo de los aislamientos noduladores de *D. virgatus* seleccionados por su eficiencia simbiótica

VI.1. Introducción.

En Argentina, el incremento de las zonas agrícolas cultivables ha impulsado a los sistemas ganaderos a desplazarse hacia áreas menos productivas y con problemas de diversos tipos, como elevadas temperaturas, escasez de agua y/o salinidad. La implantación de pasturas forrajeras en zonas cada vez más marginales constituye uno de los principales desafíos que debe afrontar el sector ganadero (Fernández Cirelli y Volpedo, 2002). Como se ha descrito en los capítulos precedentes de esta tesis, una alternativa para mejorar la producción agropecuaria podría ser la introducción a cultivo de leguminosas con reconocido potencial forrajero y adaptadas a nuestras condiciones edafoclimáticas, siendo un ejemplo de ellas el complejo *D. virgatus* de amplia distribución en el centro y norte del país.

Las plantas forrajeras perennes se caracterizan por presentar semillas de tamaño pequeño y un crecimiento vegetativo inicial muy lento. Estas características ocasionan que el establecimiento de las plántulas sea una etapa crucial para lograr una exitosa implantación de la pastura. El establecimiento de una plántula es la etapa más vulnerable en su ciclo de vida, ya que las reservas limitadas de la semilla, la baja capacidad fotosintética de las primeras hojas y la ausencia de un sistema radicular bien desarrollado dificultarán la absorción eficiente de agua y nutrimentos (Baruch y Fisher, 1991). Según datos de la literatura, una limitación importante para la implantación de la mayoría de las leguminosas forrajeras perennes es el lento crecimiento inicial de las plántulas (Brandon y Shelton, 1977; Cooper, 1977). Otro factor limitante en el establecimiento exitoso de una pastura leguminosa es la ocurrencia de una simbiosis adecuada con rizobios noduladores específicos de dicha especie con el fin de lograr una efectiva fijación biológica de nitrógeno (Cooper, 1977; Armstrong *et al.*, 1999; Thrall *et al.*, 2005). Además, las condiciones adversas del medio ambiente típicas de zonas agroecológicas marginales, como son altas temperaturas o escases de agua, dificultarán aún más la obtención de una buena implantación de la pastura.

En relación a las plantas del complejo *D. virgatus*, sus semillas poseen un tamaño pequeño y escasas reservas seminales. Investigaciones realizadas por Brandon y Jones (1998) demostraron que la siembra de las semillas de *D. virgatus* a profundidades de 2 cm

o menos en condiciones de crecimiento controlado presentaron los mayores porcentajes de emergencia. Desde un punto de vista agronómico, en condiciones de campo se recomienda sembrar las semillas pequeñas a una escasa profundidad de la superficie del suelo para favorecer una rápida emergencia de las plántulas. Dicha característica botánica asociada a las condiciones climáticas típicas de las zonas de adaptación de las especies de *Desmanthus* podrían afectar la supervivencia de los rizobios nativos a través de la sequedad o falta de humedad conveniente del suelo antes que se logre el establecimiento de las plántulas. Evaluaciones del crecimiento vegetativo inicial de poblaciones nativas de *D. virgatus* y *D. paspalaceus*, y los cultivares Marc de *D. virgatus* y Bayamo de *D. leptophyllus*, realizadas en ensayos a campo en las localidades de Charata (provincia de Chaco) y Esperanza (Santa Fe), mostraron un porcentaje en el establecimiento de las plántulas muy bajo (Zabala *et al.*, 2010). Los autores mencionados sugirieron la necesidad de contar con investigaciones que evaluaran el efecto de la inoculación con bacterias simbióticas efectivas en el establecimiento de las plantas, tal como ha sido demostrado en *D. illinoensis* (Byun *et al.*, 2004).

En las zonas del centro y norte de nuestro país, las altas temperaturas registradas en los períodos cálidos coincidentes con la época de siembra de las especies del complejo *D. virgatus* afectarían el contenido hídrico del suelo provocando condiciones estresantes para la sobrevivencia de los microsimbiontes. Sin embargo, existen pocos antecedentes de estudios realizados sobre la FBN de los aislamientos nativos capaces de nodular *D. virgatus* en los suelos recomendados para su implantación (Jones y Clem, 1997; Bahnisch *et al.*, 1998). Asimismo, diversos investigadores han enfatizado la necesidad de incluir la técnica de inoculación con cepas altamente efectivas como un componente de rutina en la siembra de *D. virgatus* (Bahnisch *et al.*, 1998; Brandon *et al.*, 1998). En este marco tan complejo, uno de los puntos más vulnerables en la simbiosis del complejo *D. virgatus* es el propio rizobio, que en situaciones de campo deberá presentar una adecuada capacidad de adaptación, crecimiento y multiplicación, y eficiencia para la fijación de nitrógeno en un medio ambiente con características edafoclimáticas propias del sitio en cuestión.

En este trabajo de tesis se han descrito el aislamiento y caracterización fenotípica y genotípica de una colección de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos argentinos (ver capítulos II, III y IV). De acuerdo a los análisis de

tolerancia a diferentes situaciones de estreses abióticos se pudieron distinguir cepas de rizobios con capacidad de crecimiento y desarrollo en condiciones que se consideran adversas. Ante las dificultades ocasionadas por las condiciones edafoclimáticas de las zonas de implantación de las especies de *Demantus*, una alternativa viable fue seleccionar cepas nativas adaptadas a las altas temperaturas para minimizar los efectos adversos de este parámetro sobre el proceso de nodulación y FBN.

Los resultados obtenidos en el capítulo precedente permitieron seleccionar aislamientos de rizobios que presentaron una marcada eficiencia para la FBN y competitividad en simbiosis con plantas del complejo *D. virgatus* en condiciones de crecimiento controlado. Sin embargo, las cepas de rizobios incorporadas al suelo con la semilla sufrirán los efectos de las condiciones físicas y químicas del medio, además de la interacción con otros microorganismos presentes en el suelo. La capacidad de los organismos incorporados al medio edáfico para superar estas barreras determinará la probabilidad de subsistir en el suelo, lograr una adecuada colonización de la rizósfera e iniciar el intercambio de señales, la infección radical y la fijación de nitrógeno en los nódulos. De ese modo, el medio ambiente edáfico actuará tanto sobre la supervivencia y multiplicación de los microorganismos como sobre el proceso de nodulación y funcionamiento eficiente del nódulo. En este sentido, tienen un efecto marcado la acidez del suelo, salinidad, concentración y disponibilidad de macro y micronutrientes, temperatura y humedad (Graham, 2008). Debido a todas estas razones, uno de los puntos más relevantes en la selección de aislamientos de rizobios eficientes será la evaluación del comportamiento de las cepas simbiotes en condiciones reales de campo.

El objetivo del presente capítulo fue evaluar la performance a campo de los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* previamente seleccionados por su destacada capacidad de fijación de nitrógeno en condiciones de crecimiento controlado.

VI.2. Resultados y discusión.

La etapa de selección mediante pruebas a campo se realizó a través de la implantación de dos ensayos, en el primero (ensayo I) se utilizaron semillas de *D. virgatus* cv Marc y en el segundo (ensayo II) semillas de una población nativa de *D. virgatus* (sensu estricto) con características forrajeras promisorias. En las experiencias a campo se realizaron los seis tratamientos siguientes: control sin inocular, inoculado con las cepas individuales representativas de la colección códigos 3L6.3, 8L12.1 y 10L11.4, inoculado con la cepa CB3126 recuperada de nódulos de las raíces de *L. leucocephala* y control fertilizado con nitrógeno. El diseño experimental de cada ensayo fue en bloques al azar con tres repeticiones.

VI.2.1. Características edafoclimáticas del sitio de los ensayos a campo.

Los ensayos se realizaron en el Campo Experimental “Juan Donnet” de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNL, ubicado en la localidad de Esperanza (31°25’S, 60°56’W), departamento Las Colonias, provincia de Santa Fe.

De acuerdo a datos de la Carta de Suelos de la República Argentina (INTA, 1991), el suelo corresponde al orden Molisol, grupo y subgrupo Argiudol típico, serie Esperanza (ESP) con un índice de productividad de 82. La textura del suelo es franco-arcillo-limosa con un drenaje bueno a moderado. El suelo es profundo con un horizonte superficial de 27 cm de espesor, seguido por un horizonte de 13 cm, donde se incrementa gradualmente el contenido de arcilla. Los horizontes se hallan bien estructurados, con adecuados contenidos de materia orgánica que le confieren buenas condiciones de fertilidad.

Los rizobios son habitantes normales de los suelos, aunque muchas veces pueden presentarse en baja densidad, son capaces de sobrevivir compitiendo con el resto de la microflora y hacer uso eficiente de los nutrientes disponibles (Frioni, 2006), aún en ausencia de su huésped leguminosa. Debido a estas razones, previo a la implantación de los ensayos se investigó la posible presencia de rizobios simbioses de *Desmanthus* sp. Para ello, se sembraron semillas de *D. virgatus* cv Marc y de poblaciones tomadas al azar

de *D. virgatus* y *D. paspalaceus* colectadas en el norte argentino y se mantuvieron en cultivo durante ocho meses. Cabe aclarar que, el campo experimental no presentaba historia previa de cultivo de ninguna especie del género *Desmanthus*. La evaluación de la nodulación de las plantas desarrolladas evidenció la presencia de estructuras nodulares en sus raíces, cuya coloración interna fue predominantemente rojiza.

Al momento de la implantación de las pruebas a campo, los resultados del análisis químico de la capa superficial (0 a 25 cm) del suelo mostraron que contenía 2,4 % de materia orgánica, 0,145 % de nitrógeno orgánico total y 25 ppm de fósforo extractable. Por otro lado, el recuento de rizobios del suelo en plantas estériles por el método del número más probable (NMP) presentó menos de 10^2 rizobios/g con capacidad de nodular a *D. virgatus* (ver sección 11.1. de Materiales y métodos).

La inoculación de las leguminosas puede resultar un proceso favorable en los suelos que presenten una baja población de rizobios indígenas. Según datos de la literatura, la inoculación resultaría beneficiosa en sitios con una población natural de rizobios inferior a 100 bacterias por gramo de suelo, independientemente de la eficiencia para fijar nitrógeno de los rizobios nativos (Thies *et al.*, 1991; Catroux *et al.*, 2001).

Una situación similar a la expuesta precedentemente ocurriría durante la implantación de pasturas de alfalfa en suelos de la República Oriental del Uruguay, en los cuales existen poblaciones nativas pero en números bajos, por lo que habitualmente su efecto es irrelevante y la nodulación dependería de una correcta inoculación con cepas efectivas (Dutto, 2002).

En relación a las condiciones climáticas, el área del sitio de las pruebas a campo presenta un clima templado pampeano húmedo. La temperatura media diaria anual es 18°C y varía entre 25°C en verano y 10°C en invierno. El valor medio anual de precipitaciones es 926 mm y su distribución presenta los menores valores en el periodo junio-agosto, mientras que los máximos se registran en los meses de diciembre, enero y marzo. El volumen de precipitación medio histórico supera a la evapotranspiración potencial en 20 mm, siendo el periodo de verano el de máximos requerimientos y de utilización del agua acumulada. De acuerdo a valores medios, el balance hídrico no muestra un déficit importante de agua, por lo cual desde ese punto de vista, en la región

no se presentarían limitaciones para alcanzar altos rendimientos de cultivos y pasturas (INTA, 1991).

La información meteorológica registrada durante los meses de ejecución de los ensayos en el campo experimental de la FCA de la localidad de Esperanza se presenta en la Tabla VI.1. Según los datos pluviométricos, durante el periodo de realización de las experiencias se registró un volumen de precipitaciones de 509 mm, siendo la media histórica para el periodo correspondiente de 490 mm.

Tabla VI.1: Valores medios mensuales de las variables meteorológicas registradas durante los meses de realización de los ensayos en el Campo Experimental Juan Donnet de la localidad de Esperanza (Periodo Enero 2012 - Mayo 2012 Datos obtenidos de la Estación meteorológica automática de la FCA).

| Variable meteorológica | Enero | Febrero | Marzo | Abril | Mayo |
|--|--------|---------|--------|--------|--------|
| Temp. max (°C) | 34,0 | 31,4 | 29,0 | 24,7 | 25,5 |
| Temp. media (°C) | 28,1 | 26,0 | 24,3 | 19,6 | 18,1 |
| Temp. min (°C) | 20,6 | 20,8 | 18,1 | 14,0 | 11,3 |
| Temp. suelo (°C) | 28,5 | 26,9 | 24,4 | 20,5 | 16,7 |
| RS ¹ (Mj/m ² /día) | 25,5 | 19,3 | 17,8 | 12,3 | 13,1 |
| ETo ² (mm/día) | 5,9 | 4,4 | 3,9 | 2,7 | 2,5 |
| Patm ³ (hPa) | 1004,8 | 1004,6 | 1008,0 | 1009,9 | 1011,5 |
| HR ⁴ (%) | 64,5 | 78,2 | 82,3 | 83,5 | 77,2 |
| Precipitación (mm) | 98 | 189 | 158 | 29 | 35 |

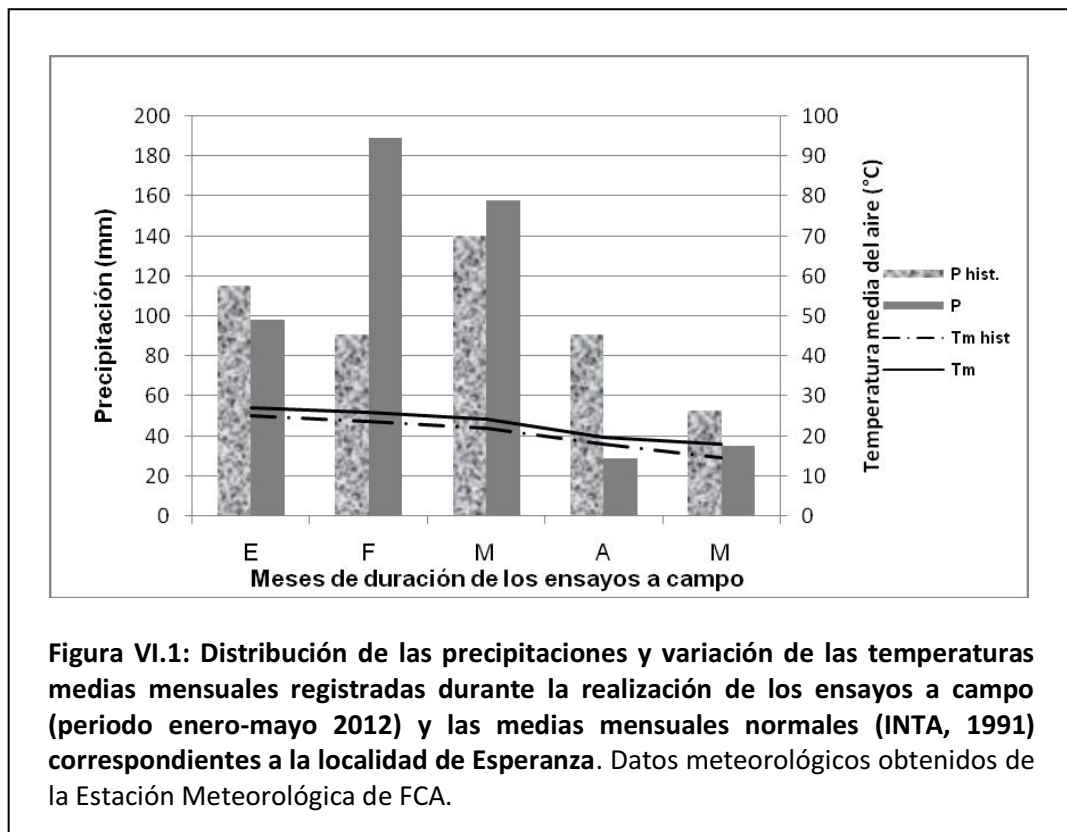
¹Radiación solar ² Evapotranspiración potencial ³ Presión atmosférica ⁴ Humedad relativa

La temperatura media mensual de suelo fue 28,5°C en enero y 26,9°C en febrero, superando los 30°C durante varios días consecutivos en el mes de enero de 2012. La temperatura tiene una influencia marcada sobre la sobrevivencia y persistencia de las cepas de rizobios en los suelos (Sadowsky, 2005). Las altas temperaturas de suelo registradas en las zonas tropicales y subtropicales constituyen un problema importante para la FBN (Michiels *et al.*, 1994). De acuerdo a datos de la literatura, las temperaturas altas en la rizósfera afectaron la infección bacteriana y fijación simbiótica de nitrógeno en varias especies de leguminosas, incluyendo caupí (Rainbird *et al.*, 1983), maní (Kishinevsky *et al.*, 1992) y frijoles (Hungria y Franco, 1993). Las temperaturas óptimas

para la fijación de nitrógeno en la asociación rizobio-leguminosa fueron 30°C para trébol y guisantes, y 35°C a 40°C para soja, maní y caupí (Michiels *et al.*, 1994).

La exposición de ambos socios simbióticos a temperaturas extremas muy por encima o por debajo de estas temperaturas críticas ocasionarían problemas en la infección, en el desarrollo y funcionamiento de los nódulos, y en el proceso de nodulación en general (Gibson, 1971), así como también en el crecimiento de la planta y productividad. No obstante, investigaciones realizadas han demostrado que la influencia de la temperatura sobre la nodulación y fijación simbiótica de nitrógeno dependería, además de la variedad de planta, de la cepa de rizobio noduladora (La Favre y Eaglesham, 1986; Arayankoon *et al.*, 1990).

En la Figura VI.1. se presentan la distribución de las precipitaciones y la variación de las temperaturas medias mensuales registradas para el periodo comprendido entre enero y mayo de 2012, y las medias mensuales normales (INTA, 1991). La distribución de las precipitaciones fue similar a la distribución histórica reconocida para la región pampeana húmeda, donde los valores máximos se presentan en los meses de verano. Sin embargo, durante el mes de febrero el volumen de precipitaciones registrado superó en 107 % al valor normal, mientras que en abril fue 68 % inferior al valor histórico de la zona.



Las temperaturas medias mensuales registradas en los meses en que se llevaron a cabo los ensayos fueron superiores al promedio normal de la región (INTA, 1991).

Según se muestra en la Tabla VI.1., durante el mes de preparación del suelo e implantación de los ensayos a campo se registraron escasas precipitaciones, con elevados valores de temperaturas de aire y suelo, radiación solar y evapotranspiración potencial. Dicha situación habría ocasionado un ambiente con características edafoclimáticas poco favorables para la sobrevivencia de los rizobios, la colonización de la rizósfera y el inicio del proceso de infección. Posteriormente, en el transcurso de los meses de febrero y marzo, los incrementos en los valores de precipitaciones registrados y la progresiva disminución de la radiación solar y evapotranspiración podrían haber generado un ambiente edáfico más propicio para la ocurrencia de las complejas interacciones entre las cepas de rizobios y las raíces de las plantas de *D. virgatus*.

VI.2.2. Genotipos y poder germinativo de las semillas de *D. virgatus*.

Las semillas de *D. virgatus* cv. Marc procedentes del Australian Tropical Crops and Forages Collection (Queensland Department of Primary Industries and Fisheries, Australia) fueron utilizadas para la implantación del ensayo a campo I. Cabe destacar que, el material vegetal original a partir del cual se desarrolló el cultivar Marc fue colectado en Argentina (Jones y Clem, 1997).

En la implantación del ensayo II se emplearon semillas de una población nativa de *D. virgatus* (sensu estricto) originaria del Departamento Ledesma, provincia de Jujuy, codificada en este trabajo como población 8 (Id 7059), que presentó características agronómicas promisorias desde el punto de vista forrajero (Zabala *et al.*, 2010). Esta experiencia a campo se realizó con el propósito de obtener información adicional sobre el potencial genético de la población nativa para fijar nitrógeno en simbiosis con cepas autóctonas o introducidas de rizobios.

Durante el transcurso de los años precedentes a la implantación de los ensayos, se cultivaron plantas de *D. virgatus* cv Marc y de la población 8 en el *Jardín de Introducción del Campo Experimental "Juan Donnet"* de la FCA-UNL. En los meses de madurez fisiológica se cosecharon en forma manual los frutos y las semillas fueron conservadas

hasta el momento de su utilización. De ese modo, se lograron regenerar los germoplasmas de la población nativa y del cultivar Marc, obteniendo una cantidad suficiente de semillas para la implantación posterior de las pruebas a campo.

Previo a la siembra, las semillas cosechadas de *D. virgatus* se seleccionaron de acuerdo con la uniformidad de tamaño y las características externas, y se descartaron aquellas con alteraciones y malformaciones. El análisis del poder germinativo (PG) proporcionó información sobre el valor de las semillas en relación a su comportamiento a campo en condiciones agroclimáticas favorables (Peretti, 1994). Los valores de PG de la población nativa de *D. virgatus* y del cultivar Marc fueron 79 % y 70 % promedio de cinco repeticiones respectivamente. La tasa de germinación de las especies de *Desmanthus* es usualmente alta, variando entre 53 % y 100 %. El problema principal en la germinación ocurre cuando la testa falla en romperse y permanece unida a los cotiledones que no podrán desarrollar (Luckow, 1993). Es conveniente utilizar semillas que logren una rápida y uniforme germinación en el campo, para conseguir una adecuada emergencia y cobertura del suelo lo antes posible, controlando el crecimiento de las malezas y minimizando las pérdidas de semilla por depredadores, como insectos de suelo, roedores o pájaros.

VI.2.3. Preparación y evaluación de la calidad de los inoculantes.

Los inoculantes fueron preparados en turba estéril a partir de cultivos puros de los aislamientos seleccionados 3L6.3, 8L12.1 y 10L11.4, y la cepa CB3126 desarrollados en medio LMA líquidos. Previamente a la preparación en base turba, se realizaron pruebas de pureza para las cepas de rizobios confirmando mediante la observación microscópica la presencia de bacilos gram negativos y a través de la observación macroscópica el desarrollo de colonias típicas de rizobios en placas con LMA. El recuento de rizobios viables en placa evidenció que los cuatro aislamientos desarrollados en los medios líquidos lograron una concentración final igual o superior a 1.10^9 ufc/ml de caldo.

