

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE RIZOBIOS NODULADORES DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO *MACROPTILIUM*

TONIUTTI, M. A.¹ FORNASERO, L.V.¹ TROD, B.S.¹

ZUBER, N.E.¹ & CÓRDOBA, M.S.¹

RESUMEN

Macroptilium atropurpureum y *Macroptilium bracteatum* son leguminosas de interés forrajero valoradas por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en relaciones simbióticas con rizobacterias. Aislados provenientes de nódulos de ambas especies del género *Macroptilium* fueron caracterizados fenotípicamente y a nivel funcional. Las diecinueve cepas estudiadas presentaron colonias pequeñas, translúcidas, poco gomosas y de crecimiento lento. En el análisis de agrupamiento, las cepas de referencia se diferenciaron claramente de los aislados en estudio, los cuales se agruparon formando cuatro conglomerados según la velocidad de crecimiento, tolerancia a temperaturas, niveles de pH, concentraciones de sales y resistencia a diferentes antibióticos. Se identificaron siete aislados capaces de crecer en condiciones de altas temperaturas, alcalinidad y/o salinidad, los cuales tendrían un uso potencial como biofertilizantes.

Palabras Claves: *Macroptilium atropurpureum*; *Macroptilium bracteatum*; rizobios; fenotípica; tolerancia a factores abióticos.

ABSTRACT

Functional and phenotypic characterization of nodular rhizobia from two species of *macroptilium* genus.

Macroptilium atropurpureum y *Macroptilium bracteatum* are legumes of forage interest recognized for their ability to fix atmospheric nitrogen in symbiotic relationships with rhizobacteria. Isolates coming from nodules of both *Macroptilium* species were characterized functional and phenotypically. The nineteen strains studied showed small colonies which were translucent, a bit gummy and low growth. In the grouping test, the previous strains clearly differed from the isolates under investigation. These gathered, making four mixtures according to the speed of growth,

1.- Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805.
(3080) Esperanza, provincia de Santa Fe. Email: matoniut@fca.unl.edu.ar

Manuscrito recibido el 12 de diciembre de 2014 y aceptado para su publicación el 5 de agosto de 2015.

temperature tolerance, pH levels, salt concentration and resistance to different antibiotics. Seven isolates capable of growing under conditions of high temperature, alkalinity and / or salinity which would have a potential use as biofertilizers were identified.

Key Words: *Macroptilium atropurpureum*, *Macroptilium bracteatum*, *rhizobia phenotypic tolerance to abiotic factors*.

INTRODUCCIÓN

El empleo de leguminosas nativas asociadas a gramíneas constituye un recurso eficiente para mantener el suelo con buenos niveles de fertilidad debido al nitrógeno transferido a la gramínea proveniente de la fijación simbiótica entre la leguminosa y los rizobios asociados (35,38,42) lo cual podría minimizar el uso de fertilizantes químicos generalmente costosos, de baja eficacia y alto impacto ambiental. Las especies de leguminosas nativas adaptadas a nuestras condiciones edafoclimáticas presentan un gran potencial de producción forrajera.

Entre estas especies se destacan las que pertenecen al género *Macroptilium*, tales como *M. atropurpureum* (MA) y *M. bracteatum* (MB), plantas herbáceas anuales o perennes y de ciclo primavera-verano-otoño (11,30). MA es una especie nativa de América que crece hasta el sur de Brasil, utilizada como forrajera en ambientes subtropicales y tropicales, existiendo dos cultivares, “Siratro” y “Aztec” (6, 8,32). *M. bracteatum* es una especie nativa de América y en Argentina se la encuentra en las regiones fitogeográficas Paranaense, Yungas y Chaqueña (23,33) de reconocido potencial forrajero, habiéndose liberado en Australia dos cultivares, “Cadarga” y “Juanita” (13,21,30).

Estas leguminosas, al igual que la mayoría de las especies forrajeras perennes presentan un crecimiento inicial lento como limitante para su implantación (5,10). Otro

de los factores determinantes de un establecimiento exitoso es una efectiva fijación biológica de nitrógeno a través de la simbiosis con rizobios noduladores (2,5,40).

Las leguminosas presentan distintos grados de especificidad en relación al rango de especies de rizobios capaces de nodularlas. En las Fabaceas, sub-familia *Papilionoideae* se encuentran las plantas más promiscuas o capaces de nodular efectivamente con varias especies de rizobios (24).

Entre ellas se destaca por su promiscuidad el género *Macroptilium* (22,34), siendo generalmente nodulado por *Bradyrhizobium* sp. aislado de diversas leguminosas, incluyendo especies de *Vigna*, *Lupinus*, *Ornithopus*, *Cicer*, *Sesbania*, *Leucaena*, *Mimosa*, *Lablab*, y *Acacia* (22) y por *B. japonicum* y *B. elkanii*, *simbiontes de Glycine max* (27). Asimismo, las plantas de *Macroptilium* también pueden ser noduladas por cepas de crecimiento rápido de los géneros *Rhizobium* y *Ensifer*, que se hallan filogenéticamente distantes de *Bradyrhizobium* como *E. meliloti* (7), *R. leguminosarum biovar trifolii*, y *R. leguminosarum bv. phaseoli* (41).

