



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

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

**CARACTERIZACIÓN SIMBIÓTICA Y MOLECULAR DE
RIZOBIOS NODULADORES DE *DESMODIUM INCANUM*
AISLADOS DE CENTRO Y NORTE DE ARGENTINA**

Ing. Agr. MARÍA ANTONIETA TONIUTTI

Director de Tesis: Dra. María Florencia DEL PAPA

Co-director de Tesis: Dr. José Francisco PENSIERO

Lugar de realización:

Laboratorio e Biología Aplicada y Biotecnología – Facultad de Ciencias Agrarias (UNL)
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular- Facultad de Ciencias Exactas (UNLP-CONICET)

-2020-

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Agrarias de la Facultad de Ciencias Agrarias ha sido realizado en la Facultad de Ciencias Agrarias (UNL) y en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (UNLP-CONICET) bajo la dirección de la Dra. María Florencia Del Papa y la codirección del Dr. José Francisco Pensiero.

Agradecimientos:

A mi directora la Dra. María Florencia Del Papa por su confianza, guía y permanente colaboración durante el desarrollo de la tesis y sobre todo por su generosidad y amistad brindada.

A mi co-director por sus aportes, colaboración ante todas mis consultas y sobre todo sus viajes de colecta que permitieron dar inicio a este trabajo.

A Laura, mi compañera y amiga de Cátedra por su apoyo, colaboración, sostén en momentos difíciles y compartir tantas horas de trabajo.

Alumnos adscriptos Matías, Juan, Nicolás y Betiana por su interés y dedicación.

Al Dr. Antonio Lagares Director del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) UNLP por su generosidad y apoyo.

Al Dr. Francisco Albicoro y Dra. Carla Martini del IBBM por su colaboración en técnicas de biología molecular.

A la Dra. Andrea Reutemann del Laboratorio de microscopía de la Facultad de Ciencias Agrarias.

A las instituciones: Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ciencias Agrarias e IBBM-CONICET por brindarme espacio físico y apoyo económico.

Para mi familia Oscar, Esteban y Alejandro por su compañía, amor, tolerancia y ayuda.

A mis padres por estar siempre a mi lado.

A mis amigas de la vida Laura, Patricia y Margarita, por soportar mi ausencia pero estar siempre cerca.

A mi hermano Carlitos y mi abuela Antonieta muy importantes en mi vida.

TRIBUNAL EVALUADOR

Dra. María Julia ESTRELLA (CONICET-UNSAM)

Dr. Fabricio Darío CASSÁN (CONICET-UNRC)

Dr. Laureano FRIZZO (FCV-UNL)

TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS DURANTE EL TRANCURSO DE ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

Publicaciones en revistas internacionales con referato:

- **Relacionadas con este trabajo de Tesis Doctoral**

1. Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from *Desmodium incanum* DC in Argentina: phylogeny, biodiversity and symbiotic ability.

Toniutti M.A.; L.V. Fornasero; F.J. Albicoro; M.C. Martini; W.O. Draghi; F. Alvarez; A. Lagares; J.F. Pensiero; M.F. Del Papa.
Syst. Appl. Microbiol. 2017. 40, 297–307.

- **Otras (no relacionadas con este trabajo de Tesis Doctoral)**

2. Phenotypic, molecular and symbiotic characterization of the rhizobial symbionts of *Desmanthus paspalaceus* (Lindm.) Burkart that grow in the Province of Santa Fe, Argentina.

Fornasero L.V, M.F Del Papa, J.L. López, F.J Albicoro, J.M Zabala, M.A Toniutti; J.F Pensiero, A Lagares.
PLoS One. 2014. Aug 25, 9(8):e104636. ISSN 1932-6203

Publicaciones en congresos relacionadas con este trabajo de Tesis Doctoral

1. Caracterización simbiótica de aislamientos locales noduladores de *Desmodium incanum* en condiciones hidropónicas e invernadero.

María Antonieta Toniutti, Francisco Albicoro, Laura Fornasero, Walter Draghi, Antonio Lagares, María Florencia Del Papa.

IV CAMAyA Cuarto Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental y I MicroGen Primer Jornada de Microbiología General. Mar del Plata. 11 al 13 de Abril de 2018.

2. Diversity of the rhizobial symbionts of the *Desmodium incanum* that grow in Argentina.

Toniutti, M.A.; Albicoro, F; Fornasero, L.; Pensiero, F.; Lagares, A.; Del Papa, M.F.

SAMIGE X Congreso Argentino de Microbiología General. Asociación Argentina de Microbiología General. Mar del Plata. 2 al 4 de Julio de 2014.