Posteriormente, los caldos de cultivo con las cepas seleccionadas se usaron para impregnar el soporte en base turba estéril y luego de 7 días de maduración se obtuvieron los inoculantes utilizados en los ensayos a campo. La ventaja de los inoculantes que

presentan turba como soporte se sustenta en que ofrecen a los rizobios una mayor protección frente a factores adversos del suelo, como altas temperaturas, deshidratación y biocidas sobre la semilla. Los inoculantes líquidos pueden responder con rendimientos similares a los obtenidos con inoculantes tradicionales (Date, 2000); sin embargo, la sobrevivencia de los rizobios en la semilla es menor, ya que no proveen la protección que se logra con la turba (Labandera, 2003). Actualmente, se continúan buscando nuevas alternativas de formulación de inoculantes que se basan en el aumento de la población de rizobios en el volumen o peso del producto, así como en la sobrevivencia del rizobio en el soporte (Stephens y Rask, 2000).

Las normas de calidad en la preparación de inoculantes son primordiales para garantizar un número mínimo de poblaciones bacterianas viables y libres de contaminantes (Stephens y Rask, 2000). En la Tabla VI.2. se presentan las concentraciones finales obtenidas en los recuentos del número de rizobios viables para los inoculantes preparados en base turba y semillas de *D. virgatus* inoculadas. El propósito de estos recuentos fue asegurar que el número de células de rizobios en los inoculantes y en las semillas inoculadas, alcancen un nivel adecuado para obtener una buena infección en las raíces de las plantas de *D. virgatus* durante los ensayos de campo.

Tabla VI.2: Concentración final de rizobios viables por gramo de los inoculantes base turba estéril y sobre cada semilla de *D. virgatus* inoculada con las cepas seleccionadas.

| Cepas | Número de rizobios viables | |
|----------------|--|---|
| | Inoculante base turba (ufc/g) ¹ | Inoculante sobre semilla (ufc/semilla) ¹ |
| 3L6.3 | 2,4.10 ⁹ | 3,8.10 ⁴ |
| 8L12.1 | 1,1.10 ⁹ | 1,9.10 ⁴ |
| 10L11.4 | 1,5.10 ⁹ | 2,8.10 ⁴ |
| CB3126 | 2,2.10 ⁹ | 3,5.10 ⁴ |

¹Método de Recuento de viables en Placa según Vincent, (1970).

Los resultados obtenidos en los recuentos de células viables mostraron que las concentraciones finales de los inoculantes preparados con las cepas de rizobios seleccionadas cumplieron con las exigencias especificadas en las normativas de control de calidad de nuestro país. En este aspecto, la legislación vigente establece que los

inoculantes para leguminosas deben contener no menos de 1000 millones de bacterias viables por g o ml de producto a la fecha de elaboración y proveer como mínimo 1000 rizobios sobre cada semilla de tamaño tipo alfalfa hasta la fecha de vencimiento (Corvalán *et al.*, 2007).

La calidad de los inoculantes depende principalmente de la cepa de rizobio y del número de bacterias aportadas por la inoculación. De acuerdo a datos de la literatura, existe una clara relación entre el aumento en el número de rizobios viables aplicado sobre las semillas y la nodulación e incremento en el rendimiento de los cultivos (Chandra y Pareek, 1987; Hume y Blair, 1992; Patrick y Lowther, 1995).

En las siembras a campo, los valores de poblaciones de rizobios inferiores al mínimo requerido ocasionarían un desempeño inadecuado del inoculante y además, podrían influir en el desaliento del productor agropecuario para efectuar prácticas de inoculación (Stephens y Rask, 2000). De ese modo, el uso de productos de mala calidad reduciría el beneficio esperado de la inoculación de *D. virgatus* y en el futuro podría dificultar la implementación de nuevas tecnologías microbianas para la FBN.

VI.2.4. Implantación de los ensayos a campo.

En las experiencias a campo se realizaron los tratamientos siguientes: plantas control sin inocular, inoculado con las cepas noduladoras individuales 3L6.3, 8L12.1 y 10L11.4 obtenidas en este trabajo, inoculado con la cepa CB3126 recuperada de nódulos de las raíces de *L. leucocephala* y control fertilizado con nitrógeno. El diseño experimental de cada ensayo fue en bloques completos al azar con tres repeticiones.

Las semillas de *D. virgatus* utilizadas en los ensayos I y II fueron escarificadas con agua hirviendo (ver sección 4.2.1. de Materiales y Métodos) y se cuantificaron 100 semillas por metro de surco de siembra para cada una de las parcelas y sus réplicas. En los tratamientos inoculados, previo al momento de la siembra las simientes fueron humectadas con agua destilada azucarada 20 % (p/v) y se mezclaron con el inoculante en base turba correspondiente a razón de 8 g por Kg de semilla. La cuantificación del número de semillas a sembrar por metro lineal de surco se realizó con el fin de evitar el inconveniente de separar las semillas para cada parcela en base a peso o volumen

después de la inoculación, ya que las semillas inoculadas tendrán un peso mayor y es indispensable mantener el mismo número de semillas por parcela en los tratamientos inoculados y no inoculados.

En el tratamiento fertilizado con nitrógeno se aplicaron 20 Kg de N Ha⁻¹ cada dos semanas durante el periodo de ejecución del ensayo. El objetivo de este tratamiento fue demostrar el potencial máximo de rendimiento de las plantas de *D. virgatus* cuando el nitrógeno no limita su crecimiento.

La implantación de los ensayos se realizó durante la segunda quincena del mes de enero de 2012, en los días posteriores a la ocurrencia de una moderada precipitación. En las pruebas, se sembraron primeramente los tratamientos sin inocular para evitar riesgos de contaminación y se tomaron las medidas necesarias para eliminar las posibilidades de contaminación entre los tratamientos tal como ha sido descrito por CIAT (1988).

Las parcelas de cada tratamiento de *D. virgatus* se separaron entre sí mediante la siembra simultánea de una gramínea forrajera *Setaria italica* para reducir la posibilidad de contaminación cruzada por rizobios. Además, la siembra intercalada de una planta gramínea entre los surcos de la leguminosa permitiría reducir el nivel inicial de nitrógeno del suelo (CIAT, 1988).

VI.2.5. Establecimiento de las plántulas.

El establecimiento de las plántulas de *D. virgatus* cv Marc correspondientes al ensayo a campo I presentó valores de 15 % ± 2 para los seis tratamientos y sus réplicas. En la implantación de *D. virgatus* (sensu estricto) del ensayo II, el establecimiento de las plántulas no fue uniforme, ya que en algunas parcelas se alcanzó el total de plantas esperadas, mientras que en otras fue inferior a 10 %. Resultados similares en relación a la falta de uniformidad y valores en el establecimiento de las plántulas fueron obtenidos en experiencias realizadas a campo con diferentes accesiones del género *Desmanthus* en la Facultad de Ciencias Agrarias de Corrientes (Hack *et al.*, 2005) y en las provincias de Chaco y Santa Fe (Zabala *et al.*, 2010), y con *D. virgatus* cv Jaribu en el Campo Experimental Regional Leales de INTA, Tucumán (Roncedo y Pérez, 2011).

Los bajos valores de establecimiento de las plántulas obtenidos en la implantación del ensayo a campo II implicaron que la cobertura de suelo fuera reducida haciendo muy

difícil el análisis estadístico de los tratamientos. Debido a estas razones, las plantas de *D. virgatus* originarias de la localidad de Ledesma, provincia de Jujuy correspondientes a la experiencia II no pudieron ser incluidas en las posteriores evaluaciones de FBN.

De acuerdo a datos de la literatura, el establecimiento de *D. virgatus* y *D. paspalaceus* procedentes del centro y norte de nuestro país presentaron diferencias entre las poblaciones analizadas (Zabala *et al.*, 2010). Asimismo, experiencias a campo realizadas en la Universidad James Cook de Australia mostraron que la emergencia de las plántulas de distintas accesiones de *D. bicornutus*, *D. leptophyllus*, *D. pubescens* y *D. virgatus* fue significativamente afectada por el genotipo (Rangel, 2005).

VI.2.6. Evaluación de la performance simbiótica de los aislamientos noduladores de *D. virgatus* en condiciones de campo.

La evaluación de la performance simbiótica de los aislamientos noduladores nativos 3L6.3, 8L12.1 y 10L11.4 y de la cepa introducida CB3126 en comparación con plantas sin inocular y fertilizadas con nitrógeno se realizó a las 16 semanas posteriores a la implantación de la experiencia a campo. Se tomaron muestras compuestas de 10 a 12 ejemplares de *D. virgatus* cv. Marc de las líneas centrales de las parcelas y se determinaron la altura, biomasa seca aérea y contenido de nitrógeno de las plantas.

El efecto de la inoculación con las cepas de rizobios nativas e introducida CB3126 y la fertilización nitrogenada sobre la altura promedio de las plantas de *D. virgatus* en condiciones de campo presentó variaciones desde $43,7 \pm 10,3$ cm para el testigo hasta $55,8 \pm 8,7$ cm para las plantas inoculadas con la cepa 10L11.4 procedente de Santa Fe. De acuerdo al análisis de varianza, se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,01$) entre las alturas promedio de los distintos tratamientos y mediante la comparación de medias según el test de Tukey se observó que la altura mayor correspondió al inoculado con la cepa termotolerante 10L11.4 y la menor al tratamiento testigo.

La altura media de las plantas cuyas semillas fueron tratadas al momento de la siembra con el aislamiento 3L6.3 y la cepa CB3126 fueron muy similares, $46,4 \pm 9,4$ cm y $47,7 \pm 8,6$ cm respectivamente, sin mostrar diferencias significativas con las plantas sin inocular y sin fertilizar. A su vez, la altura promedio de los ejemplares inoculados con la

cepa 8L12.1 procedente de Jujuy y de aquellos fertilizados fueron $49,5 \pm 9,0$ cm y $51,2 \pm 8,8$ cm respectivamente, sin presentar diferencias estadísticas entre ellos ($P < 0,01$).

Las plantas de *D. virgatus* inoculadas con el aislamiento 10L11.4 y las fertilizadas con nitrógeno superaron en altura 27 % y 17 % respectivamente a las plantas sin inocular bajo las condiciones edafoclimáticas de realización del ensayo a campo.

En la Figura VI.2. se presenta la respuesta a la inoculación con las cepas de rizobios nativas 3L6.3, 8L12.1 y 10L11.4 e introducida CB3126 en la materia seca aérea (mg/pl) y contenido de Nitrógeno (mg N/pl) de *D. virgatus* cv Marc en condiciones de campo.

Los valores de biomasa aérea de las plantas inoculadas con los aislamientos nativos y la cepa CB3126 fueron significativamente superiores a los valores de biomasa de las testigos, evidenciando que las cepas de rizobios tuvieron un efecto positivo al estimular un mayor crecimiento y acumulación de biomasa en *D. virgatus* con respecto a las plantas sin inocular y sin fertilizar.

La evaluación de la nodulación de las plantas cultivadas durante el año previo al de implantación de la experiencia mostró la presencia de estructuras nodulares en sus raíces. Sin embargo, al momento de la siembra del ensayo a campo el suelo presentó una baja densidad de rizobios con capacidad de nodular a *D. virgatus* (ver sección 2.1. de este capítulo), y la extracción y observación de las plantas durante los meses de realización de esta experiencia evidenció la ausencia de nódulos en las raíces de las plantas sin inocular y de aquellas testigo fertilizadas con N. Según Date (1991), las plantas del género *Desmanthus* no presentarían una alta especificidad en sus requerimientos de nodulación. Sin embargo, Bahnisch *et al.*, (1998) demostraron que los suelos de Queensland podían contener pocos o ningún rizobio nativo capaz de nodular *D. virgatus*, sugiriendo la necesidad de disponer de cepas efectivas para su utilización como inoculantes biológicos.

En las condiciones ambientales en que se llevó a cabo el ensayo, la población de rizobios nativos en el suelo del campo experimental fue baja e insuficientemente efectiva como para que las plantas alcancen su potencial de producción máximo. Esta situación sugeriría considerar con precaución la creencia de que las leguminosas tropicales y subtropicales son promiscuas, y en consecuencia responden menos a la inoculación. Según Date (1977), la necesidad de inocular no dependería únicamente de la especificidad de la leguminosa, sino también de las condiciones del suelo.

El peso seco promedio de las plantas inoculadas con la cepa recomendada CB3126 fue mayor que el de las plantas testigo, sin embargo el valor fue significativamente menor que el obtenido en las plantas inoculadas con los aislamientos nativos termotolerantes 8L12.1 y 10L11.4, y en aquellas fertilizadas con N. Según datos de la literatura, la cepa de rizobio comercial CB3126 fue efectiva en la formación de nódulos y fijación de nitrógeno en distintas accesiones de *D. virgatus* cultivadas en macetas (Date, 1991), y en *D. virgatus* cv. Marc, *D. leptophyllus* cv Bayamo y *D. pubescens* cv Uman en tres de los cuatro sitios evaluados en ensayos a campo en el sureste de Queensland (Brandon *et al.*, 1998). Sin embargo, la cepa CB3126 presentó una sobrevivencia muy baja en las semillas de *D. virgatus* almacenadas bajo condiciones cálidas y secas (Becerra Stiefel *et al.*, 1998).

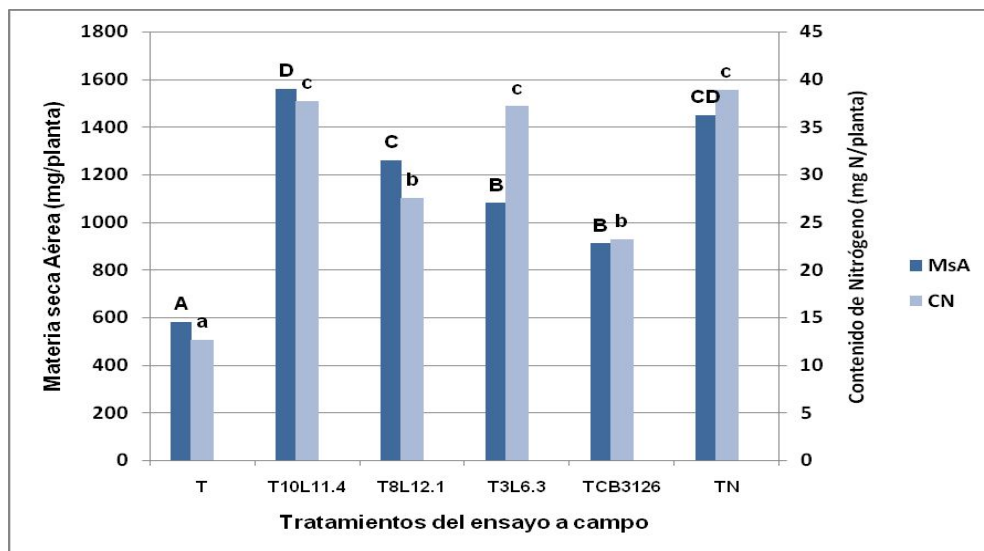


Figura VI.2: Efecto de la inoculación con cepas de rizobios nativos e introducida CB3126 y la fertilización nitrogenada sobre la Materia seca Aérea (mg/pl) y Contenido de Nitrógeno (mg N/pl) de *D. virgatus* cv. Marc en condiciones de campo en la localidad de Esperanza, Santa Fe. El diseño experimental fue en bloques al azar con tres repeticiones y seis tratamientos. T: plantas sin inoculación y TN: plantas sin inoculación con el agregado de nitrógeno (7 aplicaciones de 20 kg N/ha como urea sólida cada 2 semanas durante la realización del ensayo de campo). Las plantas de cada parcela (n:10 a 12) fueron cosechadas a los 16 semanas de la siembra y se determinaron Msa: Materia seca aérea por planta y CN: contenido de nitrógeno por planta. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según Test de Tukey ($P < 0,01$).

En las regiones centro y norte de Argentina, las temperaturas elevadas características de la estación estival registradas durante la siembra de las pequeñas semillas o en el estadio inicial de crecimiento vegetativo de *Desmanthus* sp. afectarían el contenido hídrico del suelo provocando condiciones estresantes para la sobrevivencia de las cepas simbiotas. En este contexto, el proceso de nodulación y FBN de las plantas de *D. virgatus* dependerían de la tolerancia a condiciones ambientales estresantes y de la efectividad de las cepas de rizobios indígenas o introducidas con el inoculante biológico.

En la presente experiencia de evaluación de la performance simbiótica a campo de las cepas nativas del centro y norte nuestro país, la respuesta a la inoculación mostró incrementos de materia seca aérea de las plantas de *D. virgatus* de 88 %, 122 % y 150 % en relación a las plantas sin inocular y sin fertilizar, para los aislamientos 3L6.3, 8L12.1 y 10L11.4 respectivamente. Por otro lado, la inoculación con la cepa recomendada CB3126 promovió aumentos de la biomasa vegetal de 67 % en relación al testigo. Evaluaciones de la inoculación con rizobios en los tres cultivares comerciales de *Desmanthus* realizados en Australia (Brandon *et al.*, 1998) indicaron que los aislamientos obtenidos a partir de *L. leucocephala*, cepa CB3126, mostraron respuestas a la inoculación con incrementos de peso seco de las plantas de 34 % a 313 %, dependiendo de la presencia de rizobios nativos y del contenido de nitrógeno del suelo en estudio.

En relación a otras especies del género *Desmanthus*, Beyhaut *et al.*, (2006a) en ensayos a campo realizados en los Estados de Kansas y Minnesota, Estados Unidos, demostraron que plantas de *D. illinoensis* inoculadas con rizobios nativos incrementaron 170 % la materia seca vegetal en comparación con plantas sin inocular y con aquellas fertilizadas con nitrógeno.

Los contenidos de N (mg N/planta) en la biomasa aérea de las plantas inoculadas con los aislamientos nativos 3L6.3 y 10L11.4, y de aquellas fertilizadas no presentaron diferencias entre sí, sin embargo fueron significativamente superiores a los obtenidos en las plantas testigo e inoculadas con las cepas 8L12.1 y CB3126. El mayor contenido de nitrógeno en la parte aérea comparado con el control demostró la efectividad de las cepas utilizadas como inoculantes, indicando que los aislamientos 3L6.3 y 10L11.4 fueron los microsimbiontes más eficientes en el proceso de FBN de las plantas de *D. virgatus* bajo las condiciones de realización del ensayo a campo.

Según se muestra en la Figura VI.2., sería importante considerar la cepa 3L6.3 en estudios posteriores de evaluación de la performance simbiótica, ya que el forraje inoculado con esta cepa presentó 3,50 % de N total en la materia seca aérea, mientras que las plantas testigo y fertilizadas presentaron 2,48 % y 2,68 % de N respectivamente. El aumento del porcentaje de N en el forraje mediante la inoculación permitiría ofrecer al ganado un alimento de gran calidad biológica logrando altos rendimientos de nitrógeno y proteína. Sukkasame y Phaikaew (1998), demostraron que las hojas frescas de *D. virgatus* con 17,8 % de proteína cruda utilizadas como suplemento proteico en la dieta del ganado vacuno podrían incrementar la ganancia de peso vivo de los animales en engorde.

En la Tabla VI.3. se presentan los contenidos de proteína cruda (PC) e índice de efectividad de la inoculación (IEI) con las cepas de rizobios nativas e introducida CB3126 de plantas de *D. virgatus* cv Marc en condiciones de campo. En la presente experiencia, el contenido promedio de PC en la materia seca de *D. virgatus* mostró valores de 17,1 % y 21,8 %, para las plantas inoculadas con las cepas 10L11.4 y 3L6.3 respectivamente. Zamora Natera *et al.*, (2002) en condiciones de cultivo a campo en el Estado de Nuevo León, México, obtuvieron valores de PC promedio de 20 % en el forraje seco de *D. virgatus* var. *depressus*. Investigaciones realizadas sobre el valor nutritivo de los tres cultivares comerciales de *Desmanthus* (cvs. Marc, Bayamo y Uman) y de la nueva variedad ProgardesTM mostraron contenidos de PC para la planta entera de 10,5 % a 15,5 %, mientras que el mismo parámetro en hojas presentó un promedio de 20,2 % a 22,4 % y en tallos de 7,1 % a 11,9 % (Jones *et al.*, 2000, Pengelly *et al.*, 2006; Gardiner *et al.*, 2013).

Tabla VI.3: Contenidos de proteína cruda e índice de efectividad de la inoculación con cepas de rizobios nativas e introducida CB3126 de *D. virgatus* cv Marc en condiciones de campo.

| Tratamientos (ensayo a campo)¹ | PC² (%) | IEI³ (%) |
|--|---------------------------|----------------------------|
| T | 15,5 | - |
| T 10L11.4 | 17,1 | 68,0 |
| T 8L12.1 | 13,7 | 52,5 |
| T 3L6.3 | 21,8 | 63,6 |
| T CB3126 | 15,9 | 46,9 |
| TN | 16,7 | - |

¹ Características de ensayo a campo se detallan en Materiales y Métodos sección 11.

(T: plantas sin inoculación y TN: plantas sin inoculación con el agregado de nitrógeno).

²PC: proteína cruda. ³IEI: Índice de efectividad de la inoculación, según (CIAT, 1988).

En comparación con otras leguminosas forrajeras, el contenido de PC en el forraje seco de *D. virgatus* fue superior al registrado en especies del género *Stylosanthes* (12 a 16%), pero similar al informado en *M. sativa* y *L. leucocephala* (promedios de 20 % a 22 %) (McDowell *et al.*, 1974; García *et al.*, 1996; Cruz Vázquez *et al.*, 2000).

El índice de respuesta al nitrógeno (IRN) de las plantas de *D. virgatus* cv Marc evaluadas en esta experiencia presentó un valor de 65, evidenciando que las cepas de rizobios existentes de forma natural en el suelo no presentaron una acción efectiva en el proceso simbiótico. Tang *et al.*, (1994) obtuvieron un valor de 41 para el IRN de plantas de *D. virgatus* fertilizadas con 150 Kg de N/ha en un suelo ferralítico de Cuba.

El efecto de los tratamientos de inoculación en el rendimiento de N fue evaluado mediante el IEI, que permitió valorar la efectividad relativa de una cepa comparando su rendimiento de N con el del testigo no inoculado y también permitió comparar la efectividad de varias cepas o tratamientos de inoculación. Según se observan los IEI en la Tabla VI.3., las inoculaciones con las cepas de rizobios nativas e introducida CB3126 presentaron un efecto positivo en la fijación biológica de nitrógeno con respecto a las plantas sin inocular. En una misma leguminosa, un IEI igual o cercano a IRN indica que el tratamiento inoculado es efectivo (CIAT, 1988).