Por otro lado, diversos factores ambientales como acidez del suelo, temperaturas extremas o salinidad, serían perjudiciales para la supervivencia y diversidad de las poblaciones de rizobios nativos y para su capacidad de establecer asociaciones simbióticas (3,14). La caracterización fenotípica de los rizobios nativos adaptados a condiciones estresantes en los suelos cons-

tituye una de las primeras etapas para la obtención de un inoculante efectivo, que permita un mejor establecimiento de las leguminosas y con ello incrementar la producción agropecuaria y reducir el empleo de fertilizantes nitrogenados.

El objetivo de la presente investigación fue el aislamiento y la caracterización fenotípica y funcional de los rizobios simbiotes de *M. atropurpureum* y *M. bracteatum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron nódulos de dos especies del género *Macropodium*, *M. atropurpureum* y *M. bracteatum* a partir de ensayos de laboratorio en cámara de crecimiento para plantas, en condiciones controladas (28°C de temperatura, foto período de 16/8 horas luz/oscuridad), empleando un suelo proveniente de la localidad de Charata, provincia del Chaco (S 27° 13'; W 61° 11') con buena aptitud potencial para el cultivo de estas especies leguminosas. Las características químicas del suelo fueron 2,3% de materia orgánica, 0,146% de nitrógeno

orgánico total, 21ppm de fósforo asimilable, pH 6,5 y la conductividad eléctrica 2,6 dSm⁻¹. Se utilizaron diferentes accesiones de cada especie como “plantas trampa” para la obtención de los nódulos. En la Tabla 1 se detallan los accesos seleccionados, provenientes del Banco de Germoplasma de Forrajeras Tropicales del Departamento de Industrias Primarias de Australia (Australian Tropical Crops and Forage Collection).

Aislamiento y purificación de los rizobios

Para el procesamiento de los nódulos y aislamiento de rizobios se siguió la metodología descrita por Vincent (43). Los nódulos conservados en tubos con sílico-gel fueron rehidratados durante cinco horas en agua estéril. Se desinfectaron con agua oxigenada 30 volúmenes durante 3-4 minutos y luego se realizaron cinco lavados con agua destilada estéril. Los nódulos se maceraron y el producto obtenido se sembró en cajas de Petri con Agar Extracto de Levadura Manitol (LMA) e indicador rojo Congo (43). Posteriormente, fueron incubadas a 28°C durante 10 días y repicadas las colonias típicas de rizobios hasta colonia

Tabla 1: Accesos seleccionados provenientes del Banco de Germoplasma de Forrajeras Tropicales del Departamento de Industrias Primarias de Australia (Australian Tropical Crops and Forage Collection)

Especie	Id accesos	Origen	Id aislados
<i>M. atropurpureum</i>	AusTRCF 321058	Australia (cv Aztec)	MA1
<i>M. atropurpureum</i>	AusTRCF 82306	Cuba	MA2
<i>M. atropurpureum</i>	AusTRCF 82307	Cuba	MA3
<i>M. atropurpureum</i>	AusTRCF 91957	Cuba	MA4
<i>M. bracteatum</i>	AusTRCF 68892	Australia (cv Juanita)	MB9
<i>M. bracteatum</i>	AusTRCF 11833	Paraguay	MB11
<i>M. bracteatum</i>	AusTRCF 39099	Paraguay	MB41

Id: Código de identificación

pura, confirmando la pureza por su escaso ó nulo crecimiento en medio Peptona-glucosa-agar (PGA). Los aislados fueron autenticados por su habilidad de formar nódulos en la planta huésped (43) y conservados en tubos eppendorf con caldo LMA+glicerol en freezer a -20°C. Para la autenticación de los aislados se emplearon semillas de *Macropodium* las cuales fueron escarificadas manualmente con lija, desinfectadas y pregerminadas en placas de Petri con Agar-Agua 1% P/V e incubadas en estufa a 28°C.

Las plántulas se colocaron en macetas conteniendo como soporte perlita estéril, y fueron llevadas a la cámara de crecimiento a 26°C y foto período de 16/8 horas (luz/oscuridad) durante 45 días. Periódicamente se regaron con solución Jensen diluida (1/4). Los aislados se cultivaron en caldos LMA en agitación hasta obtener un título de 1.10^8 UFC/mL. Posteriormente se inocularon las plántulas con 1mL del caldo/maceta y permanecieron en la cámara hasta el final del ensayo donde fueron examinadas para comprobar la formación de nódulos.