3. Caracterización fenotípica y genotípica de rizobios aislados de dos poblaciones de *Desmodium incanum* DC del norte de Argentina.

Toniutti, M., Albicoro, F., Fornasero, L. Del Papa, M.

XIII Congreso Argentino de Microbiología. II Congreso Microbiología Agrícola y Ambiental. Asociación Argentina de Microbiología. Revista. Resumen. Buenos Aires. 23 al 26 de septiembre de 2013.

4. Programa de documentación, conservación y valoración de forrajeras nativas en la FCA (UNL), Santa Fe, Argentina.

Juan Marcelo Zabala; José Francisco Pensiero; B. Rosso; G. Schrauf; P. Tomas; J. Giavedoni; H. Gutierrez; E. Exner; V. Kern; A. Bortoluzzi; Laura Viviana Fornasero; María Antonieta Toniutti; L. Marinoni; C. Cerino; G. Richard.

VIII Simposio Internacional de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. Libro. Artículo Completo. Simposio. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP. Ecuador. Quito. 2011.

5. Colección, caracterización y evaluación de recursos forrajeros nativos.

Pensiero, José, F.; Zabala, J. M.; Giavedoni, J.; Gutierrez, H.; Tomas, P.; Exner, E.; Widerhorn, P.; A. Bortoluzzi, A.; Fornasero, L.V.; Toniutti, M. A.; Marinoni, L.; Rosso, B.; G. Schrauf; Gabutti, E.; Aliscioni, S.; Taleisnik, E.

Jornadas de Mejoramiento Genético de Forrajeras. Argentina. Instituto Fitotécnico de Santa Calanina. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. La Plata. 2010.

6. Caracterización fenotípica y tolerancia a factores abióticos de cepas de *Desmanthus virgatus* y *Desmodium incanum* provenientes del Centro Norte de Argentina.

G. Richard; C. Cerino; L. V. FORNASERO; M. A. TONIUTTI.

X Jornada de Ciencias Naturales del Litoral. Libro. Facultad de Humanidades y Ciencias UNL. CONICET. Santa Fe. 18 al 21 de Octubre de 2009.

7. Patrón de nodulación de *Desmodium incanum* proveniente distintos ambientes del centro-norte argentino.

Toniutti, M.A.; Fornasero, L.V.

X Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral. Reunión Argentina de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencia y Tecnología Universidad Autónoma de Entre Ríos. Paraná. Noviembre de 2006.

Tesis Doctoral - Toniutti María Antonieta

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

	Página
Tribunal de este trabajo de Tesis doctoral	II
Trabajos científicos publicados durante el transcurso de este trabajo de Tesis doctoral	III
Índice general	VII
Índice de figuras	XI
Índice de tablas	XIII
Abreviaturas	XV
Resumen	XVII
Abstract	XIX

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. El ciclo biológico del nitrógeno	2
I.2. Fijación biológica de nitrógeno	3
I.3. Las leguminosas	6
1.3.1. Género <i>Desmodium</i> Desv.	8
1.3.2 <i>Desmodium incanum</i> (Sw.) DC.	10
1.3.2.1. Morfología	11
1.3.2.2 Adaptabilidad a las condiciones del medio	13
1.3.2.3 Importancia de la especie	14
1.3.2.4. Otras especies de <i>Desmodium</i>	14
I.4. Los rizobios como microsimbiontes	15
I.4.1 Taxonomía	16
I.4.1.1 Familia <i>Bradyrhizobiaceae</i>	17
I.4.1.2 Especies actualmente descritas del género <i>Bradyrhizobium</i>	18
I.5. Estadio de vida libre y colonización radicular	20
I.6. Desarrollo del estado simbiótico	21
I.6.1. Las etapas tempranas de preinfección	21
I.6.1.1. Quimiotaxis y colonización radicular	21
I.6.1.2. Secreción de flavonoides e inducción de genes <i>nod</i>	22
I.6.1.3. Síntesis de factores de nodulación (FN) lipo-quito-oligosacáridicos	23
I.6.1.4. Otros determinantes de especificidad	25
I.6.1.5. El proceso de adsorción a la superficie radicular	27
I.6.2. La infección	28
I.6.3. Fijación simbiótica de nitrógeno – Expresión de la nitrogenasa	34
I.6.4. Competencia de los rizobios por el nicho simbiótico. Transferencia horizontal de genes y modificaciones de la capacidad simbiótica	35
I.7. Factores ambientales que inciden sobre el establecimiento de las asociaciones simbióticas rizobio-leguminosa.	36
I.7.1. Acidez del suelo	37