La respuesta al nitrógeno obtenida mediante esta experiencia indicó que habría necesidad de efectuar la inoculación de las plantas de *D. virgatus* con microorganismos fijadores de nitrógeno bajo las condiciones edafoclimáticas de realización del ensayo en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNL). Asimismo, los resultados obtenidos permitieron distinguir cepas de rizobios nativas con alta efectividad simbiótica para las plantas de *D. virgatus*.

VI.3. Conclusiones.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este capítulo, se comprobó que las cepas de rizobios nativas inoculadas en las semillas de *D. virgatus* promovieron un mejor comportamiento agronómico, enfatizando la importancia de la inoculación para lograr un establecimiento exitoso y crecimiento inicial adecuado de las plántulas de *D. virgatus* en condiciones reales de campo.

El aislamiento, selección y utilización de cepas nativas de rizobios recuperadas de suelos donde se pretenda introducir *D. virgatus* podría favorecer una mejor producción forrajera, ya que se observó un incremento significativo de la biomasa aérea de las plantas inoculadas con rizobios locales en comparación con la cepa introducida CB3126.

Las cepas nativas 3L6.3, 8L12.1 y 10L11.4 obtenidas en este trabajo de tesis promovieron importantes efectos sobre el incremento de materia seca y fijación de nitrógeno en las plantas de *D. virgatus*, lo cual indicaría la gran influencia que presentaron las condiciones ambientales y el genotipo de la planta huésped. Bajo las condiciones edafoclimáticas de realización del ensayo a campo, la calidad de la simbiosis estimada a través del peso seco y contenido de N de las plantas indicó que el aislamiento local 10L11.4 podría ser un inoculante más eficiente para *D. virgatus* cv Marc que la cepa CB3126. Si bien, mediante la inoculación de las plantas de *Desmanthus* con la cepa 10L11.4 y la fertilización química se obtuvieron rendimientos de forraje similares, desde un punto de vista productivo sería preferible la primera opción. Esto es debido al elevado precio de los fertilizantes nitrogenados por el gran consumo energético del proceso de síntesis, además de la posible contaminación de las aguas con nitratos y sus derivados, con consecuencias negativas en el medio ambiente y la salud.

En diferentes condiciones edafoclimáticas de implantación, se sugiere realizar nuevas evaluaciones de la performance simbiótica de los aislamientos nativos, que podrían mostrar un efecto superior al de las cepas introducidas por presentar una mejor adaptación a las condiciones ecológicas del lugar.

Conclusiones Generales

Una de las estrategias utilizadas para incrementar la FBN es el aislamiento y la selección de cepas de rizobios y la posibilidad de introducir estos microorganismos en el suelo a través de la inoculación. Desde un punto de vista agronómico, la selección de cepas de rizobios eficientes, tolerantes a situaciones de estrés y con una adecuada supervivencia en el suelo y en las semillas constituyen la base para la producción de inoculantes microbianos que estimulen la producción vegetal.

La base sobre la que he desarrollado este trabajo de tesis ha sido la caracterización de las poblaciones de rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos argentinos y el análisis de su interacción simbiótica con la planta.

¿Por qué enfocamos nuestro estudio en el macrosimbionte *D. virgatus*?

En Argentina, las pasturas forrajeras cultivadas son el sustento fundamental de los sistemas ganaderos tradicionales. El incremento de las zonas agrícolas cultivables ha impulsado a estos sistemas a desplazarse hacia áreas menos productivas, de tipo marginal y con diversos problemas, en donde las especies leguminosas forrajeras disponibles y adaptadas a esas condiciones son escasas. La implantación de pasturas en zonas cada vez más marginales, afectadas no sólo por la escasez de precipitaciones sino por la salinidad y las elevadas temperaturas, es uno de los principales desafíos que debe afrontar el sector ganadero. En este contexto, una alternativa para mejorar la producción agropecuaria es la introducción a cultivo de leguminosas con reconocido potencial forrajero y adaptadas a nuestras condiciones edafoclimáticas, siendo un ejemplo de ellas el complejo *D. virgatus* de amplia distribución en el centro y norte de nuestro país.

La información disponible indica que el potencial agronómico de las especies de *Desmanthus* en relación a su adaptación al suelo y clima, producción de biomasa y calidad de forraje ha sido reconocido en diferentes países, según se ha descrito en la Introducción General de la presente tesis. A pesar de estos antecedentes son escasos los estudios acerca de estas especies en la República Argentina. En el año 2004, con el objetivo de lograr la incorporación y desarrollo de nuevas alternativas forrajeras, en la Facultad de Ciencias Agrarias (UNL) comenzó un programa de colección y caracterización de recursos forrajeros nativos, en particular de especies del género *Desmanthus*. El

presente trabajo de tesis se inició a través de la colección de semillas, plantas vivas, nódulos y muestras de suelos de diez poblaciones correspondientes a las especies nativas que integran el complejo *D. virgatus* (*sensu lato*) en Argentina.

Características feno-genotípicas de las poblaciones de rizobios noduladores del complejo D. virgatus presentes en suelos del centro y norte de Argentina.

En el Capítulo II he presentado la construcción y establecimiento de una vasta colección de rizobios noduladores de las especies *D. acuminatus*, *D. paspalaceus* y *D. virgatus* (*sensu estricto*) recuperados de suelos de las provincias de Santa Fe, Chaco, Santiago del Estero, Entre Ríos, Corrientes, Misiones, Jujuy y Salta. Las características edafoclimáticas de los diferentes sitios de colecta de las plantas mostraron que las poblaciones del complejo *D. virgatus* habitan naturalmente en zonas de climas cálidos tropicales y subtropicales, como así también en zonas templadas y húmedas, y en suelos con características edáficas muy variadas y de naturaleza química diferentes, según se ha descrito en el Capítulo I. Como se puede apreciar, las plantas del género *Desmanthus* mostraron un amplio rango de adaptación a diferentes zonas ecológicas del centro y norte de nuestro país. Sin embargo, un muy bajo número de nódulos de tamaño pequeño y color marrón oscuro pudo ser recuperado de las plantas del complejo *D. virgatus* en sus ambientes de origen. Es interesante destacar que el 100% de las plantas de las distintas especies del complejo presentaron estructuras nodulares en sus raíces al cultivarlas con sus diferentes suelos de procedencia en cámaras de crecimiento. Dichos nódulos indicaron la presencia en el suelo de cepas de rizobios con capacidad de nodular las plantas de *D. acuminatus*, *D. paspalaceus* y *D. virgatus* (*sensu estricto*). A partir de los nódulos obtenidos, se ha construido una colección de más de 170 rizobios simbiotes del complejo *D. virgatus*, que en su mayoría fueron recuperados de los suelos de origen en condiciones de crecimiento controlado. Esta situación sugiere que las condiciones a campo fueron desfavorables para el desarrollo de la simbiosis rizobio-*Desmanthus* en los diferentes sitios de colecta del centro y norte argentino.

La caracterización fenotípica de los simbiotes del complejo *D. virgatus* permitió reconocer rizobios de crecimiento rápido que mostraron un desarrollo óptimo en un

amplio rango de pHs desde ácidos hasta alcalinos, mayoritariamente a temperaturas entre 28 y 35°C, y en condiciones de salinidad de entre 0,5% y 1% (p/v) de NaCl. Los resultados presentados en el desarrollo del Capítulo III evidencian que los aislamientos noduladores de las especies del complejo presentaron una marcada diversidad en relación a la capacidad de crecimiento en diferentes condiciones de estreses abióticos. Es interesante destacar que en este trabajo se han hallado rizobios con capacidad de crecimiento a niveles de pH 4 y/o pH 9, a temperatura extrema de 40°C y en 2% (p/v) de NaCl (Tabla III.3. Capítulo III). Este grupo de aislamientos de la colección presentó resistencias marcadas a distintas combinaciones de condiciones de estreses abióticos frecuentemente presentes en los sitios del centro y norte de nuestro país en los que habitan las plantas del complejo *D. virgatus*.

Posteriormente, el análisis del germoplasma asociado al complejo *D. virgatus* evidenció una marcada diversidad en los simbioses locales, con variaciones en el grado de dicha diversidad que dependieron del sitio de origen de los mismos, según se muestra en los perfiles de amplificación de ADN genómico presentados en el desarrollo del Capítulo IV. La amplia diversidad genética observada en los aislamientos evidencia poblaciones de rizobios simbioses de *Desmanthus* spp. muy complejas, y pone de manifiesto la dificultad de predecir la interacción de los distintos genotipos con la planta hospedadora y con el ambiente.

En particular, el análisis del germoplasma asociado a *D. paspalaceus* recuperado de suelos de la localidad de General Obligado Santa Fe, mostró, en concordancia con los análisis fenotípicos y de tolerancia a distintas condiciones de estreses abióticos, una marcada diversidad entre los aislamientos. El análisis filogenético de los rizobios simbioses realizado a partir de la secuenciación parcial del ADNr 16S, reveló la presencia de rizobios y mesorizobios. En dichos simbioses se observó además la presencia de al menos dos tipos bien diferenciados de genes *nodC*. Es interesante destacar la observación de variantes *nodC* en los aislamientos *Mesorhizobium* sp. 10L4.2 y 10L5.3 que no exhibieron relación preferencial con ninguna de las variantes *nodC* descritas actualmente. Además, una variante alélica diferente es la del gen *nodC* de la cepa 10L11.4 *Rhizobium* sp que no pudo ser amplificado y deberá ser motivo de un análisis posterior. A partir de estas evidencias, será importante evaluar si dichos simbioses con genes de

nodulación diferentes producen una misma familia de moléculas señal, o alternativamente, familias distintas de factores de nodulación pero todas simbióticamente activas sobre *Desmanthus*. Una secuenciación más profunda de los grupos *nod* y una elucidación estructural de los factores Nod permitirá lograr una mayor comprensión sobre la señalización temprana de la relación simbiótica rizobios-*Desmanthus*.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis muestran por primera vez para suelos de Argentina las características de diversidad feno-genotípica de los rizobios noduladores del complejo *D. virgatus*. Sobre la base de las observaciones y consideraciones precedentes, la colección de rizobios que hemos obtenido y caracterizado representa un recurso muy valioso para ser explorado de modo sistémico en programas de selección de rizobios inoculantes de *Desmanthus*.

Características simbióticas y selección de cepas inoculantes para ser utilizadas en suelos de cultivo de nuestro país.

Los ensayos de inoculación de plantas realizados en cámara de crecimiento de cultivo presentados en el desarrollo del Capítulo V evidenciaron que en suelos de nuestro país se hallan poblaciones de rizobios con una amplia variación en términos de efectividad simbiótica para el género *Desmanthus*. Los resultados obtenidos mostraron que rizobios noduladores del complejo *D. virgatus* recuperados de suelos de tres provincias fitogeográficas de Argentina presentaron muy buena capacidad potencial de FBN y competencia por el nicho simbiótico. Es interesante destacar el comportamiento de las cepas termotolerantes 10L11.4 y 8L12.1 que establecieron una simbiosis de alta eficiencia en fijación de nitrógeno y además presentaron una alta competitividad. Asimismo, hemos demostrado un efecto favorable sobre el crecimiento de la raíz por los rizobios inoculados que podría favorecer la absorción de nutrientes y agua a través de la generación de un mayor desarrollo radical. A partir de estas evidencias será importante evaluar si el comportamiento de estos rizobios a campo refleja la misma tendencia de incremento del sistema radical que hemos observado en el laboratorio.

En la evaluación del comportamiento y adaptación al medio ambiente real de las cepas destacadas por su alta eficiencia en fijación de nitrógeno se demostró un incremento significativo de la biomasa aérea de las plantas inoculadas con rizobios locales en comparación con la cepa introducida CB3126 recomendada como inoculante.

En este trabajo de tesis hemos puesto en evidencia en ensayos de laboratorio y de campo las muy buenas características simbióticas de la cepa termotolerante 10L11.4. La calidad de la simbiosis estimada a través del peso seco y contenido de N de las plantas permitió seleccionar el aislamiento local 10L11.4 *Rhizobium* sp como un candidato adecuado para una evaluación de campo en diferentes condiciones edafoclimáticas de nuestro país.

Los resultados presentados demostraron que las cepas de rizobios locales inoculadas en las semillas de *D. virgatus* promovieron un mejor comportamiento agronómico, enfatizando la importancia de la inoculación para lograr un establecimiento exitoso y crecimiento inicial adecuado de las plántulas de *D. virgatus* en condiciones reales de campo.

La generación de estrategias de desarrollo sustentable para nuestro país requiere el diseño y elaboración de inoculantes que permitan cubrir diferentes carencias nutricionales del suelo y la adaptación y supervivencia de las cepas bacterianas bajo diferentes esquemas de prácticas agropecuarias. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que existe un amplio horizonte para incrementar significativamente la fijación de nitrógeno en simbiosis con el complejo *D. virgatus* mediante la selección de cepas de rizobios eficientes y adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de nuestro país.

Bibliografía

- Aarons, S.R. y Graham, P.H. (1991) *Response of Rhizobium leguminosarum bv phaseoli to acidity*. Plant Soil. 134: 145–151.
- Achouak, W.; Christen, R.; Barakat, M.; Marlet, M.H. y Heulint, T. (1999) *Burkholderia caribensis sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 49: 787-749.
- Adjei, M. B. y Pitman, W.D. (1993) *Response of Desmanthus to clipping on a phosphatic clay mine-spoil*. Trop. Grasslands 27:94-99.
- Aguilar, M.M.; Ashby, A.M.; Richards, J.M.; Loake, G.J.; Watson, M.D. y Shaw, C.H. (1988) *Chemotaxis of Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli towards Flavonoid Inducers of the Symbiotic Nodulation Genes*. J. Gen. Microbiol. 134: 2741-2746.
- Albareda, M.; Dardanelli, M.S.; Sousa, C.; Megias, M.; Temprano, F. y Rodriguez-Navarro, D.N. (2006) *Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots*. FEMS Microbiol. Lett. 259: 67-73.
- Allen, O.N. y Allen. E.K. (1981) *The Leguminosae: a source book of characteristics, uses, and nodulation*. (Ed. Univ. Wisconsin Press, Madison) Wisconsin. EE.UU. 812 pp.
- Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J. y Zhang, Z. (1997) *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.
- Amarger, N. (2001) *Rhizobia in the field*. Adv. Agron. 73: 109-168.
- Amarger, N.; Macheret, V. y Laguerre, G. (1997) *Rhizobium gallicum sp. nov. and Rhizobium giardinii sp. nov., from Phaseolus vulgaris nodules*. Int. J. Syst. Evol. Microbio. 47: 996-1006.
- Amor, B.B.; Shaw, S.L.; Oldroyd, G.E.; Maillet, F.; Penmetsa, R.V.; Cook, D.; Long, S.R.; Denarie, J. y Gough, C. (2003) *The NFP locus of Medicago truncatula controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation*. Plant J. 34: 495-506.
- Andrade, G.M.; Calderón de Rzedowski, G.; Camargo-Ricalde, S.L.; Grether, R.; Hernández, H.M.; Martínez-Bernal, A.; Rico, L.; Rzedowski, J. y Sousa M.S. (2007) *Familia Leguminosae subfamilia Mimosoideae*. En: *Flora del Bajío y regiones adyacentes*. (Eds. Rzedowski, J. y Calderón de Rzedowski, G.) Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío, CONACYT y CONABIO. Pátzcuaro, Michoacán, México. 150: 1-230 pp.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990) *Official Methods of Analysis of the AOAC*. (15th Ed. AOAC) Washington, D.C.
- Appleby, C.A. (1984) *Leghemoglobin and Rhizobium respiration*. Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 443-478.
- Arayankoon, T.; Schomberg, H.H. y Weaver, W.R. (1990) *Nodulation and N₂ fixation of guar at high root temperature*. Plant Soil. 126: 209-213.
- Armstrong, R.D.; McCosker, K.; Johnson, S.B.; Walsh, K.B.; Millar, G.; Kuskopf, B.; Standley, J. y Probert, M.E. (1999) *Legume and opportunity cropping systems in central Queensland. 1. Legume growth, nitrogen fixation, and water use*. Aust. J. Agr. Res. 50: 909-924.
- Ausmees, N.; Jonsson, H.; Høglund, S.; Ljunggren, H. y Lindberg, M. (1999) *Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*. Microbiology. 145: 1253-1262.

- Ausmees, N.; Jacobsson, K. y Lindberg, M. (2001) *A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of Rhizobium-adhering proteins (Rap) in Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*. Microbiology, 147: 549-559.
- Ayarza, M.A. (1991) *Efecto de las Propiedades Químicas de los Suelos Ácidos en el Establecimiento de las Especies Forrajeras*. En: *Establecimiento y Renovación de Pasturas. Conceptos, experiencias y enfoque de la investigación* (Eds. Lascano, C.E. y Spain, J.M.) Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. pp. 161-185.
- Azevedo, H.; Lopes, F.M.; Silla, P.R. y Hungria, M. (2015) *A database for the taxonomic and phylogenetic identification of the genus Bradyrhizobium using multilocus sequence analysis*. BMC Genomics, 16 (Suppl 5), S10.
- Bahnisch, G.A.; Date, R.A.; Brandon, N.J. y Pittaway, P. (1998) *Growth responses of Desmanthus virgatus to inoculation with Rhizobium strain CB3126 I. A pot trial with 8 clay soils from central and southern Queensland*. Trop. Grasslands, 32: 13-19.
- Bakhoun, N.; Le Roux, C.; Diouf, D.; Kane, A.; Ndoeye, F.; Fall, D.; Duponnois, R.; Noba, K.; Sylla, S.N. y Galiana, A. (2014) *Distribution and diversity of rhizobial populations associated with Acacia Senegal (L.) Willd. Provenances in Senegalese Arid and Semiarid Regions*. Open J. Forest 4: 136-143.
- Bala, A. y Giller, K.E. (2006) *Relationships between rhizobial diversity and host legume nodulation and nitrogen fixation in tropical ecosystems*. Nutr. Cycl. Agroecosys. 76: 319-330.
- Bala, A.; Murphy, P.J.; Osunde, A.O. y Giller, K.E. (2003a) *Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils*. Appl. Soil Ecol. 22: 211-223.
- Bala, A.; Murphy, P.J. y Giller, K.E. (2003b) *Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics*. Mol. Ecol. 12: 917-930.
- Ballard, R.A. y Charman, N. (2000) *Nodulation and growth of pasture legumes with naturalised soil rhizobia. 1. Annual Medicago spp*. Aust. J. Exp. Agr. 40: 939-948.
- Baraibar, A.; Frioni, L.; Guedes, M.E. y Ljunggren, H. (1999) *Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous Rhizobium loti population in Uruguay*. Pesqui. Agropecu. Bras. 34: 1011-1017.
- Barbour, W.M.; Hattermann, D.R. y Stacey, G. (1991) *Chemotaxis of Bradyrhizobium japonicum to soybean exudates*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2635-2639.
- Baruch, Z. y Fisher, M.J. (1991). *Factores climáticos y de competencia que afectan el desarrollo de la planta en el establecimiento de una pastura*. En: *Establecimiento y Renovación de Pasturas. Conceptos, experiencias y enfoque de la investigación* (Eds. Lascano, C.E. y Spain, J.M.) Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. pp. 103-142.
- Bauer, P.; Crespi, M.D.; Szecsi, J.; Allison, L.A.; Schultze, M.; Ratet, P.; Kondorosi, E. y Kondorosi, A. (1994) *Alfalfa Enod12 genes are differentially regulated during nodule development by Nod factors and Rhizobium invasion*. Plant Physiol. 105: 585-592.
- Bautista, V.V.; Monsalud, R.G. y Yokota, A. (2010) *Devosia yakushimensis sp. nov., isolated from root nodules of Pueraria lobata (Willd.) Ohwi*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 627-632.
- Becerra Stiefel, A.C.; Date, R.A. y Brandon, N.J. (1998) *Survival of rhizobia on seed of Desmanthus virgatus stored at different temperatures*. Trop. Grasslands, 32 (2): 28-33.
- Becker, A.; Berges, H.; Krol, E.; Bruand, C.; Ruberg, S.; Capela, D.; Lauber, E.; Meilhoc, E.; Ampe, F.; de Bruijn, F.J.; Fourment, J.; Francez-Charlot, A.; Kahn, D.; Kuster, H.; Liebe, C.; Puhler, A.;

- Weidner, S. y Batut, J. (2004) *Global changes in gene expression in Sinorhizobium meliloti 1021 under microoxic and symbiotic conditions*. Mol. Plant Microbe Interact. 17: 292-303.
- Bécquer, C.J. (2004) *Descripción y clasificación de rizobios: Enfoque histórico, métodos y tendencias actuales*. Rev. Biología. 18 (1): 9-29.
- Béna, G.; Lyet, A.; Huguet, T. y Olivieri, I. (2005) *Medicago – Sinorhizobium symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of Medicago*. J. Evolution. Biol. 18: 1547-1558.
- Berge, O.; Lodhi, A.; Brandelet, G.; Santaella, C. y Roncato, M.A. (2009) *Rhizobium alarii sp. nov., an exopolysaccharide producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 367-372.
- Beringer, J. (1974) *R factor transfer in Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 84: 188-189.
- Bernal, J. (2003) *Manual de nutrición y fertilización de pastos*. International Plant Nutrition Institute (IPNI). Quito, Ecuador. 100 pp.
- Beyhaut, E.; DeHaan, L.R.; Byun, J.L.; Sheaffer, C.C. y Graham, P.H. (2006a) *Response to inoculation in Illinois bundleflower*. Can. J. Plant. Sci. 86: 919-926.
- Beyhaut, E.; Tlustý, B.; van Berkum, P. y Graham, P.H. (2006b) *Rhizobium giardinii is the microsymbiont of Illinois bundleflower (Desmanthus illinoensis (Michx.) Macmillan) in midwestern prairies*. Can. J. Microbiol. 52: 903-907.
- Bhardwaj, K.K.R. (1975) *Survival and symbiotic characteristics of Rhizobium in saline-alkaline soils*. Plant Soil. 134: 145-151.
- Boiero, L.; Perrig, D.; Masciarelli, O.; Penna, C. Cassán, F y Luna, V. (2007) *Phytohormone production by three strains of Bradyrhizobium japonicum and possible physiological and technological implications*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74: 874-880.
- Boschma, S.P. y Harris C.A. (2014) *Companion legumes*. En: Tropical Perennial Grasses for Northern Inland New South Wales—Second Edition. Future Farm Industries Cooperative Research Centre: Perth Australia. pp. 56-63.
- Bowen, G.D. y Rovira, A.D. (1999) *The rhizosphere and its management to improve plant growth*. Adv. Agron. 66: 1-102.
- Bradic, M.; Sikora, S.; Redzepovic, S. y Stafa, Z. (2003) *Genetic identification and symbiotic efficiency of an indigenous Sinorhizobium meliloti field population*. Food Technol. Biotechnol. 41(1): 69-75.
- Brandon, N.J. y Shelton, H.M. (1997) *Factors affecting the early growth of Leucaena Leucocephala 1. Effects of nitrogen, phosphorus, lime and irrigation at three sites in south-east Queensland*. Aust. J. Exp. Agr. 37: 27-34.
- Brandon, N.J. y Jones, R.M. (1998) *The effect of sowing depth and duration of watering on emergence of tropical legumes in clay soil in growth cabinets*. Trop. Grasslands, 32 (2): 81-88.
- Brandon, N.J.; Date, R.A.; Clem, R.L.; Roberson, B.A. y Graham, T.W.G. (1998) *Growth responses of Desmanthus virgatus to inoculation with Rhizobium strain CB3126 II. A field trial at 4 sites in south-east Queensland*. Trop. Grasslands 32: 20-27.
- Bray, R.H. y Kurtz, L.T. (1945) *Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils*. Soils Sc. 59: 39-45.