Caracteres culturales

Los rizobios se caracterizaron fenotípicamente a través de caracteres culturales tales como tamaño, color y apariencia de las colonias en medio sólido, clasificándolas según las categorías sugeridas por el Centro de Agricultura Tropical (9). Las características morfológicas y respuesta a la tinción de Gram se observaron a través de un microscopio óptico. La velocidad de crecimiento se evaluó visualmente determinando el tiempo de aparición de las colonias en placas incubadas en estufa a 28°C. Si éstas fueron visibles a los 2-4 días de incubación, las cepas respectivas se consideraron de crecimiento rápido y si se observaron dentro de los 5-7 hasta 10 días se consideraron de crecimiento lento a muy lento (22).

Producción de ácido ó base

De cada aislado proveniente de medio LMA sólido se tomó una asada y se sembró en caldo LMA (pH 6,8) e indicador azul de bromo timol (0,5% en NaOH 0,016N). Los aislados fueron incubados en estufa a 28°C, durante diez días y se observó el cambio de color a azul (alcalinidad) ó amarillo (acidez).

Crecimiento a diferentes temperaturas

Los aislados se hicieron crecer en medio LMA y se incubaron a 28°C, 35°C y 40°C.

Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl y pH

Se determinó en placas con medio LMA conteniendo 0,01; 0,5; 1; 2 y 3% (p/v) de NaCl y con el pH ajustado a 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

Resistencia intrínseca a antibióticos

Se sembraron los aislamientos en medio LMA con adición de los siguientes antibióticos: Ampicilina (Amp) 20 y 40µg/mL Kanamicina (Kan) 10 y 40µg/mL, Gentamicina (Gent) 5 y 20µg/mL y Estreptomycin (Estrep) 20 y 100µg/mL. Los antibióticos se adicionaron al medio de cultivo luego de ser esterilizado en autoclave.

Para todos los estudios de autenticación y caracterización morfológica, fisiológica, bioquímica y de resistencia se emplearon cinco cepas de referencia: *B. liaoningense* USDA 3622T, *B. elkani* USDA 76T *B. yuanmingense* CCBAU10071T, *E. fredii* USDA 205T y *R. tropici* CIAT 899T.

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis multivariado para la estimación del patrón de variación entre las cepas estudiadas a partir de una matriz de 24 caracteres por 19 aislados, previa es-

tandarización de los datos. Para el análisis de agrupamiento se empleó la distancia de Jaccard, generando un dendrograma mediante el empleo del método UPGMA. A través del análisis de Componentes Principales (ACP) se calcularon las contribuciones de las variables en cada componente y las relaciones fueron representadas mediante un gráfico Biplot. Las distorsiones de los agrupamientos y del ACP fueron testeadas mediante el coeficiente de correlación fenotípica (CCC) (37), que es una medida de la distorsión interna de la técnica e indica el ajuste del gráfico respecto a los coeficientes de asociación originales y considera que valores de CCC mayores a 0,8 indican escasa distorsión. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico Infostat (15).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo, a partir de los ensayos de crecimiento en cámara bajo condiciones controladas fueron colectados veinte nódulos de cada acceso correspondiente a las dos especies en estudio. De los aislamientos realizados se seleccionaron un mínimo de dos cepas por acceso, conformando una colección de diecinueve aislados provenientes de plantas de *Macroptilium*, nueve de (MA) y diez de (MB).

Mediante la tinción de Gram se observó que la morfología de las células y sus características tintoriales se correspondían con las descritas para el grupo de los rizobios. En todos los aislados se observaron bacilos finos, Gram negativos y sin presencia de esporas (19).

En la Tabla 2 se muestran las características morfo-culturales y fisiológicas

estudiadas de los aislamientos y cepas de referencia. Los aislados presentaron crecimiento lento y extra-lento, siendo el tiempo de aparición de las colonias 5-6 días y 7-9 días respectivamente. Las colonias se caracterizaron por ser menores a un milímetro, circulares, con bordes regulares y presentar un color naranja translúcido y en ocasiones blanco hacia el centro. Además se identificaron por su escasa o ninguna producción de mucus y la excreción de base al medio, lo cual se evidenció por el cambio de coloración de verde a azul. Todas estas características morfo-fisiológicas coincidieron con las descritas para el género *Bradyrhizobium*, por lo que pudiera considerarse a estos aislados como posibles miembros de este género (44). Sería necesario emplear técnicas de taxonomía polifásica que incluye estudios moleculares que permitan su ubicación filogenética. Así como también los genes involucrados en la fijación biológica de nitrógeno, para establecer relaciones con otras bacterias fijadoras ya que es una característica ancestral de amplio espectro filogenético, y el estudio de los genes de la nodulación, los cuales son marcadores de la coevolución de los rizobios con su hospedero y su origen biogeográfico (17).

Los aislamientos obtenidos, provenientes de (MA) y (MB), se caracterizaron de acuerdo a la tolerancia a factores abióticos. En relación a la temperatura, el 90% de los aislados mostraron un crecimiento óptimo a 35°C, mientras que las cepas MA49, MB64 y MB68 toleraron temperaturas de 40°C. Estudios realizados por Munévar y Wollum (29) hallaron que las cepas de rizobios fueron capaces de crecer a temperaturas entre 27 y 45°C.

Las cepas provenientes de las dos especies en estudio crecieron adecuadamente en

Tabla 2: Características morfo-culturales y fisiológicas de los aislados de *M. artropurpureum* (MA), *M. bracteatum* (MB) y cepas de referencia.

Id aislamiento	Id accesio- nes	Morfología colonia		Aspec- to	Tasa de cre- cimiento en medio LMA	Producción de ácido-base
		Tamaño(mm)	color			
MA44	MA1	<1	translúcido	seco	-	-
MA46	MA2	<1	translúcido	seco	-	-
MA47	MA2	<1	translúcido	seco	-	+
MA49	MA3	<1	translúcido	seco	-	-
MA50	MA3	<1	translúcido	seco	-	-
MA52	MA4	<1	translúcido	seco	-	-
MA55	MA4	<1	translúcido	seco	-	-
MA80	MA3	<1	translúcido	seco	-	-
MA81	MA1	<1	translúcido	seco	-	-
MB64	MB9	<1	translúcido	seco	-	+
MB65	MB9	<1	translúcido	seco	-	-
MB66	MB9	<1	translúcido	seco	-	+
MB68	MB11	<1	translúcido	seco	-	-
MB69	MB11	<1	translúcido	seco	-	-
MB71	MB11	<1	translúcido	seco	-	-
MB74	MB41	<1	translúcido	seco	-	-
MB77	MB41	<1	translúcido	seco	-	-
MB78	MB41	<1	translúcido	seco	-	-
MB79	MB41	<1	translúcido	seco	-	-
<i>B. elkani</i>	-	<1	blanca	seco	-	-
<i>B. liaoningense</i>	-	<1	blanca	seco	-	-
<i>B. yuanmingense</i>	-	<1	blanca	seco	-	-
<i>E. fredii</i>	-	2-4	semi-translúcido	mucoso	+	+
<i>R. tropicci</i>	-	2-4	semi-translúcido	mucoso	+	+

Id: Código de identificación:

(+) crecimiento rápido 2- 4 días

(-) crecimiento lento y extra-lento 5 - 7 a 9 días.

(+) producción de ácido a los 10 días

(-) producción de base a los 10 días.

un rango de pH entre 5 y 8, mientras que ninguna se desarrolló en acidez extrema (pH 4). La mayoría de los aislados toleraron condiciones de alcalinidad, destacándose que el 70% de las cepas simbiotes de (MB) se desarrollaron a pH 10, mientras que los aislados de (MA) alcanzaron el 30% del total. Estos resultados contradicen a lo presentado por Hamdi (20) quien sitúa a las especies de *Bradyrhizobium* entre las menos tolerantes a la alcalinidad, así como los datos de Ezura *et al.* (17) quienes afirman que no es común encontrar un buen desarrollo de los rizobios en pH igual o mayor a 8.

El nivel de salinidad en el suelo puede afectar el crecimiento y la supervivencia de los rizobios, disminuyendo la colonización de la raíz de la planta, inhibiendo el proceso de infección, deteriorando el funcionamiento activo del nódulo y la fijación de nitrógeno (25,36,39). En este trabajo solo el 30% de los aislamientos son tolerantes a NaCl al 0,5%, las cepas MA52 y MB77 crecieron hasta 1% de NaCl y la cepa MB68 se desarrolló a 2% de NaCl. En general los aislados de estas especies son sensibles a la presencia de sal de sodio en el medio al igual que las cepas de referencia del género *Bradyrhizobium* utilizadas. En los niveles extremos de NaCl no se encontraron cepas tolerantes, a excepción del aislamiento MB68, lo cual coincide con Elsheikh y Word; Mpeperekí *et al.*; Odee, *et al.* (16,28,31) quienes no obtuvieron crecimiento con cepas de *Bradyrhizobium* sp. en concentraciones mayores a 1%.

En relación a resistencia intrínseca a antibióticos todos los aislamientos de (MA) fueron resistentes a Ampicilina y el 70% de los aislados de (MB) toleraron las concentraciones más altas ensayadas (40 µg/mL).

La Gentamicina indujo el 100% de re-

sistencia en las cepas de (MB), siendo solo la cepa MA80 sensible a este antibiótico. Todos los aislamientos son sensibles a Kanamicina y Estreptomina salvo la cepa MB79 que tolera hasta 10 µg/mL de Kanamicina y la cepa de referencia *R. tropici* crece a concentraciones de 100 µg/mL de Estreptomina. Si bien la variación en la resistencia de cada cepa puede ser notable, en general los rizobios de crecimiento rápido son más sensibles que los de crecimiento lento a la Estreptomina, contrariamente, en este trabajo las cepas de crecimiento lento fueron más sensibles. Estudios realizados por Alarcón *et al.*; Cuadrado *et al.* (1,12) obtuvieron resultados similares.