- Brechenmacher, L.; Kim, M.Y.; Benitez, M.; Li, M.; Joshi, T.; Calla, B.; Lee, M.P.; Libault, M.; Vodkin, L.O.; Lee, S.H.; Clough, S.J. y Stacey, G. (2008). *Transcription profiling of soybean nodulation by Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant Microbe Interact. 21:631-645.
- Brockwell, J.; Hely, F.W. y Neal-Smith, C.A. (1966) *Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of Lotus hispidus*. Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb. 6: 365–370.
- Brockwell, J.; Pilka, A. y Holliday R.A. (1991) *Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally occurring Rhizobium meliloti in non-cultivated soils in central New South Wales*. Aust. J. Exp. Agr. 31: 211–219.
- Bromfield, E.S.P. y Barran, L.R. (1990) *Promiscuous nodulation of Phaseolus vulgaris, Macroptilium atropurpureum, and Leucaena leucocephala by indigenous Rhizobium meliloti*. Can. J. Microbiol. 36: 369–372.
- Bromfield, E.S.P.; Barran, L.R y Wheatcroft, R. (1995) *Relative genetic structure of population of Rhizobium meliloti isolated directly from soil and from nodules of alfalfa (Medicago sativa) and sweet clover (Melilotus alba)*. Mol. Ecol. 4: 183-188.
- Buakeeree, K. (2002) *The study of yield and nutritive value of hedge lucerne (Desmanthus virgatus) and utilization of hedge lucerne meal as protein supplement in layer diets*. Thesis Ph.D. Suranaree University of Technology, Thailand. pp. 115.
- Burkart, A. 1952. *Las Leguminosas argentinas, silvestres y cultivadas*. (Ed. ACME). Buenos Aires, Argentina. pp. 569.
- Burkart, A. 1987. *Leguminosae*. En: *Flora Ilustrada de Entre Ríos*. Colecc. Ci. Inst. Nac. Tec. Agropecu. (Eds. Troncoso, N.S. y Bacigalupo, N.M.). 6 (3): 442-738.
- Burrows, D.M. y Porter, F.J. (1993) *Regeneration and survival of Desmanthus virgatus 78382 in grazed and ungrazed pastures*. Trop. Grasslands 23:100-107.
- Burt, R.F. (1993) *Demanthus: A tropical and subtropical forage legume*. Part. I General Review Herbage Abstracts. 63: 401-413.
- Byun, J.; Sheaffer, C.C; Russelle, M.P.; Ehlke, N.J.; Wyse, D.L. y Graham, P.H. (2004) *Dinitrogen Fixation in Illinois Bundleflower*. Crop Sci. 44: 493–500.
- Cabrera, A.L. (1994) *Regiones fitogeográficas argentinas*. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo II, fascículo 1. (Ed. ACME). Bs As. pp. 1- 85.
- Caetano-Anolles, G. y Bauer, W.D. (1988) *Feedback regulation of nodule formation in alfalfa*. Planta 175:546-557.
- Caetano-Anollés, G. y Gresshoff, P.M. (1990) *Early induction of feedback regulatory responses governing nodulation in soybean*. Plant Sci. 71:69-81.
- Caetano-Anolles, G. y Gresshoff, P.M. (1991) *Plant genetic control of nodulation*. Annu. Rev. Microbiol. 45: 345–382.
- Caetano-Anolles, G.; Crist-Estes, D.K. y Bauer, W.D. (1988) *Chemotaxis of Rhizobium meliloti to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes*. J. Bacteriol. 170: 3164-3169.
- Caetano-Anollés, G.; Wall, L.G.; De Micheli, A. T.; Macchi, E.M.; Bauer, W.D. y Favelukes, G. (1988). *Role of Motility and Chemotaxis in Efficiency of Nodulation by Rhizobium meliloti*. Plant Physiol. 86: 1228-1235.

- Caetano-Anollés, G.; Lagares, A. y Bauer, W.D. (1990) *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide mutants elicit feedback regulation of nodule formation in alfalfa. *Plant Physiol.* 91:368-374.
- Caetano-Anollés, G.; Bassam, B.J. y Gresshoff, P.M. (1991) *DNA Amplification Fingerprinting: A Strategy for Genome Analysis*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9 (4): 294-307.
- Cameron, D.G. (1980) *Criteria of merit for pasture species with particular reference to legumes*. *Trop. Grasslands* 14 (3): 130-135.
- Cardoso, J.D.; Hungria, M. y Andrade, D.S. (2012) *Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (5): 2035-2049.
- Carelli, M.; Gnocchi, S.; Fancelli, S.; Mengoni, A.; Paffetti, D.; Scotti, C. y Bazzicalupo, M. (2000) *Genetic diversity and dynamics of Sinorhizobium meliloti* nodulating different alfalfa cultivars in italian soils. *Appl. Environm. Microbiol.* 66: 4785-4789.
- Carranca, C. (2013) *Legumes: Properties and symbiosis*. En: *Symbiosis: Evolution, Biology and Ecological Effects* (Eds Camisão, A.H. y Pedroso, C.C.). Nova Science Publishers, New York. pp. 67-94.
- Casida, L.E.J. (1982) *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: A bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 339-345.
- Catroux, G.; Hartmann, A. y Revellin, C. (2001) *Trends in rhizobial inoculant production and use*. *Plant Soil*, 230: 21-30.
- Chahboune, R.; Carro, L.; Peix, A.; Barrijal, S.; Velázquez, E. y Bedmar, E.J. (2011) *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 6: 2922-2927.
- Chahboune, R.; Carro, L.; Peix, A.; Ramírez-Bahena, M.H., Barrijal, S.; Velázquez, E. y Bedmar, E.J. (2012) *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Syst. Appl. Microbiol.* 35: 302-305.
- Chandra, R. y Pareek, R.P. (1987) *Effect of inoculum rate on the performance of chickpea (Cicer arietinum L.) Rhizobium strains in the field*. *Biol. Fertil. Soils.* 5: 83-87.
- Chang, Y.L.; Wang, J.Y.; Wang, E.T.; Liu, H.C.; Sui, X.H. y Chen, W.X. (2011) *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 2496-2502.
- Chen, M. y Alexander, M. (1973) *Survival of soil bacteria during prolonged desiccation*. *Soil Biol. Biochem.* 5: 213-221.
- Chen, W.M.; Laevens, S.; Lee, T.M.; Coenye, T.; De Vos, P.; Mergeay, M. y Vandamme, P. (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1729-1735.
- Chen, W.M.; James, E.K.; Coenye, T.; Chou, J. H.; Barrios, E.; de Faria, S.M.; Elliott, G.N.; Sheu, S.Y.; Sprent, J.I. y Vandamme, P. (2006) *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1847-1851.
- Chen, W.M.; De Faria, S.M.; James, E.K.; Elliot, G.N.; Lin, K.Y.; Chou, J.H.; Sheu, S. Y.; Cnockaert, M.; Sprent, J.I. y Vandamme, P. (2007) *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root

- nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. Int. J. Syst. Bacteriol. 57: 1055-1059.
- Chen, W.M.; De Faria, S.M.; Chou, J.; James, E.K.; Elliot, G.N.; Sprent, J.I.; Bontemps, C.; Young, J.P.W. y Vandamme, P. (2008) *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2174-2179.
- Chen, W.M.; Zhu, W.F.; Bontemps, C.; Young, J.P.W y Wei, G.M. (2010) *Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from wild *Alhagi sparsifolia* in north-western China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 958-962.
- Chen, W.M.; Zhu, W.F.; Bontemps, C.; Young, J.P.W y Wei, G.M. (2011) *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 574-579.
- Chen, W.X.; Yan, G.H. y Li, J.L. (1988) Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 38 (4): 392-397.
- Chen, W.X.; Li, G.S.; Qi, Y.L.; Wang, E.T.; Yuan, H.L. y Li, J.L. (1991) *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 275-280.
- Chen, W.X.; Wang, E.; Wang, S.; Li, Y.; Chen, X. y Li, Y. (1995) Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 153-159.
- Chen, W.X.; Tan, Z.Y.; Gao, J.L.; Li, Y. y Wang, E.T. (1997) *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 870-873.
- Chestnutt, D.B.M. y Lowe, J. (1970) *White clover research* (Ed. Lowe, J.) Occasional Symp. N°6. British Grassl. Soc. Hurley, Maidenhead, UK. pp. 121-213.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (1988) *Simbiosis leguminosa-rizobio. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico*. (Ed. Proyecto CIAT-UNDP). Cali, Colombia. 178 pp.
- Clem, R.L. y Hall, T.J. (1994) Persistence and productivity of tropical pasture legumes on three cracking clay soils (Vertisols) in north-eastern Queensland. Aust. J. Exp. Agr. 34: 161-171.
- Cook, B.G.; Graham, T.W.G.; Clem, R. R. I.; Hall, T. J. y Quirk, M.P. (1993) Evaluation and development of *Desmanthus virgatus* on medium to heavy textured soils in Queensland, Australia. Procc. XVII Int. Grasslands Congress. Palmerson North and Rockhampson. pp. 2148-2149.
- Cook, B.G.; Pengelly, B.C.; Brown, S.D.; Donnelly, J.L.; Eagles, D.A.; Franco, M. A.; Hanson, J.; Mullen, B.F.; Partridge, I.J.; Peters, M. y Schultze-Kraft, R. (2005) *Tropical forages: an interactive selection tool*. CSIRO, DPIF (Qld), CIAT and ILRI, Brisbane, Australia. <http://www.tropicalforages.info>.
- Cooper, C.S. (1977) Growth of the legume seedling. Adv. Agron. 29: 119-139.
- Cooper, J.E. (1982) Acid production, acid tolerance and growth rate of *Lotus* rhizobia in laboratory media. Soil Biol. Biochem. 14: 127-131.
- Cooper, J.E. (2007) Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. J. Appl. Microbiol. 103: 1355-1365.

- Correa, O.S. y Barneix, A.J. (1997) *Cellular mechanisms of pH tolerance in Rhizobium loti*. World J. Microbiol. Biotech. 13: 153-157.
- Corvalán, D.; Dubois, M.; Medana, M.; Peticari, A.; Racca, R. y Ruiz, O.A. (2007) *Situación actual y perspectivas del mercado de semillas y biofertilizantes en la Argentina*. En: *Biofertilizantes en Iberoamerica: Una visión técnica, científica y empresarial*. (Eds. Izaguirre-Mayoral, M.L.; Labandera, C. y Sanjuan, J.) Red BioFAG-CyTED. Montevideo, República Oriental del Uruguay. pp. 4-15.
- Cruz-Vázquez, C.; Fernández Ruvalcaba, M.; Solano Vergara, J. y Ruiz Cerda, E. (2000) *Comportamiento agronómico de Stylosanthes humilis y Stylosanthes hamata en condiciones de trópico subhúmedo*. Técnica Pecuaria en México. 38 (1): 43-49.
- Cuadrado, B.; Rubio, G. y Santos, W. (2009) *Caracterización de cepas de Rhizobium y Bradyrhizobium (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijol caupi (Vigna unguiculata) como potenciales bioinóculos*. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. (38) 1: 78-104.
- D'Haese, W. y Holsters, M. (2002) *Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development*. Glycobiology. 12: 79R-105R.
- Da Silva, K.; De Meyer, S.E.; Rouws, L.F.M.; Farias, E.N.C.; Dos Santos, M.A.O.; O'Hara, G.; Ardley, J.K.; Willems, A.; Pitard, R.M. y Zilli, J.E. (2014) *Bradyrhizobium ingae sp. nov., isolated from effective nodules of Inga laurina grown in Cerrado soil*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 3395-3401.
- Dall'Agnol, R.F.; Ribeiro, R.A.; Ormeno-Orrillo, E.; Rogel, M.A.; Delamuta, J.R.; Andrade, D.S.; Martínez-Romero, E. y Hungria, M. (2013) *Rhizobium freirei, a symbiont of Phaseolus vulgaris very effective in fixing nitrogen*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 4167-4173.
- Dall'Agnol, R.F.; Ribeiro, R.A.; Delamuta, J.R.; Ormeno-Orrillo, E.; Rogel, M.A.; Andrade, D.S.; Martínez-Romero, E. y Hungria, M. (2014) *Rhizobium paranaense sp. nov., an effective N₂-fixing symbiont of common bean (Phaseolus vulgaris L.) with broad geographical distribution in Brazil*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 3222-3229.
- Date, R.A. (1991) *Nitrogen fixation in Desmanthus: strain specificity of Rhizobium and responses to inoculation in acidic and alkaline soil*. Trop. Grasslands, 25: 47-55.
- Date, R.A. (1997) *The contribution of R & D on root-nodule bacteria to future cultivars of tropical forage legumes*. Trop. Grasslands, 31: 350-354.
- Date, R.A. (2000) *Inoculated legumes in cropping systems of the tropics*. Field Crop Res. 65: 123-136.
- Datta, C. y Basu, P.S. (2000) *Indole acetic acid production by a Rhizobium species from root nodules of a leguminous shrub, Cajanus cajan*. Microbiol. Res. 155: 123-127.
- Dazzo, F.B.; Truchet, G.L.; Hollingsworth, R.I.; Hrabak, E.M.; Pankratz, H.S.; Philip-Hollingsworth, S.; Salzwedel, J.L.; Chapman, K.; Appenzeller, L.; Squartini, A.; Gerhold, D. y Orgambide, G. (1991). *Rhizobium lipopolysaccharide modulates infection thread development in white clover root hairs*. J. Bacteriol. 173 (17):5371-5384.
- de Bruijn, F. (1992) *Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction to fingerprint the genomes of Rhizobium meliloti Isolates and other Soil Bacteria*. Appl. Environ. Microbiol. 58(7): 2180-2187.

- de la Garza-Requena, F. y Valdés, M. (2000) *Tamaño de la población microbiana del suelo y desarrollo inicial de Desmanthus virgatus (L.) Willd.* Agrobiencia. 34: 445-451.
- de Lajudie, P.; Willems, A.; Pot, B.; Dewettinck, D.; Maestrojuan, G.; Neyra, M.; Collins, M. D.; Dreyfus, B.; Kersters, K. y Gillis, M. (1994) *Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus Sinorhizobium and description of Sinorhizobium meliloti com. nov.; Sinorhizobium saheli sp. nov.; and Sinorhizobium teranga sp. nov.* Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 715-733.
- de Lajudie, P.; Laurent-Fulele, E.; Willems, A.; Torck, U.; Coopman, R.; Collins, M. D.; Kersters, K.; Dreyfus, B. y Gilles, M. (1998a) *Allorhizobium undicola gen. nov., sp. nov. nitrogenfixing bacteria that efficiently nodulate Neptunia natans in Senegal.* Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 1277-1290.
- de Lajudie, P.; Willems, A.; Nick, G.; Moreira, F.; Molouba, F.; Hoste, B.; Torck, U.; Neyra, M.; Collins, M. D.; Lindstrom, K.; Dreyfus, B. y Gillis, M. (1998b) *Characterization of tropical tree rhizobia and description of Mesorhizobium plurifarum sp. nov.* Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 369-382.
- de Meyer, S.E.; Cnockaert, M.; Ardley, J.K.; Maker, G.; Yates, R.; Howieson, J.G. y Vandamme, P. (2013a) *Burkholderia sprentiae sp. nov., isolated from Lebeckia ambigua root nodules.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 3950-3957.
- de Meyer, S.E.; Cnockaert, M.; Ardley, J.K.; Trengove, R.D.; Garau, G.; Howieson, J.G. y Vandamme, P. (2013b) *Burkholderia rhynchosiae sp. nov., isolated from Rhynchosia ferulifolia root nodules.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 3944-3949.
- de Meyer, S.E.; Cnockaert, M.; Ardley, J. K.; Van Wyk, B.E.; Vandamme, P.A. y Howieson, J. G. (2014) *Burkholderia dilworthii sp. nov., isolated from Lebeckia ambigua root nodules.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 1090-1095.
- de Oliveira, W. S.; Meinhardt, L.W.; Sessitsch, A. y Tsai, S.M. (1998) *Analysis of Phaseolus-Rhizobium interactions in a subsistence farming system.* Plant Soil, 204:107-115.
- Degefu, T.; Wolde-meskel, E. y Frostegård, Å. (2012) *Phylogenetic multilocus sequence analysis identifies seven novel Ensifer genospecies isolated from a less-well-explored biogeographical region in East Africa.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 2286-2295.
- Degefu, T.; Wolde-Meskel, E.; Liu, B.; Cleenwerck, I.; Willems, A. y Frostegård, A. (2013) *Mesorhizobium shonense sp. nov., Mesorhizobium hawassense sp. nov. and Mesorhizobium abyssinicae sp. nov., isolated from root nodules of different agroforestry legume trees.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 1746-1753.
- Del Pozo Rodríguez, P.P. (2002) *Bases ecofisiológicas para el manejo de los pastos tropicales.* PASTOS, XXXII. 2: 109-137.
- Del Papa, M.F. (2001) *Caracterización simbiótica y molecular de rizobios noduladores de alfalfa aislados de suelos ácidos de Argentina.* Tesis doctoral. Fac. Ciencias Exactas. U.N.L.P. 174 pp.
- Delamuta, J.R.M.; Ribeiro, R.A.; Menna, P.; Bangel, E.V. y Hungria, M. (2012) *Multilocus sequence analysis (MLSA) of Bradyrhizobium strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria.* Braz. J. Microbiol. 43: 69-710.
- Delamuta, J.R.M.; Ribeiro, R.A.; Ormeño-Orrillo, E.; Melo, I.S.; Martínez-Romero, E. y Hungria, M. (2013). *Polyphasic evidence supporting the reclassification of Bradyrhizobium japonicum*

- group la strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 3342-3351.
- Demezas, D. H.; Reardon, T. B.; Watson, J.M. y Gibson, A.H. (1991) *Genetic diversity among Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3489-3495.
- Demezas, D.H.; Reardon, T.B.; Strain, S.R.; Watson, J. M. y Gibson, A.H. (1995) *Diversity and genetic structure of a natural population of Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolated from *Trifolium subterraneum* L. *Mol. Ecol.* 4:209-220.
- Dénarié, J.; Debelle, F. y Prome, J.C. (1996) Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 503-535.
- Denison, R.F. y Kiers, K.T. (2004a) *Why are most rhizobia beneficial to their plant hosts, rather than parasitic?* *Microbes Infect.* 6: 1235-1239.
- Denison, R.F. y Kiers, K.T. (2004b) *Lifestyle alternatives for rhizobia: Mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis.* *FEMS Microbiol. Lett.* 237: 187-193.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. y Robledo, C.W. (2013). *InfoStat* versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Diouf, D.; Samba-Mbaye, R.; Lesueur, D.; Ba, A.T.; Dreyfus, B.; de Lajudie, P. y Neyra, M. (2007) *Genetic Diversity of Acacia seyal* Del. *Rhizobial Populations Indigenous to Senegalese Soils in Relation to Salinity and pH of the Sampling Sites.* *Microbiol. Ecol.* 54: 553-566.
- Djordjevic, M.A. (2004) *Sinorhizobium meliloti* metabolism in the root nodule: a proteomic perspective. *Proteomics.* 4: 1859-1872.
- Dovel, R.I.; Hussey, M.A. y Holt, E.C. (1990) *Establishment and survival of Illinois bundleflower interseeded into an established kleingrass pasture.* *J. Range Manage.* 43: 153–156.
- Downie, J.A. (1994) *Signalling strategies for nodulation of legumes by rhizobia.* *Trends Microbiol.* 2(9):318-324.
- Doyle, J.J. (1994) *Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origin of nodulation.* *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25: 325–349.
- Dreyfus, B.; Garcia, J.L. y Gillis, M. (1988) *Characterization of Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 89-98.
- Duno-de Stefano, R.; Can-Itza, L.L.; Rivera-Ruiz, A. y Calvo-Irabién, L.M. (2012) *Regionalización y relaciones biogeográficas de la Península de Yucatán con base en los patrones de distribución de la familia Leguminosae.* *Rev. Mex. Biodiv.* 83: 1053-1072.
- Durán, D.; Rey, L.; Mayo, J.; Zúñiga-Dávila, D.; Imperial, J.; Ruiz-Argäeso, T. S.; Martínez-Romero, E. y Ormeño-Orrillo, E. (2014) *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 2072-2078.
- Dutto, P. (2002) *Inoculación de leguminosas.* *Rev. Plan Agropecuario.* N° 102: 54-57.
- Dykhuizen, D.E. y L. Green, L. (1991) *Recombination in Escherichia coli and the definition of biological species.* *J. Bacteriol.* 173: 7257-7268.