El dendrograma de la Figura 1 elaborado con base a 24 atributos relacionados a velocidad de crecimiento, tolerancia a diferentes temperaturas, rangos de pH, acidez o alcalinidad, concentración de sales y resistencia a diferentes antibióticos permitió reconocer seis grupos principales de actividad metabólica.

El grupo I incluyó las cepas de referencia *R. tropici* y *E. fredii*, de crecimiento rápido, productoras de acidez, tolerante a pH ácido y resistentes a Ampicilina, Gentamicina y Estreptomina (100 µg/mL) para *R. tropici*. El grupo II lo constituyó el aislamiento MB79 sensible a pH extremos, no toleró concentraciones de NaCl superiores a 0,01 g/L y creció en los niveles inferiores de los rangos de antibióticos empleados. Dentro del grupo III las cepas MB66 y MA47 se caracterizaron por crecer a 35°C, no toleraron sales, produjeron acidez y mostraron resistencia a los antibióticos Ampicilina y Gentamicina. El grupo IV está representado por dos cepas de la especie (MB), MB64 y MB68, toleraron elevadas temperaturas (40°C), pH 10, y concentraciones moderadas de Ampicilina y Gentamicina, siendo

Fig. 1: Dendrograma UGMA de las cepas autóctonas y de referencia relativas a todas las características fenotípicas provenientes de *M. artropurpureum* (MA) y *M. bracteatum* (MB) de la localidad de Charata, Pcia de Chaco.

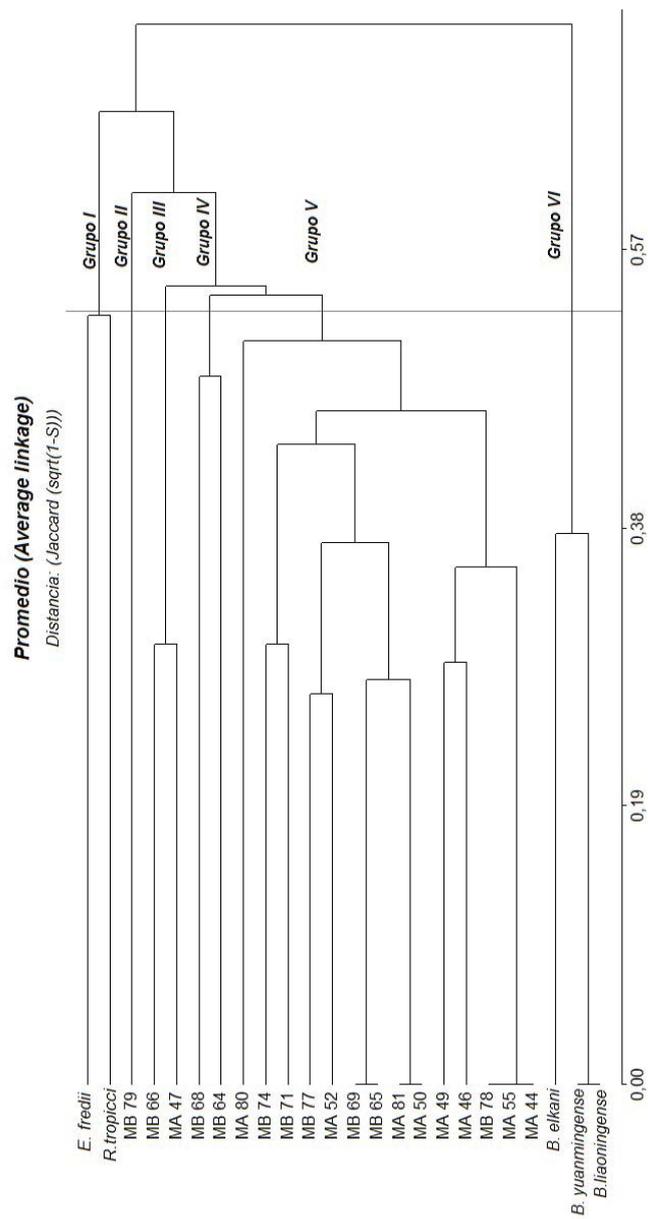


Fig. 2: Gráfico Biplot a partir del Análisis de Componentes Principales. Los valores porcentuales en el rótulo de cada eje del componente 1 y 3 indican la proporción de la variación total. Se resaltan las cepas con mejor perfil como potenciales biofertilizantes.

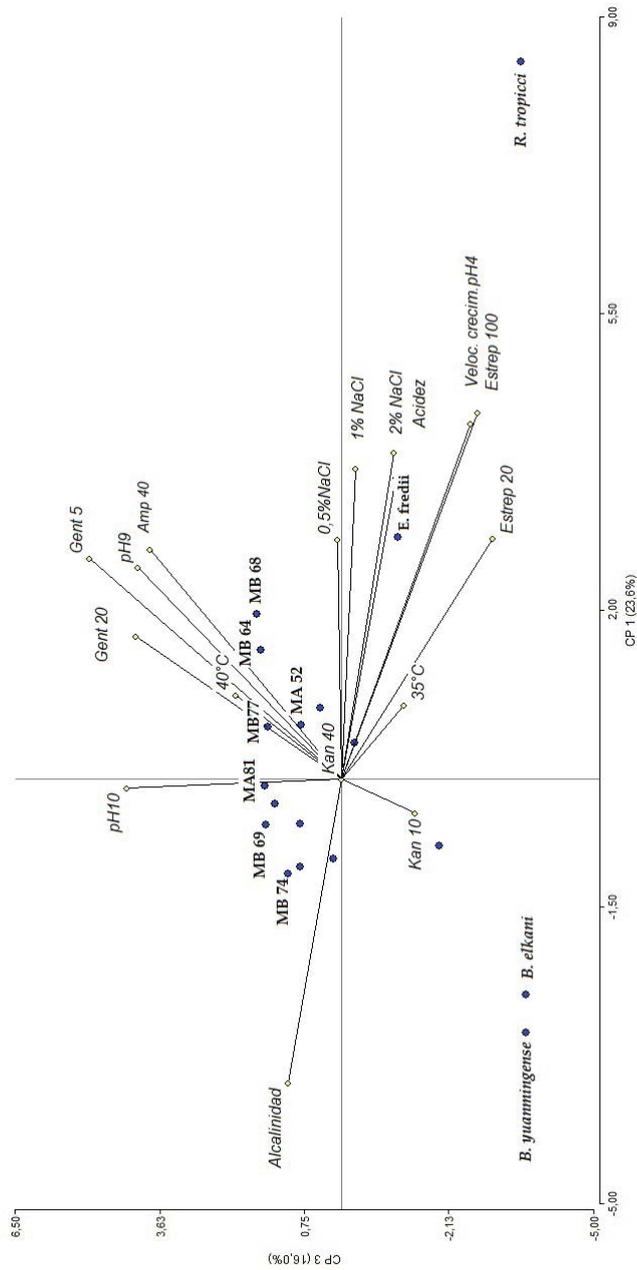


Tabla 3: Cepas de rizobios con mejor perfil para ser empleadas como potenciales biofertilizantes

Cepas*	Temperatura 40°C	pH 10	Salinidad	
			1%NaCl	2%NaCl
MA49	+	-	-	-
MA52	-	-	+	-
MA81	-	+	-	-
MB64	+	-	-	-
MB68	+	-	+	+
MB74	-	+	-	-
MB77	-	+	+	-

+: Crecimiento - : No crecimiento

*seleccionadas en base a su resistencia a condiciones adversas: concentración de NaCl superior al 0,5%, alcalinidad y temperatura.

además la MB68 tolerante a concentraciones del 2% de NaCl. El grupo V estuvo representado por el 82% de los aislados nativos de ambas especies de *Macroptilium*, se caracterizaron por crecer a temperaturas hasta 35°C, pH 5–8, alcanzando el 57% de los aislados desarrollo a pH10. Además fueron sensibles a la salinidad, sólo las cepas MA52 y MB77 toleraron 1% de NaCl.

Son sensibles a los antibióticos Kanamicina y Estreptomycin y tolerantes a Ampicilina y Gentamicina, excepto el aislado MA80 a Gentamicina 20 µg/ml y MB74 y MB77 a Ampicilina 40 µg/mL. El grupo VI está integrado por las cepas de referencia *B. elkani*, *B. liaoningense* y *B. yuanningense*, de crecimiento lento, productoras de alcalinidad y sensibles a pH extremos, salinidad y todos los antibióticos ensayados.

Por otro lado, en el ACP, las tres primeras componentes explicaron el 63% de la variación total, mostrando correspondencia con los resultados obtenidos en el análisis de agrupamiento. Las variables de mayor peso en el componente 1 fueron tolerancia a pH4, producción de acidez y resistencia a

Estreptomycin, y las de mayor peso en el componente 3 la resistencia a los antibióticos Ampicilina y Gentamicina, y desarrollo a pH 9 y 10 (Fig. 2). El valor del CCC fue 0,963 por lo que se consideró muy buena la representación gráfica asegurando fiabilidad y consistencia al dendrograma y al ACP con la matriz de similitud.

En la selección de cepas para ser utilizadas como posibles biofertilizantes además de considerar la capacidad de formar nódulos, fijar nitrógeno, sobrevivir en el suelo y en las semillas, y la estabilidad genética, es importante conocer su capacidad para tolerar condiciones de estrés como temperatura, pH, alcalinidad, antibióticos, entre otros, que permitan adaptarse y competir frente a condiciones ambientales adversas. En total, de las 19 cepas estudiadas, 7 aislados presentaron resistencia a algunos de los factores ensayados (Tabla 3). El crecimiento en diversos rangos de NaCl, alcalinidad y temperatura elevadas permitiría considerar a estas cepas de gran importancia para el estudio de la función ecológica de los rizobios en el ecosistema.