- Eardly, B.D.; Materon, L.A.; Smith, N.H.; Johnson, D.A.; Rumbaugh, M.D. y Selander, R.K. (1990) *Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium Rhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 187-194.
- Eardly, B.D.; Wang, F.S.; Whittam, T.S. y Selander, R.K. (1995) *Species limits in Rhizobium populations that nodulate the common bean (Phaseolus vulgaris)*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 507-512.
- Eckhardt, M.M.; Baldwin, I.R. y Fred, E.B. (1931) *Studies on the root-nodule bacteria of Lupinus*. J. Bacteriol. 21: 273-285.
- Eckhardt, T. (1978) *A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria*. Plasmid. 1: 584-588.
- Elsheikh, E.A.E. (1998) *Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review*. Ann. Appl. Biol. 132:507-524.
- Esseling, J.J.; Lhuissier, F.G. y Emons, A.M. (2003) *Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application*. Plant Physiol. 132: 1982-1988.
- Fall, D.; Diouf, D.; Ourarhi, M.; Faye, A.; Abdelmounen, H.; Neyra, M.; Sylla, S.N. y El Idrissi, M.M. (2008) *Phenotypic and genotypic characteristics of Acacia Senegal (L.) Willd. root-nodulating bacteria isolated from soils in the dryland part of Senegal*. Lett. Appl. Microbiol. 47: 85-97.
- FAO (2010) Grassland Index. A searchable catalogue of grass and forage legumes. FAO. <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/data/pf000151.htm>.
- Faria, S.M. de; Franco, A.A.; Jesús, R.M. de; Menandro, M. de S.; Baitello, J.B.; Mucci, E.S.F.; Dobereiner, J. y Sprent J.I. (1984) *New nodulating legume trees from south East Brazil*. New Phytol. 98: 317-327.
- Faria, S.M. de; Lewis, G.P.; Sprent, J.I. y Sutherland, J.M. (1989) *Occurrence of nodulation in the Leguminosae*. New Phytol. 111: 607-619.
- Felsenstein, J. (1985) *Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap*. Evolution 39: 783-791.
- Fernández Cirelli, A. y Volpedo, A.V. (2002) *Las Tierras secas de Iberoamérica*. En: *El agua en Iberoamérica; De la escasez a la desertificación*. (Eds. Fernández Cirelli, A. y Abraham E.) CYTED XVII, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Buenos Aires, Argentina. pp. 11-26.
- Fischbach, J.A.; Peterson, P.R.; Ehlke, N.J.; Wyse, D.L. y Sheaffer, C.C. (2005) *Illinois bundleflower forage potential in the upper midwestern USA: II. Forage Quality*. Agron. J. 97: 895-903.
- Fischer, H.M. (1994) *Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia*. Microbiol. Rev. 58: 352-386.
- Fraysse, N.; Couderc, F. y Poinsot, V. (2003) *Surface polysaccharide involvement in establishing the Rhizobium-legume symbiosis*. Eur. J. Biochem. 270: 1365-1380.
- Frioni, L. (1999) *Procesos Microbianos*. (Ed. Fundación Univ. Nac. Río Cuarto) Córdoba. Argentina. 332 pp.
- Frioni, L. (2006) *Microbiología: básica, ambiental y agrícola*. (Ed. Univ. de la República). Uruguay. 464 pp.
- Fujishige, N.A.; Kapadia, N.N.; De Hoff, P.L. y Hirsch, A.M. (2006) *Investigations of Rhizobium biofilm formation*. FEMS Microbiol. Ecol. 56: 195-206.

- Gage, D.J. (2004) *Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68: 280-300.
- Gandee, C.M.; Harrison, S.P. y Davies, W.P. (1999) *Genetic characterization of naturally occurring Rhizobium meliloti populations and their potential to form effective symbioses with lucerne*. Lett. Appl. Microbiol. 28: 169-174.
- Gao, J.L.; Turner, S.L.; Kan, F.L.; Wang, E.T.; Tan, Z.Y.; Qiu, Y.H.; Terefework, Z.; Young, J.P.W.; Lindstrom, K. y Chen, W.X. (2004) *Mesorhizobium septentrionale sp. nov. and Mesorhizobium temperatum sp.nov. isolated from Astragalus adsurgens growing in the northern regions of China*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 5: 2003-2012.
- Garcia, G.W.; Ferguson, T.U.; Neckles, F.A. y Archibald, K.A.E. (1996) *The nutritive value and forage productivity of Leucaena leucocephala*. Anim. Feed Sci. Tech. 60: 29-41.
- Gardiner, C.P. y Burt, R.L. (1995) *Performance characteristics of Desmanthus virgatus in two contrasting tropical environments*. Trop. Grasslands, 29: 183-187.
- Gardiner, C.; Bieligi, L.; Schlink, A.; Coventry, R. y Waycott, M. (2004) *Desmanthus - a new pasture legume for the dry tropics*. Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia. http://www.regional.org.au/au/asa/2004/poster/5/2/573_gardiner.htm?print=1.
- Gardiner, C.; Kempe, N.; Hannah, I. y McDonald, J. (2013) *PROGARDES™: a legume for tropical/subtropical semi-arid clay soils*. Trop. Grasslands 1: 78-80.
- Garrity, G.M.; Bell, J.A. y Lilburn, T. (2005) *The revised road map to the manual*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Vol. 2. The Proteobacteria*. (Eds. Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley J.T. y Garrity G.M). Springer, New York. pp. 159-187.
- Gaunt, M.W.; Turner, S.L.; Rigottier-Gois, L.; Lloyd-Macgilp, S.A. y Young, J.P.W. (2001) *Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 2037-2048.
- Gaworzewska, E.T. y Carlile, M.J. (1982) *Positive chemotaxis of Rhizobium leguminosarum and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants*. J. Gen. Microbiol. 128: 1179-1188.
- Geniaux, F.; Flores, M.; Palacios, R. y Martínez-Romero, E. (1995) *Presence of Megaplasms in Rhizobium tropici and further evidence of differences between two R. tropici subtypes*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 392-394.
- GeolNTA (2015) Geoinformación del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Disponible en <http://geointa.inta.gov.ar/visor/>.
- Gevers, D.; Cohan, F.M.; Lawrence, J.G.; Spratt, B.G.; Coenye, T.; Feil, E.J.; Stackebrandt, E.; Van de Peer, Y.; Vandamme, P.; Thompson, F.L. y Swings, J. (2005) *Re-evaluating prokaryotic species*. Nature Reviews Microbiology. 3(9): 733-739.
- Ghosh, A.C. y Basu, P.S. (2000) *Growth behaviour and bioproduction of indole acetic acid by a Rhizobium sp. isolated from root nodules of a leguminous tree Dalbergia lanceolaria*. Indian J. Exp. Biol. 40 (7): 796-801.
- Ghosh, W. y Roy, R. (2006) *Mesorhizobium thioganicum sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 91-97.

- Ghosh, S.; Sengupta, C.; Maiti, T.K. y Basu, P.S. (2008) *Production of 3-indolylacetic acid in root nodules and culture by a Rhizobium species isolated from root nodules of the leguminous pulse Phaseolus mungo*. Folia Microbiol. (Praha) 53: 351-355.
- Gibson, A.H. (1971) *Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes*. Plant Soil (Spec. Vol.) 139-152.
- Gibson, K.E.; Kobayashi, H. y Walker, G.C. (2008). *Molecular determinants of a symbiotic chronic infection*. Annu. Rev. Genet. 42:413-41.
- Gillis, M.; Vandamme, P.; De Vos, P.; Swings, J. y Kersters, K. (2005) *Polyphasic Taxonomy*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed. Vol. 2. The Proteobacteria. (Eds. Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley J.T. y Garrity, G.M). Springer, New York. pp. 43-48.
- Giongo, A.; Passaglia, L.M.P.; Freire, J.R.J. y de Sá, E.L.S. (2007) *Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of Phaseolus vulgaris L. in Brazil*. Biol. Fert. Soils 43: 593-598.
- Giraud, E.; Moulin, L.; Vallenet, D.; Barbe, V.; Cytryn, E.; Avarre, J.C.; Jaubert, M.; Simon, D.; Cartieaux, F.; Prin, Y.; Bena, G.; Hannibal, L.; Fardoux, J.; Kojadinovic, M.; Vuillet, L.; Lajus, A.; Cruveiller, S.; Rouy, Z.; Mangenot, S.; Segurens, B.; Dossat, C.; Franck, W.L.; Chang, W.S.; Saunders, E.; Bruce, D.; Richardson, P.; Normand, P.; Dreyfus, B.; Pignol, D.; Stacey, G.; Emerich, D.; Vermeglio, A.; Medigue, C. y Sadowsky, M. (2007) *Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia*. Science 316: 1307-1312.
- Glenn, A.R. y Dilworth, M.J. (1994) *The life of root nodule bacteria in the acidic underground*. FEMS Microbiol. Lett. 123: 1-10.
- Glick, B.R. (2015) *Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. Springer International Publishing Switzerland. 243 pp. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-13921-0>.
- González, V.E.A.; Hussey, M.A. y Ortega, S.J.A. (2004). *Influencia de la fecha de siembra y distancia entre surcos sobre el establecimiento de asociaciones de desmanthus y el pasto klein*. Rev. Mex. Ciencias Pecuarias 42 (1): 17-28.
- González-Hernández, J.C. y Peña, A. (2002) *Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y Debaryomyces hansenii (Levadura halófila)*. Rev. Latinoam. Microbiol. 44 (3) 137-156.
- Goormachtig, S.; Capoen, W. y Holsters, M. (2004) *Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes*. Trends Plant Sci. 9: 518-522.
- Gopalakrishnan, S.; Sathya, A.; Vijayabharathi, R.; Varshney, R.K.; Gowda, C.L. y Krishnamurthy, L. (2015) *Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities*. 3 Biotech. 5: 355-377.
- Graham, P.H. (1992) *Stress tolerance in Rhizobium and Bradyrhizobium, and nodulation under adverse soil conditions*. Can. J. Microbiol. 38: 475-484.
- Graham, P.H. (2008) *Ecology of Root-Nodule Bacteria of Legumes*. En: *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses* (Eds.: Dilworth, M.J.; James, E.K; Sprent, J.I. y Newton, W.E) Springer, Netherlands, pp. 23-58.
- Graham, P.H y Parker, C.A. (1964) *Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes*. Plant Soil XX, 3: 383-396.
- Graham, P.H. y Vance, C.P. (2000) *Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs*. Field Crops Res. 65: 93-106.

- Graham, P.H.; Viteri, S.E.; Mackie, F.; Vargas, A.T. y Palacios, A. (1982) *Variation in acid soil tolerance among strains of Rhizobium phaseoli*. Field Crops Res. 5: 121-128.
- Graham, P.H.; Sadowsky, M.J.; Keyser, H.H.; Barnet, Y.M.; Bradley, R.S.; Cooper, J.E.; De Ley, J.; Jarvis, B.D.W.; Roslycky, E.B.; Stijdom, B.W. y Young, J.P.W. (1991) *Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria*. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 582-587.
- Graham, P.H.; Draeger, K.J.; Ferrey, M.L.; Conroy, M.J.; Hemmer, B.E.; Martinez, E., Aarons, S.R. y Quinto, C. (1994) *Acid pH tolerance in strains of Rhizobium and Bradyrhizobium, and initial studies on the basis for acid tolerance of Rhizobium tropici UMR1899*. Can. J. Microbiol. 40: 198-207.
- Grange, L. y Hungria, M. (2004) *Genetic diversity of indigenous common bean (Phaseolus vulgaris) rhizobia in two Brazilian ecosystems*. Soil Biol. Biochem. 36: 1389-1398.
- Greaves, M.P. y Darbyshire, J.F. (1972) *The ultrastructure of mucilaginous layer on plant roots*. Soil Biol. Biochem. 4: 443-449.
- Grether, R.; Martínez-Bernal, A.; Luckow, M. y Zárate, S. (2006) *Mimosaceae Tribu Mimoseae*. En: *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*, (Eds. Dávila, A.P.D.; Villa-Señor, R.J.L.; Medina, L.R. y Téllez V.O.) Instituto de Biología, UNAM. México. 44: 1-108 pp.
- Gu, C.T.; Wang, E.T.; Tian, C.F.; Han, T.X.; Chen, W.F.; Sui, X.H. y Chen, W.X. (2008) *Rhizobium miluonense sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from Lespedeza root nodules*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 1364-1368.
- Guan, S.H.; Chen, W.F.; Wang, E.T.; Lu, Y.I.; Yan, X.R.; Zhang, X.X. y Chen, W.X. (2008) *Mesorhizobium caraganae sp. nov., a novel rhizobial species nodulated with Caragana spp. in China*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2646-2653.
- Guerrouj, K.; Ruiz-Diez, B.; Chahboune, R.; Ramirez-Bahena, M.H.; Abdelmoumen, H.; Quinones, M.A.; El Idrissi, M.M.; Velazquez, E.; Fernandez-Pascual, M.; Bedmar, E.J. y Peix, A. (2013) *Definition of a novel symbiovar (sv. retamae) within Bradyrhizobium retamae sp. nov., nodulating Retama sphaerocarpa and Retama monosperma*. Syst. Appl. Microbiol. 36: 218-223.
- Gutteridge, R.C. y Shelton, H.M. (1994) *Forage tree legumes in tropical agriculture*. (Eds. Gutteridge, R.C. y Shelton, H.M.) The Trop. Grassland Society of Australia. Queensland, Australia. 313 pp.
- Hack, C.M.; Tomey, C.E.; Ciotti, E.M. y Castelán, M.E. (2005) *Evaluación agronómica de accesiones del género Desmanthus Willd. del Nordeste Argentino*. Rev. Arg. Prod. Anim. 25: 19-26.
- Halbleib, C.M. y Ludden, P.W. (2000) *Regulation of biological nitrogen fixation*. J. Nutr. 130: 1081-1084.
- Han, T.X.; Han, L.L.; Wu, L.J.; Chen, W.F.; Sui, X.H.; Gu, J.G.; Wang, E.T. y Chen, W.X. (2008a) *Mesorhizobium gobiense sp. nov. and Mesorhizobium tarimense sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2610-2618.
- Han, T.X., Wang, E.T., Wu, L.J., Chen, W.F., Gu, J.G., Gu, C.T., Tian C.F. y Chen, W.X. (2008b) *Rhizobium multihospitium sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 1693-1699.

- Hartel, P. G. y Alexander, M. (1984) *Temperature and desiccation tolerance of cowpea rhizobia*. Can. J. Microbiol. 30: 820-823.
- Hirsch, A.M. (1999) *Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation*. Curr. Opin. Plant Biol. 2 (4): 320-326.
- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. y Williams, S.T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Ed. (Ed. Hensyl, W.R.) Williams and Wilkins, Baltimore, EE.UU. 787 pp.
- Hopkinson, J.M. y English, B.H. (2004) *Germination and hardseededness in Desmanthus*. Trop. Grasslands, 38: 1-16.
- Horne, P.M. y Stür, W.W. (1999) *Developing forage technologies with smallholdres farmers: How to select the best varieties to offer farmers in Southeast Asia*. ACIAR Monograph N°62. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia. 80 pp.
- Hou, B.C.; Wang, E.T.; Li, Y.; Jia, R.Z.; Chen, W.F.; Gao, Y.; Dong, R.J. y Chen, W.X. (2009) *Rhizobium tibeticum sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from Trigonella archiducis-nicolai (Sirj.) Vassilcz*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 3051-3057.
- Howieson J.G. y Ewing M.A. (1986) *Acid tolerance in the Rhizobium meliloti – Medicago symbiosis*. Aust. J. Agr. Res. 37: 55–64.
- Howieson, J.G.; Ballard, R.A.; Yates, R.J. y Charman, N. (2011) *Selecting improved Lotus nodulating rhizobia to expedite the development of new forage species*. Plant Soil, 348(1-2): 231-243.
- Howieson, J.G.; De Meyer, S.E.; Vivas-Marfisi, A.; Ratnayake, S.; Ardley, J.K. y Yates, R.J. (2013) *Novel Burkholderia bacteria isolated from Lebeckia ambigua - A perennial suffrutescent legume of the fynbos*. Soil Biol. Biochem. 60: 55-64.
- Hulton, C.S.; Higgins, C.F. y Sharp, P.M. (1991) *ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of Escherichia coli, Salmonella typhimurium and other enterobacteria*. Mol. Microbiol. 5(4): 825-834.
- Hume, D. y Blair, D. (1992) *Effect of number of Bradyrhizobium japonicum applied in commercial inoculants in soybean seed yield in Ontario*. Can. J. Microbiol. 38: 588-93.
- Humphreys, L.R. (1991) *Tropical pasture utilization*. (Ed. Cambridge University Press). Cambridge, UK. pp. 172.
- Hungria, M. y Franco, A.A. (1993) *Effects of high temperatura on nodulation and nitrogen fixation by Phaseolus vulgaris L*. Plant Soil. 149: 95-102.
- Hungria, M. y Stacey, G. (1997) *Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia, basic aspects and potential application in agriculture*. Soil Biol. Biochem. 29: 519–530.
- Hungria, M. y Vargas, M.A.T. (2000) *Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil*. Field Crops Res. 65: 151-164.
- Hungria, M.; Franco, A.A. y Sprent, J.I. (1993) *New sources of high-temperature tolerant rhizobia for Phaseolus vulgaris (L.)*. Plant Soil. 149: 103-109.
- Illarze Dive, G. (2011) *Eficiencia simbiótica entre Desmanthus spp. y rizobios nativos del Uruguay*. Tesis de la Licenciatura en Ciencias Biológicas. Fac. de Ciencias. Univ. de la República. Uruguay. 50 pp.
- Imran, A.; Hafeez, F.Y.; Frühling, A.; Schumann, P.; Malik, K.A. y Stackebrandt, E. (2010) *Ochrobactrum ciceri sp. nov., isolated from nodules of Cicer arietinum*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 1548-1553.

- INTA. (1991) *Carta de Suelos de la República Argentina. Hojas 3160-26 y 25. Esperanza-Pilar.* Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Rafaela. 135 pp.
- Islam, M.S.; Kawasaki, H., Muramatsu, Y.; Nakagaka, Y. y Seky, T. (2008) *Bradyrhizobium iriomotense sp. nov., Isolated from a Tumor-Like Root of the Legume Entada koshunensis from Iriomote Island in Japan.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 72: 1416-1429.
- Jarvis, B.D.W.; van Berkum, P.; Chen, W.X.; Nour, S.M.; Fernyez, M.P.; Cleyet-Marel, J.C. y Gillis, M. (1997) *Transfer of Rhizobium loti, Rhizobium huakuii, Rhizobium ciceri, Rhizobium mediterraneum and Rhizobium tianshanense to Mesorhizobium gen. nov.* Int. J. Syst. Bacteriol. 47 (3): 895-898.
- Jebara, M.; Mhamdi, R.; Aouan, M.E.; Ghrir, R. y Mars, M. (2001) *Genetic diversity of Sinorhizobium populations recovered from different Medicago varieties cultivated in Tunisian soils.* Can. J. Microbiol. 47: 139-147.
- Jensen, H.L. (1942) *Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root nodule bacteria isolated from species of Medicago and Trifolium in Australia.* Proc Linn Soc NSW 66: 98-108.
- Jiao, Y.S.; Yan, H.; Ji, Z.J.; Liu, Y.H.; Sui, X.H.; Wang, E.T.; Guo, B.L.; Chen, W.X. y Chen, W.F. (2015a) *Rhizobium sophorae sp. nov. and Rhizobium sophoriradicis sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume Sophora flavescens.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65: 497-503.
- Jiao, Y.S.; Yan, H.; Ji, Z.J.; Liu, Y.H.; Sui, X.H.; Zhang, X.X.; Wang, E.T.; Chen, W.X. y Chen, W.F. (2015b) *Phyllobacterium sophorae sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of Sophora flavescens.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65: 399-406.
- Jones, K.M.; Kobayashi, H.; Davies, B.W.; Taga, M.E. y Walker, G.C. (2007) *How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model.* Nat. Rev. Microbiol. 5: 619-633.
- Jones, R.M. y Clem, R.M. (1997) *The role of genetic resources in developing improved pastures in semi-arid and subhumid northern Australia.* Trop. Grasslands 31: 315-319.
- Jones, R.M. y Brandon, N.J. (1998) *Persistence and productivity of eight accessions of Desmanthus virgatus under a range of grazing pressures in subtropical Queensland.* Trop. Grasslands 32: 145-152.
- Jones, R.M.; Bishop, H.G.; Clem, R.L.; Conway, M.J.; Cook, B.G.; Moore, K. y Pengelly, B.C. (2000) *Measurements of nutritive value of a range of tropical legumes and their use in legume evaluation.* Trop. Grasslands 34: 78-90.
- Jordan, D.C. (1982) *Transfer of Rhizobium japonicum Buchanan 1980 to Bradyrhizobium gen. nov., a genus of slowgrowing, root nodule bacteria from leguminous plants.* Int. J. Syst. Bacteriol. 32: 136-139.
- Jordan, D.C. (1984) *Family III. Rhizobiaceae Conn 1938.* En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* (Eds. N.R. Krieg y J.G. Holt) Williams and Wilkins, Baltimore, EE.UU. pp. 234-256.
- Jourand, P.; Giraud, E.; Bena, G.; Sy, A.; Willems, A.; Gillis, M.; Dreyfus, B. y de Lajudie, P. (2004) *Methylobacterium nodulans sp.nov., for a group of aerobic facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen fixing bacteria.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 2269-2273.

- Kanani, J.; Lukefahr, S.D. y Stanko, R.L. (2006) *Evaluation of tropical forage legumes (Medicago sativa, Dolichos lablab, Leucaena leucocephala and Desmanthus bicornutus) for growing goats*. Small Rumin. Res. 65 (1-2): 1-7.
- Karanja, N.K. y Wood, M. (1988) *Selecting Rhizobium phaseoli strains for use with beans (Phaseolus vulgaris L.) in Kenya: Tolerance of high soil temperature and antibiotic resistance*. Plant Soil 112: 15-22.
- Keyser, H.H. y Munns, D.N. (1979) *Tolerance of Rhizobia to Acidity, Aluminum, and Phosphate*. Soil Sci. Soc. Am. J. 43:519-523.
- Keyser, H.H.; Munns, D.N. y Hohenberg, J.S. (1979) *Acid tolerance of rhizobia in culture and in symbiosis with cowpea*. Soil Sci. Soc. Am. J. 43 (5): 719-722.
- Kiers, E.T.; Rousseau, R.A.; West, S.A. y Denison, R.F. (2003) *Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism*. Nature. 425: 78-81.
- Kimura, M. (1980) *A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences*. J. Mol. Evol. 16: 11-120.
- Kishinevsky, B.D.; Sen, D. y Weaver, R.W. (1992) *Effect of high root temperature on Bradyrhizobium-peanut symbiosis*. Plant Soil 143: 275-282.
- Kishinevsky, B.D.; Nandasena, K.G.; Yates, R.J.; Nemas, C. y Howieson, J.G. (2003) *Phenotypic and genetic diversity among rhizobia isolated from three: H. spinosissimum, H. coronarium and H. flexuosum*. Plant Soil 251: 143-153.
- Kittiwongwattana, C. y Thawai, C. (2013) *Rhizobium paknamense sp. nov., isolated from lesser duckweeds (Lemna aequinoctialis)*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 3823-3828.
- Kittiwongwattana, C. y Thawai, C. (2014) *Rhizobium lemnae sp. nov., a bacterial endophyte of Lemna aequinoctialis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 2455-2460.
- Koiser, B.; Puhler, A. y Simon, R. (1993) *Monitoring the diversity of Rhizobium meliloti field and microcosm isolates with a novel rapid genotyping method using insertion elements*. Mol. Ecol. 2: 35-46.
- Kulkarni, S. y Nautiyal, C.S. (1999) *Characterization of high-temperature tolerant rhizobia isolated from Prosopis juliflora grown in alkaline soil*. J. Gen. Appl. Microbiol. 45:213-220.
- Kuykendall, L.D.; Saxena, B.; Devine, T.E. y Udell, S. (1992) *Genetic diversity in Bradyrhizobium japonicum and a proposal for Bradyrhizobium elkanii sp. nov.* Can. J. Microbiol. 38: 501-505.
- Kuykendall, L.D.; Young, J.M.; Martínez-Romero, E.; Kerr, A. y Sawada, H. (2005) *Genus I. Rhizobium Frank 1889, 338^{AL}*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed., Vol. 2. The Proteobacteria. (Eds. Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley J.T. y Garrity, G.M). Springer, New York. pp. 325-340.
- La Favre, A.K. y Eaglesham, A.R.J. (1986) *The effects of high temperatures on soybean nodulation and growth with different strains of bradyrhizobia*. Can. J. Microbiol. 32: 22-27.
- Labandera, C. (2003) *Soja: Inoculantes e Inoculación*. Rev. Plan Agropecuario, N°107: 53-54. <http://planagropecuario.org.uy/Revistas/>
- Labidi, M.; Laberge, S.; Vezina, L.P. y Antoun, H. (2000) *The dnaJ (hsp40) locus in Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli is required for the establishment of an effective symbiosis with Phaseolus vulgaris*. Mol. Plant Microbe Interact. 13: 1271-1274.

- Lagares, A.; Caetano-Anollés, G.; Niehaus, K.; Lorenzen, J.; Ljunggren, H.D.; Pühler, A.; Favelukes, G. (1992) *A Rhizobium meliloti lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa*. J. Bacteriol. 174(18): 5941-5952.
- Laguerre, G.; Nour, S.M.; Macheret, V.; Sanjuan, J.; Drouin, P. y Amarger, N. (2001) *Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among Phaseolus vulgaris symbionts*. Microbiology 147: 981-993.
- Laranjo, M.; Branco, C.; Soares, R.; Alho, L.; Carvalho, M.D.E. y Oliveira, S. (2002) *Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint*. J. Appl. Microbiol. 92: 1043-1050.
- Laus, M.C.; van Brussel, A.A. y Kijne, J.W. (2005) *Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of Rhizobium leguminosarum in attachment to and infection of Vicia sativa root hairs*. Mol. Plant Microbe Interact. 18:533-538.
- LPWG (Legume Phylogeny Working Group) (2013) *Legume phylogeny and classification in 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades*. Taxon 62 (2): 217-248.
- LeRudulier, D. y Bernard, T. (1986) *Salt tolerance in Rhizobium a possible role for betaines*. FEMS Microbiol. Rev. 39: 67-72.
- Lewis, G.; Schrire, B.; Mackinder, B. y Lock, M. (2005) *Introduction*. In *Legumes of the world* (Eds. G. Lewis, G., Schrire, B. Mackinder, B. y Lock, M.) Royal Bot. Gard., Kew, Richmond, U.K. p. 1-19.
- Li, Q.Q.; Wang, E.T.; Chang, Y.L.; Zhang, Y.Z.; Zhang, Y.M.; Sui, X.H.; Chen, W.F. y Chen, W.X. (2011) *Ensifer sojae sp. nov., isolated from root nodules of Glycine max grown in saline-alkaline soils*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 1981-1988.
- Lima, A.S.; Nóbrega, R.S.A.; Barberi, A.; Silva, K.; Ferreira, D.F. y Moreira, F.M.S. (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 Soil. 319: 127-145.
- Lin, D.X.; Chen, W.F.; Wang, F.Q.; Hu, D.; Wang, E.T.; Sui, X.H. y Chen, W.X. (2009) *Rhizobium mesosinicum sp. nov., isolated from root nodules of three different legume*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 1919-1923.
- Lin, S.Y.; Hung, M.H.; Hameed, A.; Liu, Y.C.; Hsu, Y.H.; Wen, C.Z.; Arun, A.B.; Busse, H.J.; Glaeser, S.P.; Kampfer, P. y Young, C.C. (2015) *Rhizobium capsici sp. nov., isolated from root tumor of a green bell pepper (Capsicum annuum var. grossum) plant*. Antonie van Leeuwenhoek. 107: 773-784.
- Lindström, K. (1989) *Rhizobium galegae, a new species of legume root nodule bacteria*. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 365-367.
- Lindström, K. y Lehtomäki, S. (1988) *Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of Rhizobium sp. (Galega) compared with other fast-growing rhizobia*. FEMS Microbiol. Lett. 50: 277-287.
- Lindstrom, K.; Lipsanen, P. y Kaijalainen, S. (1990) *Stability of markers used for identification of two Rhizobium galegae inoculation strains after five years in the field*. Appl. Environ. Microbiol. 56:444-450.

- Liu, J.; Wang, E.T. y Chen, W.X. (2005) *Diverse rhizobia associated with woody legumes Wisteria sinensis, Cercis racemosa and Amorpha fruticosa grown in the temperate zone of China*. Syst. Appl. Microbiol. 28: 465-477.
- Liu, T.Y.; Li, Y.Jr.; Liua, X.X.; Suia, X.H.; Zhang, X.X.; Wang, E.T.; Chena, W.X.; Chena, W.F. y Puławska, J. (2012) *Rhizobium cauense sp. nov., isolated from root nodules of the herbaceous legume Kummerowia stipulacea grown in campus lawn soil*. Syst. Appl. Microbiol. 35: 415-420.
- Llorente, L.; Ormeno-Orrillo, E.; Rincon, R., Martínez-Romero, J.; Rogel-Hernández, M.A y Martínez-Romero, E. (2007) *Ensifer mexicanus sp. nov. a new specie nodulating Acacia angustissima (Mill.) Kuntze in Mexico*. Syst. Appl. Microbiol. 30: 280-290.
- Lloret, L. y Martínez-Romero, E. (2005) *Evolución y filogenia de Rhizobium*. Rev. Latinoam. Microbiol. 47: 43-60.
- Lodwig, E. y Poole, P. (2003) *Metabolism of Rhizobium bacteroids*. Crit. Rev. Plant. Sci. 22: 37-38.
- López, R.C.; González, L.M.; Ramírez, R.; Cordoví, E.; Gómez, I. y Castillo P. (2000) *Aislamiento y caracterización de cepas nativas de Rhizobium aisladas de leguminosas pratenses en suelos afectados por la salinidad*. Pastos y Forrajes 23 (2): 129-134.
- López-López, A.; Rogel-Hernández, M.A.; Barois, I.; Ortiz Ceballos, A.I.; Martínez, J.; Ormeño-Orrillo, E. y Martínez-Romero, E. (2012) *Rhizobium grahamii sp. nov., from nodules of Dalea leporina, Leucaena leucocephala and Clitoria ternatea, and Rhizobium mesoamericanum sp. nov., from nodules of Phaseolus vulgaris, siratro, cowpea and Mimosa púdica*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 2264-2271.
- Lowendorf, H.S. (1980) *Factors affecting survival of Rhizobium in soil*. En: *Advances in Microbial Ecology*. (Ed. Alexander, M.) Plenum Press, Nueva York, EE.UU. pp. 87-124.
- Lowendorf, H.S. y Alexander, M. (1983) *Identification of Rhizobium phaseoli strains that are tolerant or sensitive to soil acidity*. Appl. Environ. Microbiol. 45 (3): 737-742.
- Lowendorf, H.S.; Baya, A.M. y Alexander, M. (1981) *Survival of Rhizobium in Acid Soils*. Appl. Env. Microbiol. 42 (6): 951-957.
- LPWG (The Legume Phylogeny Working Group). (2013) *Legume phylogeny and classification in 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades*. Taxon 62 (2) 217-248.
- Lu, J.K.; Dou, Y.J.; Zhu, Y.J.; Wang, S.K.; Sui, X.H. y Kang, L.H. (2014) *Bradyrhizobium ganzhouense sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from Acacia melanoxylon R. Br. nodules*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 1900-1905.
- Lu, Y.L.; Chen, W.F.; Han, L.L.; Wang, E.T. y Chen, W.X. (2009a) *Rhizobium alkalisoli sp. nov., isolated from Caragana intermedia growing in saline-alkaline soils in the north of China*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 3006-3011.
- Lu, Y.L.; Chen, W.F.; Wang, E.T.; Han, L.L.; Zhang, X.X.; Chen, W.X. y Han, S.Z. (2009b) *Mesorhizobium shangrilense sp. nov., isolated from root nodules of Caragana species*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 3012-3018.
- Luchetti, A. M. (2014) *Las Leguminosas Mimosoideas de la provincia de Santa Fe*. Natura Neotropicalis 45 (1-2): 21-43.
- Luckow, M. (1993) *Monograph of Desmanthus (Leguminosae-Mimosoideae)*. Syst. Bot. Monogr. 38, 1-166. The American Society of Plant Taxonomists.

- Lum, M.R. y Hirsch, A.M. (2003) *Roots and Their Symbiotic Microbes: Strategies to Obtain Nitrogen and Phosphorus in a Nutrient-Limited Environment*. J. Plant Growth Regul. 21: 368-382.
- Madsen, E.B.; Madsen, L.H.; Radutoiu, S.; Olbryt, M.; Rakwalska, M.; Szczyglowski, K.; Sato, S.; Kaneko, T.; Tabata, S.; Sandal, N. y Stougaard, J. (2003) *A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals*. Nature. 425: 637-640.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Provincia de Santa Fe) (1982) *Toma de muestras y Determinaciones Analíticas en Suelos y Aguas de Santa Fe*. MAG. Dirección General de Extensión e Investigaciones Agropecuarias. 152 pp.
- Maiden, M.C.J.; Bygraves, J.A.; Feil, E.; Morelli, G.; Russell, J.E.; Urwin, R.; Zhang, Q.; Zhou, J.; Zurth, K.; Caugant, D.A.; Feavers, I.M.; Achtman, M. y Spratt, B.G. (1998). *Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3140-3145.
- Mainero, E. (2014). *Identificación de áreas prioritarias de colecta de germoplasma para 10 especies forrajeras conservadas en el banco de germoplasma de la FCA-UNL*. Tesis Ingeniería Agronómica. Fac. Ciencias Agrarias. UNL.
- Mantelin, S.; Fischer-Le Saux, M.; Zakhia, F.; Béna, G.; Bonneau, S.; Jeder, H.; de Lajudie, P. y Cleyet-Marel, J.C. (2006) *Emended description of the genus Phyllobacterium and description of four novel species associated with plant roots: Phyllobacterium bourgognense sp. nov., Phyllobacterium ifriqiense sp. nov., Phyllobacterium leguminum sp. nov. and Phyllobacterium brassicacearum sp. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 827-839.
- Martens, M.; Delaere, M.; Coopman, R.; de Vos, P.; Gillis, M. y Willems, A. (2007) *Multilocus sequence analysis of Ensifer and related taxa*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 489-503.
- Martens, M.; Dawyndt, P.; Coopman, R.; Gillis, M.; de Vos, P. y Willems, A. (2008) *Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus Ensifer (including former Sinorhizobium)*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 200-214.
- Martínez-Aguilar, L.; Salazar-Salazar, C.; Méndez, R. D.; Caballero-Mellado, J.; Hirsch, A.M.; Vásquez-Murrieta, M.S. y Estrada de los Santos, P. (2014) *Burkholderia caballeronis sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (Lycopersicon esculentum) with the ability to effectively nodulate Phaseolus vulgaris*. Antonie van Leeuwenhoek. 104: 1063-1071.
- Martínez-Hidalgo, P.; Ramírez-Bahena, M.H.; Flores-Felix, J.D.; Rivas, R.; Igual, J.M.; Mateos, P. F.; Martínez-Molina, E.; León-Barrios, M.; Peix, A. y Velázquez, E. (2015) *Revision of the taxonomic status of type strains of Mesorhizobium loti and reclassification of strain USDA 3471^T as the type strain of Mesorhizobium erdmanii sp. nov. and ATCC 33669^T as the type strain of Mesorhizobium jarvisii sp. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65: 1703-1708.
- Martínez-Romero, E. (1994) *Recent developments in Rhizobium taxonomy*. Plant Soil 161: 11-20.
- Martínez-Romero, E. (2001) *Poblaciones de rhizobia nativas de México*. Acta Zool. Mex, (n.s.) Número especial 1: 29-38.
- Martínez-Romero, E.; Segovia, L.; Mercante, F.B.; Franco, A.A.; Graham, P. y Pardo, M.A. (1991) *Rhizobium tropici, a new species nodulating Phaseolus vulgaris L. beans and Leucaena tres*. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 417-426.

- Martínez-Toledo, M.W. (1992). Biología del nitrógeno: En Interacción Planta-Microorganismo: Biología del Nitrógeno. (Eds. González López, J.G. y Lluch Pla, C.) España. pp. 25-36.
- Martins, C. M.; Borges, W. L.; Costa Júnior, J. y Rumjanek, N. G. (2015) *Rhizobial diversity from stem and root nodules of Discolobium an Aeschynomene*. Acta Sci. Agron. 37(2): 163-170.
- Martins, L.M.V.; Xavier, G.R.; Neves, M.C.P. y Rumjanek, N.G. (1997) *Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "Rizobio"*. CT/19. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiología. pp. 1-14.
- Mavengere, N.R.; Ellis, A.G. y Le Roux, J.J. (2014) *Burkholderia aspalathi sp. nov., isolated from root nodules of the South African legume Aspalathus abietina Thunb*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 1906-1912.
- McDowell, L.R.; Conrad, J.E.; Thomas, J.E. y Harris, L.E. (1974) *Latin American Tables of Feed Composition*. Dept. Animal Science. University of Florida, Gainesville. EE.UU. 556 pp.
- McGraw, R.L.; Shockley, F.W.; Thompson, J.F. y Roberts, C.A. (2004) *Evaluation of native legume species for forage yield, quality, and seed production*. Native Plants Journal 5: 152-159.
- Menna, P.; Barcellos, F.G. y Hungria, M. (2009) *Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of Bradyrhizobium strains based on Multilocus Sequence Analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and glNII, recA, atpD and dnaK genes*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 2934-2950.
- Merabet, C.; Martens, M.; Mahdhi, M.; Zakhia, F.; Sy, A.; Le Roux, C.; Domergue, O.; Coopman, R.; Bekki, A.; Mars, M.; Willems, A. y de Lajudie, P. (2010) *Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from Lotus arabicus (Senegal), Lotus creticus, Argyrolobium uniflorum and Medicago sativa (Tunisia) and description of Ensifer numidicus sp. nov. and Ensifer garamanticus sp. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 664-674.
- Michiels, J.; Verreth, C. y Vanderleyden, J. (1994) *Effects of temperature stress on bean-nodulating Rhizobium strains*. Appl. Environ. Microb. 60 (4): 1206-1212.
- Miller, D.D.; Leferink-ten Klooster, H.B. y Emons, A.M. (2000) *Lipochito-oligosaccharide nodulation factors stimulate cytoplasmic polarity with longitudinal endoplasmic reticulum and vesicles at the tip in vetch root hairs*. Mol. Plant Microbe Interact. 13: 1385-1390.
- Miranda-Sánchez; Rivera, J. y Vinuesa, P. (2015) *Diversity patterns of Rhizobiaceae communities inhabiting soils, root-surfaces and nodules reveal a strong selection of rhizobial partners by legumes*. Environ. Microbiol. doi: 10.1111/1462-2920.13061.
- Mnasri, B.; Liu, T.Y.; Saidi, S.; Chen, W.F.; Chen, W.X.; Zhang, X.X. y Mhamdi, R. (2014). *Rhizobium azibense sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from root-nodules of Phaseolus vulgaris*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 1501-1506.
- Mongiardini, E.J.; Ausmees, N.; Perez-Gimenez, J.; Althabegoiti, M.J.; Quelas, J.I.; López-García, S.L. y Lodeiro, A.R. (2008) *The rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of rhizobia to plant roots but not in nodulation*. FEMS Microbiol. Ecol. 65: 279-288.
- Moreira, F.M.S.; Cruz, L.M.; Faria, S.M.; Marsh, T.; Martínez-Romero, E.; Pedrosa, F.O.; Pitard, R. y Young, P.J.W. (2006) *Azorhizobium doebereineriae sp. nov. microsymbiont of Sesbania virgata (Caz.) Pers.* Syst. Appl. Microbiol. 29: 197-206.
- Moreira, F.M.S. (2012) *Bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. En: Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo*. (Eds. Moreira, F.; Huising, E.J. y Bignell, D.E). Instituto Nacional de Ecología, México. pp. 177-216.

- Moreira, F.M.S.; Silva, M.F. y Faria, S.M. de (1992) *Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil*. New Phytol. 121: 563-570.
- Moron, B.; Soria-Diaz, M.E.; Ault, J.; Verroios, G.; Noreen, S.; Rodriguez-Navarro, D.N.; Gil-Serrano, A.; Thomas-Oates, J.; Megias, M. y Sousa, C. (2005) *Low pH changes the profile of nodulation factors produced by Rhizobium tropici CIAT899*. Chem. Biol. 12: 1029-1040.
- Mostasso, L.; Mostasso, F.L.; Dias, B.G.; Vargas, M.A.T.; Hungria, M. (2002) *Selection of bean (Phaseolus vulgaris L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados*. Field Crop Res. 73 (2) 121-132.
- Mpepereki, S.; Wollum, A.G. y Makonese, F. (1996) *Growth temperature characteristics of indigenous Rhizobium and Bradyrhizobium isolates from Zimbabwean soils*. Soil Biol. Biochem. 18: 1537-1539.
- Mulder, L.; Lefebvre, B.; Cullimore, J. y Imberty, A. (2006) *LysM domains of Medicago truncatula NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors*. Glycobiology. 16: 801-809.
- Munchbach, M.; Nocker, A. y Narberhaus, F. (1999). *Multiple small heat shock proteins in rhizobia*. J. Bacteriol. 181: 83-90.
- Muncrief, J. B. y Heizer, R. B. (1985) *Registration of "Sabine" Illinois bundleflower*. Crop Sci. 25: 1124.
- Munevar, F. y Wollum, A.G. (1981) *Growth of Rhizobium japonicum strains at temperatures above 27°C*. Appl. Environ. Microbiol. 42: 272-276.
- Munns, D.N. (1986) *Acid soils tolerance in legumes and rhizobia*. Adv. Plant Nutr. 2: 63-91.
- Nandasena, K.G.; O'Hara, G.W.; Tiwari, R.P.; Willems, A. y Howieson, J.G. (2009) *Mesorhizobium australicum sp. nov. and Mesorhizobium opportunistum sp. nov., isolated from Biserrula pelecinus L. in Australia*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 2140-2147.
- Nick, G.; de Lajudie, P.; Eardly, B.D.; Suomalainen, S.; Paulin, L.; Zhang, X.; Gillis, M. y Lidstrom, K. (1999) *Sinorhizobium arboris sp. nov. and Sinorhizobium kostiense sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya*. Int. J. Syst. Microbiol. 49: 1359-1368.
- Norris, D.O. (1965) *Acid production by Rhizobium. A unifying concept*. Plant Soil XXII (2): 143-166.
- Nour, S.M.; Cleyet-Marel, J.C.; Beck, D.; Effosse, A. y Fernandez, M.P. (1994) *Genotypic y phenotypic diversity of Rhizobium isolated from chickpea (Cicer arietinum L.)*. Can. J. Microbiol. 40: 345-354.
- Ocuppaugh, W.R.; Kunz, D.; Rahmes, J.; Martinez, D.; Grichar, J.; Hussey, M.A.; Reilley, J.; Abrameit, A.H.; Owens, M.K.; Reed, R.L.; Muir, J.P. y Bade, D. (2004a) *'Beewild' bundleflower, a new summer-growing perennial legume for central and south Texas and Mexico*. Forage Research in Texas. CPR 5267. <http://forageresearch.tamu.edu>.
- Ocuppaugh, W.R.; Grichar, W.J.; Husse, M.A.J.; Abrameit, A.H.; Owens, M.K.; Reed, R.L.; Muir, J.P.; Bade, D. y Reilley, J.L. (2004b) *Registration of 'BeeTam 06'*. Crop Sci. 44: 1860-1864.
- Odee, D.W.; Sutherland, J.M.; Kimiti, J.M. y Sprent, J.I. (1995) *Natural rhizobial populations and nodulation status of woody legumes growing in diverse Kenyan conditions*. Plant Soil. 173: 211-224.
- Odee, D.W.; Haukka, K.; McInroy, S.G.; Sprent, J.I.; Sutherland, J.M. y Young, J.P.W. (2002) *Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya*. Soil Biol. Biochem. 34: 801-811.