Este trabajo, basado en el estudio de características culturales, tintoriales y fisiológicas permitió ubicar a los aislados como posibles miembros del género *Bradyrhizobium*. Un grupo de cepas presentaron tolerancia a los factores ensayados por lo que consideramos necesario continuar con la selección de rizobios para las diferentes especies de *Macroptilium*, así como la clasificación más precisa de los aislados mediante el empleo de técnicas moleculares.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto CAI+D UNL. N° 610/13

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **ALARCÓN, E.P.; LOZANO, A. Y CHAPARRO, H.** 1997. Caracterización fenotípica de los aislamientos rizobianos de Acacia (*Acacia sp.*) y Retamo (*Teline monpessulana*). Rev. Colom. Quim, 26 (2): 21-33.
- 2.- **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. Agric. Res. 50(6): 909-924.
- 3.- **BALA, A.; MURPHY, P.J.; OSUNDE, A.O. Y GILLER, K.E.** 2003. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. Appl. Soil Ecol. 22(3): 211–223.
- 4.- **BÉCQUER, C. J.** 1998. Diversidad genética y posición taxonómica de rizobios, aislados de leguminosas forrajeras nativas en Sancti-Spiritus, Cuba, Tesis de Maestría, Universidad de La Habana. Cuba.
- 5.- **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. Agric. 37(1): 27-34.
- 6.- **BRAY, R.A. Y WOODROFFE, T.D.** 1994. *Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urban (atro) cv. Aztec. Aust. J. Exp. Agr. 35(1):121-121.
- 7.- **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(5): 369–372.
- 8.- **CAMERON, D.G.** 1985. Tropical and subtropical pasture legumes Siratro (*Macroptilium atropurpureum*): the most widely planted subtropical legume. Queens. Agric. J., 111:45-49.
- 9.- **CIAT.** 1988. Simbiosis leguminosa-rizobio. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Proyecto CIAT-UNDP. Cali, Colombia. 178 p.
- 10.- **COOPER, C.S.** 1977. Growth of the legume seedling. Adv. Agr. 29: 119-139.
- 11.- **COVAS, G.** 1978. Forrajeras indígenas: Especies que requieren un plan de conservación de germoplasma. Cienc. Inv. 34: 209-213.
- 12.- **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.

- 13.- DALZELL, S.A.; BRANDON, N.J. Y JONES, R.M. 1997. Response of *Lablab purpureus* cv. Highworth, *Macroptilium bracteatum* and *Macrotyloma daltonii* to different intensities and frequencies of cutting Trop. Grassl. 31:107-113.
- 14.- DIOUF, D.; SAMBA-MBAYE, R.; LE-SUEUR, 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 Microb. Ecol. 54(3):553-566.
- 15.- DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M. Y ROBLEDO, C.W. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- 16.- ELSHEIKH, E.A.E. Y WORD, M. 1995. Nodulation and N₂ fixation by soybean inoculated with salt tolerant rhizobia or salt-sensitive Bradyrhizobia in saline soil. Soil Biol. Biochem. 27 (4/5) 65-661.
- 17.- EZURA, H.; NUKUI, N.; YUHASHI, K.-I. Y MINAMISAWA, K. 2000. In Vitro plant regeneration in *Macroptilium atropurpureum* a Legume with a broad symbiont range for nodulation. Plant Science, 159(1): 21-27.
- 18.- FERNÁNDEZ, C. Y NOVO, R. 1988. En: Vida microbiana en el suelo. Universidad de La Habana, ed. Puebla y educación. 525 p.
- 19.- GARRITY, G. M. Y HOLT, J.G. 2001. The road map to the manual. Bergey's Manual of systematic bacteriology. Second Edition, vol. I. (Eds. Boone, D. R., Castenholz, R. W. y Garrity, G. M.). Springer-Verlag, New York, USA, p. 119.
- 20.- HAMDY, Y. A. 1985. La fijación biológica del nitrógeno, FAO Eds., Roma, 1985.
- 21.- JONES R.M. Y REES, M.C. 1997. Evaluation of tropical legumes on clay soils at four sites in southern inland Queensland. Trop. Grassl. 31:95-106.
- 22.- JORDAN, D.C. 1984. *Bradyrhizobium*, in: Krieg, N.R. y Holt, J.G. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, p. 242-244.
- 23.- JUAREZ F.C. Y PEREZ, S.M. 1987. El género *Macroptilium* (Fabaceae) en la Provincia de Salta, Argentina. Anales INTA Salta 1:31-42.
- 24.- LLORET, L. Y MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2005. Evolución y filogenia de Rhizobium. Rev. Latinoam. Microbiol. 47(1-2): 43-60.
- 25.- KASSEM, M.; CAPELLANO, A. Y GOUNOT, A.M. 1985. Effets du chlorure sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficiencia de *Rhizobium meliloti*. MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotech. 1(1):63-75.
- 26.- MARTÍNEZ-VIERA, R. 1986. En: Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo. Editorial Científico-Técnica. La Habana. 167 p.
- 27.- MINAMISAWA, K.; ONODERA, S.; TANIMURA, Y.; KOBAYASHI, N.; YUHASHI, K. Y KUBOTA, M. 1997. Preferential nodulation of *Glycine max*, *Glycine soja* and *Macroptilium atropurpureum* by two *Bradyrhizobium* species *japonicum* and *elkanii*, FEMS Microbiol. Ecol. 24(1):49-56.
- 28.- MPEPEREKI, S.; MAKONESE, F. Y WOLLUN, A.G. 1997. Physiological characterization of indigenous rhizobia nodulating *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. Symbiosis. 22: 275-292.
- 29.- MUNÉVAR, F. Y WOLLUM, A. G. 1981. II, Effect of high root temperature and *Rhizobium* strain on nodulation, nitrogen fixation, and growth of soybeans, Soil Sci. Soc. Am. J., 45(6) 1113-1120.