- Oldroyd, G.E. (2007) *Plant science. Nodules and hormones*. Science. 315: 52-53.
- Oldroyd, G.E. y Downie, J.A. (2008). *Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes*. Annu. Rev. Plant Biol. 59: 519-546.
- Osa-Afiana, L.O. y Alexander, M. (1982) *Differences among cowpea rhizobia in tolerance to high temperature and desiccation in soil*. Appl. Environ. Microbiol. 43 (2): 435-439.
- Paffetti, O.; Scotti, C.; Gnocchi, S.; Fancelli, S. y Bazzicaluppo, M. (1996) *Genetic diversity of an Italian Rhizobium meliloti population from different Medicago sativa varieties*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2279-2285.
- Patrick, H.N. y Lowther, W.L. (1995) *Influence of the number of rhizobia on the nodulation and establishment of Trifolium ambiguum*. Soil Biol. Biochem. 27: 717-720.
- Pedraza, R.; Roncedo, C.S.; Carrizo de Bellone, S.; Bellone, C.H. y Pérez, H.E. (2001) *Diferenciación de rizobios nativos que nodulan cuatro leguminosas forrajeras en Tucumán, Argentina*. Cienc. Suelo. 19 (1): 79-81.
- Peix, A.; Ramírez-Bahena, M.H.; Flores-Félix, J.D.; Alonso de la Vega, P.; Rivas, R.; Mateos, P.F.; Igual, J.M.; Martínez-Molina, E.; Trujillo, M.E. y Velázquez, E. (2015) *Revision of the taxonomic status of the species Rhizobium lupini and reclassification as Bradyrhizobium lupini comb. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65: 1213-1219.
- Peng, G.; Yuan, Q.; Li, H.; Zhang, W. y Tan, Z. (2008) *Rhizobium oryzae sp. nov., isolated from the wild rice Oryza alta*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2158-2163.
- Pengelly, B.C. y Conway, M.J. (2000) *Pastures on cropping soils: which tropical pasture legume to use?* Trop. Grasslands 34: 162-168.
- Pengelly, B.C.; Hall, E.; Auricht, G.; Bennell, M. y Cook, B.G. (2006). *Identifying potential pasture species for grazing systems in the Mallee-Wimmera*. (Eds. Harsdorf, J.) CSIRO Sustainable Ecosystems, Canberra, Australia. 109 pp.
- Peoples, M.B. y Herridge, D.F. (1990) *Nitrogen fixation by legumes in tropical and subtropical agriculture*. Adv. Agron. 44: 155-223.
- Peretti, A. (1994) *Manual para Análisis de semillas*. (Ed. Hemisferio Sur S.A.) Buenos Aires, Argentina. 281 pp.
- Pérez-Giménez, J.; Althabegoiti, M.J.; Covelli, J.; Mongiardini, E.J.; Quelas, J.I.; López-García, S.L. y Lodeiro, A.R. (2009) *Soybean lectin enhances biofilm formation by Bradyrhizobium japonicum in the absence of plants*. Int. J. Microbiol. 2009: ID719367, 1-8.
- Perret, X.; Staehelin, C. y Broughton, W. J. (2000) *Molecular basis of symbiotic promiscuity*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 180-201.
- Pérez-Galdona, R. y Kahn, M.L. (1994) *Effects of organic acids and low pH on Rhizobium meliloti 104A14*. Microbiology 140: 1231-1235.
- Pessi, G.; Ahrens, C.H.; Rehrauer, H.; Lindemann, A.; Hauser, F.; Fischer, H.M. y Hennecke, H. (2007) *Genome-wide transcript analysis of Bradyrhizobium japonicum bacteroids in soybean root nodules*. Mol. Plant Microbe Interact. 20: 1353-1363.
- Piha, M.I. y Munns, D.N. (1987) *Sensitivity of the common bean (Phaseolus vulgaris L.) symbiosis to high soil temperature*. Plant Soil. 98: 183-194.
- Pinto, P.P.; Raposeiras, R.; Macedo, A.M.; Seldin, L.; Paiva, E. y Sá, N.M.H. (1998) *Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulating Rhizobium strains*. Rev. Microbiol. 29: 295-300.

- Popp, C. y Ott, T. (2011) *Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis*. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 14(4): 458-467.
- Posler, G.L.; Lenssen, A.W. y Fine, G.L. (1993) *Forage yield, quality, compatibility, and persistence of warm-season grass-legume mixtures*. *Agron. J.* 85: 554-560.
- Preisig, O.; Zufferey, R.; Thony-Meyer, L.; Appleby, C.A. y Hennecke, H. (1996) *A highaffinity cbb3-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 178: 1532-1538.
- Prell, J. y Poole, P. (2006) *Metabolic changes of rhizobia in legume nodules*. *Trends Microbiol.* 14: 161-168.
- Provorov, N.A.; Borisov, A.Y. y Tikhonovich, I.A. (2002) *Developmental Genetics and Evolution of Symbiotic Structures in Nitrogen-fixing Nodules and Arbuscular Mycorrhizae*. *J. Theor. Biol.* 214 (2): 215-232.
- Qin, W.; Deng, Z.S.; Xu, L.; Wang, N.N. y Wei, G.H. (2012) *Rhizobium helanshanense sp. nov., a bacterium that nodulates Sphaerophysa salsula (Pall.) DC. in China*. *Arch. Microbiol.* 194: 371-378.
- Rainbird, R.M.; Akins, C.A. y Pate, J.J.S. (1983) *Effect of temperatura on nitrogenase functioning in cowpea nodules*. *Plant Physiol.* 73: 392-394.
- Ramirez, R.G.; Haenlein, G.F.W. y Nunez-Gonzalez, M.A. (2001) *Seasonal variation of macro and trace mineral contents in 14 browse species that grow in northeastern Mexico*. *Small Rumin. Res.*, 39 (2): 153-159.
- Ramírez-Bahena, M.H.; García-Fraile, P.; Peix, A.; Valverde, A.; Rivas, R.; Igual, J.M.; Mateos, P.F.; Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2008) *Revision of the taxonomic status of the species Rhizobium leguminosarum (Frank 1879) Frank 1889AL, Rhizobium phaseoli Dangeard 1926AL and Rhizobium trifolii Dangeard 1926AL. R. trifolii is a later synonym of R. leguminosarum. Reclassification of the strain R. leguminosarum DSM 30132 (=NCIMB 11478) as Rhizobium pisi sp. nov.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2484-2490.
- Ramírez-Bahena, M.H.; Peix, A.; Rivas, R.; Camacho, M.; Rodríguez-Navarro, D.N.; Mateos, P.F.; Martínez-Molina, E.; Willems, A. y Velázquez, E. (2009) *Bradyrhizobium pachyrhizi sp. nov. and Bradyrhizobium jicamae sp. nov., isolated from effective nodules of Pachyrhizus erosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 1929-1934.
- Ramírez-Bahena, M.H.; Hernández, M.; Peix, A.; Velázquez, E. y León-Barrios, M. (2012) *Mesorhizobial strains nodulating Anagyris latifolia and Lotus berthelotii in Tamadaya ravine (Tenerife, Canary Islands) are two symbiovars of the same species, Mesorhizobium tamadayense sp. nov.* *Syst. Appl. Microbiol.* 35: 334-341.
- Ramírez-Bahena, M.H.; Chahboune, R.; Peix, A. y Velázquez, E. (2013) *Reclassification of Agromonas oligotrophica into the genus Bradyrhizobium as Bradyrhizobium oligotrophicum comb. nov.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 1013-1016.
- Rangel, J.H.A. (2005) *Agroecological studies of Desmanthus-a tropical forage legume*. PhD Thesis, James Cook University. Australia. 270 pp.
- Rangel, J.H.A. y Gomide, C.A. (2005) *Desmanthus: a new forage legume to improve wool growth in tropical Australia*. *Trop. Grassland* 39: 233.
- Rangel, J.H.A. y Gardiner, C.P. (2009) *Stimulation of wool growth by Desmanthus spp. as a supplement to a diet of Mitchell grass hay*. *Trop. Grassland* 43 (2): 106-111.

- Rashid, M.H.; Young, J.P.W.; Everall, I.; Clercx, P.; Willems, A.; Santhosh Braun, M. y Wink, M. (2015) *Average nucleotide identity of genome sequences supports the description of Rhizobium lentis sp. nov., Rhizobium bangladeshense sp. nov. and Rhizobium binae sp. nov. from lentil (Lens culinaris) nodules.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65: 3037-3045.
- Rathbun, E.A.; Naldrett, M.J. y Brewin, N.J. (2002) *Identification of a family of extensinlike glycoproteins in the lumen of Rhizobium-induced infection threads in pea root nodules.* Mol. Plant Microbe Interact. 15: 350-359.
- Raymond, J.; Siefert, J.L.; Staples, C.R. y R.E. Blankenship, R.R. (2004) *The natural history of nitrogen fixation.* Mol. Biol. Evol. 21: 541-554.
- Ren, D.W.; Chen, W.F.; Sui, X.H.; Wang, E.T. y Chen, W.X. (2011a) *Rhizobium vignae sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from multiple legume species.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 580-586.
- Ren, D.W.; Wang, E.T.; Chen, W.F.; Sui, X.H.; Zhang, X.X.; Liu, H.C. y Chen, W.X. (2011b) *Rhizobium herbae sp. nov. and Rhizobium giardinii-related bacteria, minor microsymbionts of various wild legumes in China.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 1912-1920.
- Requena, N.; Perez-Soils, E.; Azcon-Aguilar C. y Barea, P. (2001) *Management of indigenous plant-microbe symbioses aids to restoration of desertified ecosystems.* Appl. Environ. Microbiol. 67: 495-498.
- Ribeiro, R.A.; Barcellos, F.G.; Thompson, F.L. y Hungria, M. (2009) *Multilocus sequence analysis of Brazilian Rhizobium microsymbionts of common bean (Phaseolus vulgaris L.) reveals unexpected taxonomic diversity.* Res. Microbiol. 160: 297-306.
- Ribeiro, R.A.; Rogel, M.A.; López-López, A.; Ormeño-Orrillo, E.; Barcellos, F.G.; Martínez, J.; Thompson, F.L.; Martínez-Romero, E. y Hungria, M. (2012) *Reclassification of Rhizobium tropici type A strains as Rhizobium leucaenae sp. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 1179-1184.
- Ribeiro, R.A.; Martins, T.B.; Ormeño-Orrillo, E.; Marcon Delamuta, J.R.; Rogel, M.A.; Martínez-Romero, E. y Hungria, M. (2015) *Rhizobium ecuadorensis sp. nov., an indigenous N₂-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (Phaseolus vulgaris L.) genetic pool.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65: 3162-3169.
- Richardson, A.E.; Simpson, R.J.; Djordjevic, M.A. y Rolfe, B.G. (1988) *Expression of nodulation genes in Rhizobium leguminosarum bv. trifolii is affected by low pH and by Ca²⁺ and Al ions.* Appl. Environ. Microbiol. 54: 2541-2548.
- Richardson, A.E.; Viccars, L.A.; Watson, J.M. y Gibson, A.H. (1995) *Differentiation of Rhizobium strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers.* Soil Biol. Biochem. 27: 515-524.
- Rinaudi, L.V. y Giordano, W. (2010). *An integrated view of biofilm formation in rhizobia.* FEMS Microbiol. Lett. 304: 1-11.
- Rincón-Rosales, R.; Llorente, L.; Ponce, E. y Martínez-Romero, E. (2009) *Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate Acaciella angustissima in Mexico, including Sinorhizobium chiapanecum sp. nov. which has common symbiotic genes with Sinorhizobium mexicanum.* FEMS Microbiology Ecology 67: 103-117.
- Rincón-Rosales, R.; Villalobos-Escobedo, J.M.; Rogel, M.A.; Martínez, J.; Ormeño-Orrillo, E. y Martínez-Romero, E. (2013) *Rhizobium calliandrae sp. nov., Rhizobium mayense sp. nov.*

- and *Rhizobium jaguaris* sp. nov., rhizobial species nodulating the medicinal legume *Calliandra grandiflora*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 3423-3429.
- Rivas, R.; Velázquez, E.; Willems, A.; Vizcaíno, N.; Subba-Rao, N.S.; Mateos, P.F.; Gillis, M.; Dazzo, F.B. y Martínez-Molina, E. (2002) *A new species of Devosia that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume Neptunia natans (L.f.) druce*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5217-5222.
- Rivas, R.; Willems, A.; Subba-Rao, N.S.; Mateos, P.F.; Dazzo, F.B.; Kroppenstedt, R.M.; Martínez-Molina, E.; Gillis, M. y Velázquez, E. (2003) *Description of Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 47-53.
- Rivas, R.; García-Fraile, P. y Velázquez, E. (2009a) *Taxonomy of bacteria nodulating legumes*. *Microbiology Insights.* 2: 51-69.
- Rivas, R.; Martens, M.; de Lajudie, P. y Willems, A. (2009b) *Multilocus sequence analysis of the genus Bradyrhizobium*. *Syst. Appl. Microbiol.* 32: 101-110.
- Robledo, M.; Jimenez-Zurdo, J.I.; Velazquez, E.; Trujillo, M.E.; Zurdo-Pineiro, J.L.; Ramirez-Bahena, M.H.; Ramos, B.; Diaz-Minguez, J.M.; Dazzo, F.; Martinez-Molina, E. y Mateos, P.F. (2008) *Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 7064-7069.
- Rogel, M.A.; Ormeño-Orrillo, E. y Martínez Romero, E. (2011) *Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes*. *Syst. Appl. Microbiol.* 34: 96-104.
- Rome, S.; Fernandez, M.P.; Brunel, B.; Normy, P. y Cleyet-Marel, J.C. (1996) *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 972-980.
- Roncedo, C.S. y Perez, H.E. (2011) *Incorporación de leguminosas herbáceas para la recuperación de pasturas degradadas a través de la intersembrado*. <http://inta.gob.ar/documentos/incorporacion-de-leguminosas-herbaceas-para-la-recuperacion-de-pasturas-degradadas-a-traves-de-la-intersembrado/>
- Roumiantseva, M. L.; Andronov, E. E.; Sharypova, L. A.; Dammann-Kalinowski, T.; Keller, M.; Young, J. P. W. y Simarov, B. (2002) *Diversity of Sinorhizobium meliloti from the central asian alfalfa gene center*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4694-4697.
- Sadowsky, M.J. (2005) *Soil Stress Factors Influencing Symbiotic Nitrogen Fixation*. En: *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology and the Environment*. (Eds. Werner, D. y Newton, W.E). Springer, The Netherlands. pp. 89-112.
- Sadowsky, M.J. y Graham, P.H. (1998) *Soil biology of the Rhizobiaceae*. In: *The Rhizobiaceae* (Eds Spaink, H.P.; Kondorosi, A. y Hooykaas, .P.J.J.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 155–172.
- Saidi, S.; Ramírez-Bahena, M.H.; Santillana, N.; Zúñiga, D.; Álvarez-Martínez, E.; Peix, A.; Mhamdi, R. y Velázquez, E. (2014) *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 242-247.
- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Harn, G.T.; Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988) *Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science.* 239: 487-491.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Second Edition). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanchez-Contreras, M.; Bauer, W.D.; Gao, M.S.; Robinson, J.B. y Downie, J.A. (2007) *Quorum-sensing regulation in Rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes*. Phil. Trans. R. Soc. B 362: 1149–1163.
- Santos, R., Hérouart, D., Sigaud, S., Touati, D. y Puppo, A. (2001). *Oxidative burst in Alfalfa-Sinorhizobium meliloti symbiotic interaction*. Mol. Plant Microbe Interact. 14: 86-89.
- Sauvage, D.; Hamelin, J. y Larher, F. (1983) *Glycine betaine and other structurally related compounds improve the salt tolerance of Rhizobium meliloti*. Plant Sci. Lett. 31: 291-302.
- Sauvant D.; Heuzé V.; Tran, G. y Bastianelli, D. (2015) *Dwarf koa (Desmanthus virgatus)*. Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <http://www.feedipedia.org/node/307>
- Schluter, P.M. y Harris, S.A. (2006) *Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data*. Mol. Ecol. Notes 6: 569-572.
- Schofield, P.R.; Gibson, A.H.; Dudman, W.F. y Watson, J.M. (1987) *Evidence for genetic exchange and recombination of Rhizobium symbiotic plasmids in a soil population*. Appl. Environ. Microbiol. 53: 2942-2947.
- Scholla, M.H. y Elkan, G.H. (1984) *Rhizobium fredii sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans*. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 484-486.
- Segovia, L.; Pinero, D.; Palacios, R. y Martínez-Romero, E. (1991) *Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic Rhizobium leguminosarum*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 426–430.
- Segovia, L.; Young, J.P.W. y Martínez-Romero, E. (1993) *Reclassification of American Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli type I strains as Rhizobium etli sp. nov.* Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 374-377.
- Segundo, E.; Martínez-Abarca, F.; van Dillewijn, P.; Fernández-López, M.; Lagares, A.; Martínez-Drets, G.; Niehaus, K.; Puhler, A. y Toro, N. (1999) *Characterization of symbiotically efficient alfalfa-nodulating rhizobia isolated from acid soils of Argentina and Uruguay*. FEMS Microbiol. Ecol. 28: 169-176.
- Shah, V.K. y Brill, W.J. (1977) *Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 3249-3253.
- Sheu, S.Y.; Chou, J.H.; Bontemps, C.; Elliott, G.N.; Gross, E.; James, E.K.; Sprent, J.I. ; Peter, J.; Young, W. y Chen, W.M. (2012) *Burkholderia symbiotica sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa spp. native to north-east Brazil*. Int. J Syst. Evol. Microbiol. 62: 2272-2278.
- Sheu, S.Y.; Chou, J.H.; Bontemps, C.; Elliott, G.N.; Gross, E.; Dos Reis Junior, F.B.; Melkonian, R.; Moulin, L.; James, E.K.; Sprent, J.I.; Young, J.P.W. y Chen, W.M. (2013) *Burkholderia diazotrophica sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa spp.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 435-441.
- Silva, C. y Vinuesa, P. (2007) *Ecología evolutiva de bacterias y el concepto de especie: el caso de los rizobios*. En: *Ecología molecular*. (Eds. Eguiarte, L.E.; Souza, V. y Aguirre, X.) Inst. Nac. Ecología. Univ. Nac. Autónoma de México. Com. Nac. Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, pp. 351-392.
- Silva, F.V.; De Meyer, S.E.; Simões-Araújo, J.L.; Da Costa Barbé, T.; Xavier, G.R.; O'Hara, G.; Ardley, J.K.; Rumjanek, N.G.; Willems, A. y Zilli, J.E. (2014) *Bradyrhizobium manausense sp. nov.,*

- isolated from effective nodules of Vigna unguiculata grown in Brazilian Amazonian rainforest soils. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 2358-2363.
- Simms, E.L.; Taylor, D.L.; Povich, J.; Shefferson, R.P.; Sachs, J.L.; Urbina, M. y Tausczik, Y. (2006) *An empirical test of partner choice mechanisms in a wild legume-rhizobium interaction. Proc. R. Soc. B.* 273: 77-81.
- Singleton, P.W.; El Swaify, S.A. y Bohlool, B.B. (1982) *Effect of salinity on Rhizobium growth and survival. Appl. Environ. Microbiol.* 44: 884-890.
- Sinsuwongwat, S.; Nuntagij, A.; Shutsrirung, A.; Nomura, M. y Tajima, S. (2002) *Characterization of local rhizobia in Thailand and distribution of malic enzymes. Soil Sci Plant Nutr.* 48: 719-727.
- Skerman, P.J. (1991) *Gramíneas tropicales. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal.* 23:1-730.
- Smit, G.; Logman, T.J.; Boerrigter, M.E.; Kijne, J.W. y Lugtenberg, B.J. (1989) *Purification and partial characterization of the Rhizobium leguminosarum bv viciae Ca²⁺- dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family Rhizobiaceae to plant root hair tips. J. Bacteriol.* 171: 4054-4062.
- Smit, P.; Limpens, E.; Geurts, R.; Fedorova, E.; Dolgikh, E.; Gough, C. y Bisseling, T. (2007) *Medicago LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. Plant Physiol.* 145: 183-191.
- Socolow, R.H. (1999) *Nitrogen management and the future of food: Lessons from the management of energy and carbon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 6001-6008.
- Soto, M.J.; Dominguez-Ferreras, A.; Perez-Mendoza, D.; Sanjuan, J. y Olivares, J. (2008). *Mutualism versus pathogenesis: The give-and-take in plant-bacteria interactions. Cell Microbiol.* 11 (39): 381-388.
- Spaepen, S.; Das, F.; Luyten, E.; Michiels, J. y Vanderleyden, J. (2009) *Indole-3-acetic acid-regulated genes in Rhizobium etli CNPAF512. FEMS Microbiol. Lett.* 291: 195-200.
- Spaink, H.P. (2000) *Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Annu. Rev. Microbiol.* 54: 257-288.
- Spies, P.R.; Brandon, N.J.; Date, R.A.; Bahnisch, L.M. y George, Y.D. (1998) *Nutrient limitations of clay soils for Desmanthus virgatus. II. A glasshouse study of 7 soils. Trop. Grasslands.* 32: 6-12.
- Sprent J.I. (1994) *Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? Plant Soil* 161: 1-10.
- Sprent J.I. (1995) *Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective Soil Biol. Biochem.* 27: 401-407.
- Sprent, J.I. (2008) *Evolution and Diversity of Legume Symbiosis. En: Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses (Eds.: Dilworth, M.J.; James, E.K; Sprent, J.I. y Newton, W.E) Springer, Netherlands. pp. 1-21.*
- Squartini, A.; Struffi, P.; Döring, H.; Selnska-Pobell, S.; Tola, E.; Giacomini, A.; Vendramin, E.; Velázquez, E.; Mateos, P.F.; Matínez-Molina, E.; Dazzo, F.B.; Casella, S. y Nuti, M.P. (2002) *Rhizobium sullae sp. nov. (formely 'Rhizobium hedysari'), the root-nodule microsymbiont of Hedysarum coronarium L. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1267-1276.

- Steenkamp, E.T.; van Zyl, E.; Beukes, C.W.; Avontuur, J.R.; Chan, W.Y.; Palmer, M.; Mthombeni, L.S.; Phalane, F.L.; Sereme, T.K. y Venter, S.N. (2015) *Burkholderia kirstenboschensis* sp. nov. *nodulates papilionoid legumes indigenous to South Africa*. Syst.Appl.Microbiol. 38(8):545-554.
- Stephens, J. y Rask, H. (2000) *Inoculant production and formulation*. Field Crop Res. 65: 249-258.
- Strain, S.R.; Leung, K.; Whittam, T.S.; de Bruijn, F.J. y Bottomley, P.J. (1994) *Genetic structure of Rhizobium leguminosarum biovar trifolii and viciae population found in two Oregon soils under different plant communities*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2772-2778.
- Streeter, J.G. (1988) *Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate*. CRC Cr. Rev. Plant Sci. 7: 1-23.
- Sugawara, M.; Epstein, B.; Badgley, B.D.; Unno, T.; Xu, L.; Reese, J.; Gyaneshwar, P.; Denny, R.; Mudge, J.; Bharti, A.K.; Farmer, A.D.; May, G.D.; Woodward, J.E.; Médigue, C.; Vallenet, D.; Lajus, A.; Rouy, Z.; Martinez-Vaz, B.; Tiffin, P.; Young, N.D. y Sadowsky, M.J. (2013) *Comparative genomics of the core and accessory genomes of 48 Sinorhizobium strains comprising five genospecies*. Genome Biology, 14 (2): 1-20.
- Sukkasame, P. y Phaikaew, C. (1998). *Utilisation of Desmanthus virgatus as Protein Supplement for Fattening Cattle in Southern Thailand*. En: *Integrated Crop-Livestock Production Systems and Fodder Trees* (Eds. de la Viña, A.C. y Moog, F.A.) 6th Meeting Regional Working Group on Grazing and Feed Resources for Southeast Asia, Legaspi City, Philippines, FAO. pp. 157-159.
- Suksombat, W. y Buakeeree, K. (2006) *Utilization of hedge lucerne meal (Desmanthus virgatus) as protein supplement in layer diets*. Suranaree. J. Sci. Technol. 13 (2): 181-187.
- Sun, J.; Cardoza, V.; Mitchell, D.M.; Bright, L.; Oldroyd, G. y Harris, J.M. (2006). *Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation*. Plant J. 46: 961-970.
- Surange, S.; Wollum II, A.G.; Kumar, N. y Natutiyal, C.S. (1997). *Characterization of Rhizobium from root nodules of leguminous trees growing in alkaline soils* Can. J. Microbiol. 43: 891-894.
- Sy, A.; Giraud, E.; Jourand, P.; García, N.; Willems, A.; de Lajudie, P.; Prin, Y.; Neyra, M.; Gillis, M.; Boivin-Masson, C. y Dreyfus, B. (2001) *Methylotrophic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes*. J. Bacteriol. 183: 214-220.
- Sylvester-Bradley, R. y Valdez, M. (1988) *Manejo del Ambiente Microbiológico del Suelo*. En: *Establecimiento y Renovación de Pasturas. Conceptos, experiencias y enfoque de la investigación* (Eds. Lascano, C.E. y Spain, J.M.) CIAT, Cali, Colombia. pp. 209-236.
- Sylvester-Bradley, R.; Kipe-Nolt, J. A.; Valencia G, C. A. y Medina, L. M. (1988). *The legume-rhizobium symbiosis: Evaluation, selection and agronomic management*.) CIAT, Cali, Colombia. (Series 04EL-01.03) 78 pp.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006) *Plant Physiology*. 4ta Ed. Sinauer Associates, Inc. USA. 764 pp.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. y Kumar, S. (2011) *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods*. Mol Biol Evol. 28:2731–2739.
- Tan, K.P. y Broughton, W.J. (1981) *Rhizobia in tropical legumes-XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions*. Soil Biol. Biochem. 13: 389-393.

- Tan, Z.Y.; Kan, G.X.; Wang, E.T.; Reinhold-Hurek, B. y Chen, W.X. (2001) *Rhizobium yanglingense* sp.nov. isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 901-914.
- Tang, M. (1986) *Factores que afectan la simbiosis Leguminosa-Rhizobium*. *Pastos y Forrajes*. 9 (3): 193-209.
- Tang, M.; Rodríguez, O. y Avila, V. (1994) *Efecto de las cepas nativas de Rizobios sobre varias leguminosas tropicales*. *Pastos y Forrajes*. 17: 45-50.
- Teamtisong, K. (2000) *Some Physiological and molecular biology aspects of high efficiency N₂-fixation rhizobial strains in forage legumes*. Tesis Master of Science in Biotechnology. Suranaree University of Technology. Thailand. 85 pp.
- Thies, J.E.; Singleton, P.W. y Bohlool, B.B. (1991) *Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced Rhizobia on field-grown legumes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 19–28.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994) *CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties, and weight matrix choice*. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Thrall, P.H.; Millsom, D.A.; Jeavons, A.C.; Waayers, M.; Harvey, G.R.; Bagnall, D.J. y Brockwell, J. (2005). *Seed inoculation with effective root-nodule bacteria enhances revegetation success*. *J. Appl. Ecol.* 42: 740–751.
- Tian, C.F.; Wang, E.T.; Wu, L.J.; Han, T.X.; Chen, W.F.; Gu, C.G.; Gu, J.G. y Chen, W.X. (2008) *Rhizobium favae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2871-2875.
- Toledo, I.; Lloret, L. y Martínez-Romero, E. (2003) *Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating *Acacia* spp. in Mexico. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 54-64.
- Triplett, E.W. y Sadowsky, M.J. (1992) *Genetics of competition for nodulation*. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 399-428.
- Trujillo, M.E.; Willems, A.; Abril, A.; Planchuelo, A.M.; Rivas, R.; Ludena, D.; Mateos, P.F.; Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2005) *Nodulation of Lupinus albus by strains of Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl. Environ. Microb.* 71: 1318-1327.
- Trujillo, W.; Pitman, W.D.; Chambliss, C.G. y Williams, K. (1996) *Effects of higt an frequency of cutting on yield, quality and persistence of Desmanthus virgatus*. *Trop. Grasslands* 30: 367-373.
- Tsai, S. M.; Bonetti, R.; Agbala, S.M. y Rossetto, R. (1993) *Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels*. *Plant Soil* 152: 131-138.
- Turner, S.L. y Young, J.P. (2000). *The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications*. *Mol. Biol. Evol.* 17: 309-319.
- Vachot-Griffin, A.M. y Thies, J.E. (2005) *Fingerprinting the Australian rhizobial inoculant mother cultures using refined PCR protocols yields beneficial inoculant management applications*. *Aust. J. Exp. Agr.* 45: 141-150.
- Valverde, A.; Velázquez, E.; Fernández-Santos, F.; Vizcaíno, N.; Rivas, R.; Mateos, P.F.; Martínez-Molina, E.; Igual, J.M. y Willems, A. (2005) *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1985-1989.

- Valverde, A.; Igual, J.M.; Peix, A.; Cervantes, E. y Velazquez, E. (2006) *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodules *Phaseolus vulgaris*. Int. J. Syst. Bacteriol. 56: 2631-2637.
- Van Berkum, P.; Beyene, D.; Bao, G.; Campbell, T.A. y Eardly, B. (1998) *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 13-22.
- Van Berkum, P.; Leibold, J.M. y Eardly, B.D. (2006) Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsh and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.). Syst. Appl. Microbiol. 29: 207-215.
- van Egerat, A.W.S.M. (1975) Changes in free ninhydrin positive compounds of young pea plants as affected by different nutritional and environmental conditions. Plant Soil. 42: 15-36.
- van Rhijn, P.; Goldberg, R.B. y Hirsch, A.M. (1998) *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. Plant Cell 10: 1233-1250.
- Vandamme, P. y Coenye, T. (2004) Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 2285-2289.
- Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; de Vos, P.; Kersters, K. y Swingset, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial. Microbiol. Rev. 60 (2): 407-438.
- Vandamme, P.; Goris, J.; Chen, W.M.; de Vos, P. y Willems, A. (2002) *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. Syst. Appl. Microbiol. 25: 507-512.
- Velázquez, E.; Igual, J.M.; Willems, A.; Fernyez, M.P.; Munoz, E.; Mateos, P.F.; Abril, A.; Toro, N.; Normy, P.; Cervantes, M.; Gillis, M. y Martínez-Molina, E. (2001) *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1011-1021.
- Vermis, K.; Coenye, T.; LiPuma, J.J.; Mahenthalingam, E.; Nelis, H.J. y Vandamme, P. (2004) Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 54: 689-691.
- Versalovic, J.; Koeth, T. y Lupski, J.R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19: 6823-6831.
- Vidal, C.; Chantreuil, C.; Berge, O.; Mauré, L.; Escarré, J.; Béna, G.; Brunel, B. y Cleyet- Marel, J.C. (2009) *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metallicolous soil in Languedoc, France. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 850-855.
- Vincent, J. M. (1970) *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria* (Ed. Vincent, J.M.) Blackwell Scientific Publications, (IBP Handbook, n.15) Oxford. 164 pp.
- Vinuesa, P.; León-Barrios, M.; Silva, C.; Willems, A.; Jarabo-Lorenzo, A.; Pérez-Galdona, R.; Werner, D. y Martínez-Romero, E. (2005) *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 569-575.

- Walker, S.A.; Viprey, V. y Downie, J.A. (2000) *Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by nod factors and chitin oligomers*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97 (24): 13413-13418.
- Walkey, A. y Black, I.A. (1934) *An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method*. Soil Sci. 37: 27-38.
- Wang, E.T.; van Berkum, P.; Beyene, D.; Sui, X.H.; Dorado, O.; Chen, W.X. y Martínez- Romero, E. (1998) *Rhizobium huautlense sp. nov., a symbiont of Sesbania herbacea that has a close phylogenetic relationship with Rhizobium galegae*. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 687-699.
- Wang, E.T.; Rogel-Hernández, A.; Santos, A.G.; Martínez-Romero, J.; Cevallos, M.A. y Martínez-Romero, E. (1999a) *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 1479-1491.
- Wang, E.T.; van Berkum, P.; Sui, X.H.; Beyene, D.; Chen, W.X. y Martínez-Romero, E. (1999b) *Diversity of rhizobia associated with Amorpha fruticosa isolated from Chinese soils and description of Mesorhizobium amorphae sp. nov.* Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 51-65.
- Wang, E.T.; Martínez-Romero, J. y Martínez-Romero, E. (1999c) *Genetic diversity of rhizobia from Leucaena leucocephala nodules in Mexican soils*. Mol. Ecol. 8: 711-724.
- Wang, E.T.; Martínez, J. y López-Lara, I. (2001) *Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas*. En: *Microbios*. (Eds. Martínez-Romero, E. y Martínez-Romero, J.) Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno. Univ. Nac. Autónoma de México. México. <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/>
- Wang, E.T.; Tan, Z.Y.; Willems, A.; Fernández-López, M.; Rinhold-Hurek, B. y Martínez Romero, E. (2002) *Sinorhizobium morelense sp. nov., a Leucaena leucocephala-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1687-1693.
- Wang, F.Q.; Wang, E.T.; Liu, J.; Chen, Q.; Sui, X.H.; Chen, W.F. y Chen, W.X. (2007) *Mesorhizobium albiziae sp. nov., a novel bacterium that nodulates Albizia kalkora in a subtropical region of China*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 1192-1199.
- Wang, F.; Wang, E.T.; Wu, L.J.; Sui, X.H.; Li, Jr.Y. y Chen, W.X. (2011) *Rhizobium vallis sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 2582-2588.
- Wang, J.Y.; Wang, R.; Zhang, Y.M., Liu, H.C.; Chen, W.F.; Wang, E.T.; Sui, X.H. y Chen, W.X (2013a) *Bradyrhizobium daqingense sp. nov., isolated from soybean nodules*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 616-624.
- Wang, Y.C.; Wang, F.; Hou, B. C.; Wang, E.T.; Chen, W.F., Sui, X.H., Chen, W.X., Li, Y. y Zhang, Y.B. (2013b). *Proposal of Ensifer psoraleae sp. nov., Ensifer sesbaniae sp. nov., Ensifer morelense comb. nov. and Ensifer americanum comb. nov.* Syst. Appl. Microbiol. 36: 467-473.
- Watkin, E.L.J.; O'Hara, G.W.; Howieson, J.G. y Glenn, A.R. (2000) *Identification of tolerance to soil acidity in inoculant strains of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*. Soil Biol. Biochem. 32: 1393-1403.
- Wei, G.H.; Wang, E.T.; Tan, M.E.; Zhu, M.E. y Chen, W.X. (2002) *Rhizobium indigoferae sp. nov. and Sinorhizobium kummerowieae sp. nov., respectively isolated from Indigofera spp. and Kummerowia stipulacea*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 2231-2239.

- Wei, G.H.; Wang, E.T.; Zhu, M.E.; Wang, E.T.; Han, S.Z. y Chen, W.X. (2003) *Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera Astragalus and Lespedeza grown in Loess Plateau region of China and description of Rhizobium loessense sp. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 1575-1583
- Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A. y Lane, D.J. (1991) *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.* J. Bacteriol. 173: 697-703.
- Wernegreen, J.J.; Harding, E.E. y Riley, M.A. (1997) *Rhizobium gone native: Unexpected plasmid stability of indigenous Rhizobium leguminosarum.* Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 94: 5483-5488.
- Wheatcroft, R.; McRae, D.G y Miller R.W. (1990) *Changes in the Rhizobium meliloti genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development.* Mol. Plant Microbe In. 3(1): 9-17.
- Wild, A. (1992) *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell.* (Ed. Mundi-Prensa). Madrid, España. 1045 pp.
- Willems, A. (2006) *The taxonomy of rhizobia: an overview.* Plant Soil. 287: 3–14.
- Willems, A. y Collins, M.D. (1993) *Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences.* Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 305-313.
- Willems, A.; Fernández-Lopez, M.; Muñoz-Adelantado, E.; Goris, J.; Vos, P.; Martínez-Romero, E.; Toro, N. y Gillis, M. (2003) *Description of new Ensifer strains from nodules and proposal transfer Ensifer adhaerens Cassida 1982 to Sinorhizobium as Sinorhizobium adhaerens comb. nov. Request for an opinión.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 1207-1217.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. (1990) *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.* Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.
- Woomer, P.; Singleton, P.W. y Bohlool, B.B. (1988) *Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils.* Appl. Environ. Microbiol. 54: 1112–1116.
- Wu, L.J.; Wang, H.Q.; Wang, E.T.; Chen, W.X. y Tian, C.F. (2011) *Genetic diversity of nodulating and non-nodulating rhizobia associated with wild soybean (Glycine soja Sieb. & Zucc.) in different ecoregions of China.* FEMS Microbiol. Ecol. 76: 439-450.
- Xu, J.; Li, X.L. y Luo, L. (2012) *Effects of engineered Sinorhizobium meliloti on cytokinin synthesis and tolerance of alfalfa to extreme drought stress.* Appl. Environ. Microbiol. 78: 8056-8061.
- Xu, L.; Shi, J.F.; Zhao, P.; Chen, W.M.; Qin, W.; Tang, M. y Wei, G.H. (2011) *Rhizobium sphaerophysae sp. nov., a novel species isolated from root nodules of Sphaerophysa salsula in China.* Antonie van Leeuwenhoek. 99: 845-854.
- Xu, L.M.; Ge, C.; Cui, Z.; Li, J. y Fan, H. (1995) *Bradyrhizobium liaoningense sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans.* Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 706-711.
- Yanagi, M. y Yamasoto, K. (1993) *Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer.* FEMS Microbiol. Lett. (107) 115-120.
- Yao, Z.Y.; Kan, F.L.; Wang, E.T.; Wei, G.H. y Chen, W.X. (2002) *Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus Lespedeza and description of Bradyrhizobium yuanmingense sp. nov.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 2219-2230.

- Yao, L.J.; Shen, Y.Y.; Zhan, J.P.; Xu, W.; Cui, G.L. y Wei, G.H. (2012) *Rhizobium taibaishanense* sp. nov., isolated from a root nodule of *Kummerowia striata*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 335-341.
- Yao, Y.; Sui, X.H.; Zhang, X.X.; Wang, E.T. y Chen, W.X. (2015) *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov. and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov., isolated from effective nodules of *Erythrophleum fordii*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65: 1831-1837.
- Yelton, M.M.; Yang, S.S.; Edie, S.A. y Lim, S.T. (1983) Characterization of an effective salt-tolerant fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*. J. Gen. Microbiol. 129: 1537-1547.
- Young, J.P.W. (1996) Phylogeny and taxonomy of rhizobia. Plant Soil. 186: 45-52.
- Young, J.M.; Kuykendall, L.D.; Martínez-Romero, E.; Kerr, A. y Sawada, H. (2001) Revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al, 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 89-103.
- Young, J.M. (2003) The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al 1988 and *Sinorhizobium morelense* Wang et al 2002 is a junior synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination "*Sinorhizobium adhaerens*" (Casida 1982) Willems et al 2002 legitimate? Request for an opinión. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 2107-2110.
- Young, J.P.W. y Wexler, M. (1988) Sym plasmid and chromosomal genotypes are correlated in field populations of *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 134: 2731-2739.
- Young, J.P.W.; Downer, H.L. y Eardly, B.D. (1991) Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of the 16S rRNA gene segment. J. Bacteriol. 173: 2271-2277.
- Yu, X.; Cloutier, S.; Tambong, J.T. y Bromfield, E.S.P. (2014) *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., a symbiotic nitrogen fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 3202-3207.
- Zabala, J.M.; Pensiero, J.F.; Tomas, P.A. y Giavedoni, J.A. (2008) Morphological characterisation of populations of *Desmanthus virgatus* complex from Argentina. Trop. Grasslands 42: 229-236.
- Zabala, J.M.; Giavedoni, J.A.; Tomas, P.A. y Budini, E.A. (2010) Variabilidad interpoblacional en variables morfológicas relacionadas con la implantación de *Desmanthus virgatus* L. (Will) y *Desmanthus paspalaceus* (Lindman) Burkart. Agriscientia, XXVII (2): 97-105.
- Zahran, H.H. (1991) Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. Biol. Fertil. Soils 12: 73-80.
- Zahran, H.H. (1998) Structure of root nodules and nitrogen fixation in Egyptian wild herb legumes. Biol. Plant 41: 575-585.
- Zahran, H.H. (1999) *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 968-989.
- Zahran, H.H. (2001) *Rhizobia* from wild legumes: Diversity taxonomy, ecology, nitrogen fixation, and biotechnology. J. Biotechnol. 91: 143-153.

- Zahran, H.H. (2009) *Enhancement of rhizobia–legumes symbioses and nitrogen fixation for crops productivity improvement*. In: *Microbial strategies for crop improvement* (Eds. Khan M.S; Zaidi, A. y Musarrat, J.) Springer, Germany. pp. 227-254.
- Zahran, H.H. (2010) *Legumes–microbes interactions under stressed environments*. In: *Microbes for legume improvement*. (Eds. Khan, M.S; Zaidi, A. y Musarrat, J.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 353-387.
- Zahran, H.H.; Rasanen, L.A.; Karsisto, M. y Lindstrom, K. (1994) *Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress*. World J. Microbiol. Biotechnol. 10: 100–105.
- Zahran, H.H.; Abdel-Fattah, M.; Ahmad, M.S. y Zaki, A.Y. (2003) *Polyphasic taxonomy of symbiotic rhizobia from wild leguminous plants growing in Egypt*. Folia Microbiol. 48: 510-520.
- Zahran, H.H.; Abdel-Fattah, M.; Yasser, M.M.; Mahmoud, A.M. y Bedmar, E.J. (2012) *Diversity and environmental stress responses of rhizobial bacteria from Egyptian grain legumes*. Aust. J. Basic Appl. Sci. 6 (10): 571-583.
- Zahran, H.H.; Chahboune, R.; Moreno, S.; Bedmar, E.J.; Abdel-Fattah, M.; Yasser, M.M. y Mahmoud, A.M. (2013) *Identification of rhizobial strains nodulating Egyptian grain legumes*. Int. Microbiol. 16 (3): 157-163.
- Zamora Natera, F.; Martínez Rodríguez, M.; Ruiz López, M, y García López, P. (2002) *Rendimiento y composición química del forraje de Huizachillo (Desmanthus virgatus L. var. depressus Willd) bajo condiciones de cultivo*. Rev. Fitotecnia Mexicana, 25 (3):317-320.
- Zerhari, K.; Aurag, K.; Khbaya, B.; Kharchaf, D. y Filali-Maltouf A. (2000) *Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating Acacia species in the arid and Saharan regions of Morocco*. Lett. Appl. Microbiol. 30: 351-357.
- Zhang, R.J.; Hou, B.C.; Wang, E.T.; Li, Y.Jr.; Zhang, X.X. y Chen, W.X. (2011). *Rhizobium tubonense sp. nov., isolated from root nodules of Oxytropis glabra*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 512-517.
- Zhang, J.J.; Liu, T.Y.; Chen, W.F.; Wang, E.T.; Sui, X.H.; Zhang, X.X.; Li, Y. y Chen, W.X. (2012a) *Mesorhizobium muleiense sp. nov., nodulating with Cicer arietinum L*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 2737-2742.
- Zhang, Y.J., Zheng, W.T., Overall, I., Young, J.P., Zhang, X.X., Tian, C.F., Sui, X.H., Wang, E.T. y Chen, W.X. (2015) *Rhizobium anhuiense sp. nov., isolated from effective nodules of Vicia faba and Pisum sativum*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65: 2960-2967.
- Zhang; Y.M.; Li, Y.J.; Chen, W.F.; Wang, E.T.; Sui, X.H.; Li, Q.Q.; Zhang, Y.Z.; Zhou, Y.G. y Chen, W.X. (2012b) *Bradyrhizobium huanghuaihaiense sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (Glycine max L.) nodules*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 1951-1957.
- Zhang, X.; Harper, R.; Karsisto, M. y Lindstrom, K. (1991) *Diversity of Rhizobium bacteria isolated from the root nodules of leguminous trees*. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 104-113.
- Zhao, C.T.; Wang, E.T.; Zhang, Y.M.; Chen, W.F.; Sui, X.H.; Chen, W.X.; Liu, H.C. y Zhang, X.X. (2012) *Mesorhizobium silamurunense sp. nov., isolated from root nodules of Astragalus species*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 2180-2186.

- Zheng, W.T.; Li, Y.Jr.; Wang, R.; Sui, X.H.; Zhang, X.X.; Zhang, J.J.; Wang, E.T. y Chen, W.X. (2013) *Mesorhizobium qingshengii* sp. nov., isolated from effective nodules of *Astragalus sinicus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 2002-2007.
- Zhou, P.F.; Chen, W.M. y Wei, G.H. (2010) *Mesorhizobium robiniae* sp. nov., isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 2552-2556.
- Zhou, S.; Li, Q.; Jiang, H.; Lindström, K. y Zhang, X. (2013) *Mesorhizobium sangaii* sp. nov., isolated from the root nodules of *Astragalus luteolus* and *Astragalus ernestii*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 2794-2799.
- Zilli, J.E.; Baraúna, A.C.; Da Silva, K.; De Meyer, S.E.; Farias, E.N.C.; Kaminski, P.E., Da Costa, I.B.; Ardley, J.K.; Willems, A.; Camacho, N.N.; Dourado, F.D.S. y O'Hara, G. (2014) *Bradyrhizobium neotropiale* sp. nov., isolated from effective nodules of *Centrolobium paraense*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 3950-3957.
- Zribi, K.; Mhamdi, R.; Huguet, T. y Aouani, M. (2005) Diversity of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* nodulating *Medicago truncatula* according to host and soil origins. World J. Microb. Biot. 21: 1009-1015.
- Zuckerlandl, E. y Pauling, L. (1965) *Evolutionary divergence and convergence in proteins*. En: *Evolving genes and proteins*. (Eds. Bryson, V. y Vogel, H.J.) Academic Press, New York. pp. 67-165.
- Zuloaga, F.O. y Morrone, O. (1999) *Catálogo de las plantas vasculares de la república Argentina. II. Dicotyledoneae*. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 74:1-1269.
- Zurdo-Piñero, J.L.; Rivas, R.; Trujillo, M.E.; Vizcaíno, N.; Carrasco, J.A.; Chamber, M.; Palomares, A.; Mateos, P.F.; Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2007) *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 784-788.