- 30.- NICHOLS, P.; LOI, A.; NUTT, B.J.; EVANS, P.M.; CRAIG, A.D.; PENGENLY, B.C.; DEAR, B.S.; LLOYD, D.L.; REVELLA, C.K.; FAIR, R.M.; EWINGA, M.A.; HOWIESONA, J.G.; AURICHT, G.A.; HOWIE, J.H.; SANDRAL, G.A.; CARRA, S.J.; DE KONING, C.T.; HACKNEY, B.F.; CROCKER, G.J.; SNOWBALLA, R.; HUGHES, S.J.; HALL, E.J.; FOSTERA, K.J.; SKINNERA, P.W.; BARBETTI, M.J. Y YOU, M.P. 2007. New annual and short-lived perennial pasture legumes for Australian agriculture—15 years of revolution. *Field Crops Res.* 104(1):10-23.
- 31.- ODEE, D. W.; SUTHERLAND, J.M.; MAKATIANI, E.T.; MCINROY, S.G. Y SPRENT, J.I. 1997. Phenotypic characteristic and composition of rhizobia associated with wood legumes growing in diverse Kenyan conditions. *Plant and Soil.* 188(1):65-75.
- 32.- ORAM, R.N. 1990. *Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urban cv. Siratro (reg. No. B-10a-11) Register of Australian Herbage Plant Cultivars. (CSIRO, Australia). p. 239.
- 33.- PEREZ, S.M.; CAMARDELLI, M.C.; JUAREZ, F.; BIANCHI, A.R. Y NEWMAN, R. 1999. Geographical distribution of *Macroptilium* species in Argentina. *Trop. Grassland* 33:22-33.
- 34.- RIDGE, W.R.; KIM, R. Y YOSHIDA, F. 1998. The diversity of lectin-detectable sugar residues on root hair tips of selected legumes correlates with the diversity of their host ranges for rhizobia, *Protoplasma* 202(1-2):84-90.
- 35.- RUMBUGH, M. Y JOHNSON, D. 1986. Annual medics and related species as re-sending legumes for Northern Utah pastures. *J. Range Management*, 39:52-58.
- 36.- SINGLETON, P.W.; EL SWAIFY, S.A. Y BOHLOOL, B.B. 1982. Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(4): 884-890.
- 37.- SOKAL, R. R. Y ROHLF, F. J. 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11:33-40.
- 38.- SPRENT, J. I. 2008. Evolution and diversity of legumes symbiosis. In: Dilworth, M.J.; James, E. K.; Sprent, J. I. y Newton, W.E. (Eds.). *Nitrogen fixing Leguminous Symbioses. Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress* 7:1-21.
- 39.- SUNITA SHEOKAND, S.; DUDEJA, S. Y SWARAJ, K. 2012. Nitrogen fixation in tropical environments—Adaptive responses and benefits. *Res. on Crops.* 13(2):743-753.
- 40.- THRALL, P. H.; MILLSOM, D. A.; JEA-VONS, 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(4):740–751.
- 41.- TRINICK, M.J.; MILLAR, C. Y HADOBAS, P.A. 1991. Hadobas, Formation and structure of root nodules induced on *Macroptilium atropurpureum* inoculated with various species of *Rhizobium*, *Can. J. Bot.* 69(7): 1520–1532.
- 42.- VALLEJOS, G. 1981. Asociación de gramíneas y leguminosas tropicales. *Agron. U.N. Noreste (Chaco-Argentina)* 1:5-19.
- 43.- VINCENT, J.M. 1970. *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria.* IBP Handbook No. 15, Blackwell Scientific, Oxford.
- 44.- WANG, T.; ROMERO-MARTÍNEZ, J. Y LÓPEZ-LARA, I. 2001. *Rhizobium* y su destacada simbiosis. En: E. Martínez-Romero y J. Martínez-Romero (eds.). *Microbios. Centro de investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno.* Universidad Nacional Autónoma de México, México.