I.7.2. Temperatura	38
I.7.3. Salinidad	39
I.7.4. Humedad	41
I.7.5. Deficiencia de nutrientes	41
Hipótesis y Objetivos de este trabajo	44

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Poblaciones de estudio de <i>D. incanum</i> y aislamientos de rizobios	47
II.1.1. Poblaciones de estudio de <i>D. incanum</i>	47
II.1.2. Aislamiento de rizobios a partir de nódulo	48
II.1.3. Aislamiento de rizobios a partir de muestras de suelo	48
II.1.4. Colección de aislamientos noduladores de <i>D. incanum</i>	49
II.2. Cepas bacterianas y medios de cultivo para rizobios	51
II.2.1. Cepas bacterianas	51
II.2.2. Medios de cultivo y conservación de rizobios	52
II.2.3. Conservación de cepas	53
II.3. Evaluación de la sensibilidad rizobiana a los estreses abióticos que operan en los suelos poblados de <i>D. incanum</i>	53
II.4. Técnicas de biología molecular	53
II.4.1. Preparación de una solución de ADN a partir de microorganismos cultivados en medio sólido	53
II.4.2. Preparación de una solución de ADN a partir de microorganismos cultivados en medio líquido	54
II.4.3. Condiciones generales de PCR	54
II.4.4. Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>nifH</i>	55
II.4.5. Amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>nodC</i>	55
II.4.6. Amplificación por PCR de secuencias internas del gen 16S ARNr	55
II.4.7. Obtención de perfiles de <i>fingerpint</i> de ADN mediante la amplificación genómica con primers BOXA1R y MBOREP1	55
II.4.8. Electroforesis de ADN: Separación e identificación de fragmentos de ADN	56
II.4.9. Purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa	57
II.4.10. Determinación de las concentraciones de ADN en una muestra	58
II.4.11. Secuenciamiento de fragmentos de ADN	58
II.5. Programas informáticos destinados al análisis de secuencia	58
II.6. Identificación y clasificación de rizobios por MALDI-TOF MS	59
II.7. Ensayos con plantas	60
II.7.1. Desinfección y germinación de semillas	60
II.7.2. Preparación del cultivo bacteriano e inoculación de las plántulas	61
II.7.3. Condiciones de cultivo de plantas en cámara de crecimiento	62
II.7.4. Estimación de la FBN en condiciones hidropónicas	62
II.7.5. Ensayos de compatibilidad simbiótica	62

II.7.6. Ensayos en suelo no estéril	63
II.7.6.1. Determinación del número de rizobios en las muestras de suelo	64
II.7.6.2. Diseño experimental ensayo con suelo no estéril	65
II.7.6.3. Estudio anatómico de los nódulos	66
II.8. Análisis estadístico de los datos	66

CAPÍTULO III. POBLACIONES DE *DESMODIUM INCANUM* SELECCIONADAS COMO MATERIAL DE ESTUDIO

III.1. Antecedentes generales.	69
III.2. Resultados y discusión	71
III.2.1. Poblaciones de <i>Desmodium incanum</i> seleccionadas	71
III.2.2. Ubicación y caracterización fitogeográfica de las poblaciones de <i>Desmodium incanum</i> estudiadas	73
III.2.3. Características edafoclimáticas de los lugares de colecta de las poblaciones de <i>Desmodium incanum</i>	76

CAPÍTULO IV. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE RIZOBIOS ASOCIADOS SIMBIÓTICAMENTE A *DESMODIUM INCANUM* PRESENTES EN SUELOS DE ARGENTINA

IV.1. Antecedentes generales.	83
IV.2. Resultados y discusión	86
IV.2.1. Establecimiento de una colección de rizobios noduladores de <i>Desmodium incanum</i> recuperados de suelos argentinos	86
IV.2.2. Caracterización morfológica y fenotípica de la colección de rizobios noduladores de <i>Desmodium incanum</i>	91
IV.2.3. Caracterización de la tolerancia a factores abióticos de la colección de rizobios noduladores de <i>Desmodium incanum</i>	94

CAPÍTULO V. DIVERSIDAD GENOTÍPICA Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE RIZOBIOS SIMBIONTES DE *DESMODIUM INCANUM* PRESENTES EN SUELOS DE ARGENTINA

V.1. Antecedentes generales.	109
V.2. Resultados y discusión.	114
V.2.1. Caracterización genotípica de los rizobios noduladores de <i>D. incanum</i>	114
V.2.2. Selección de aislamientos para avanzar en el estudio de sus relaciones filogenéticas.	120
V.2.3. Relaciones filogenéticas de los aislamientos seleccionados mediante el análisis de secuencias correspondientes al ARNr 16S, el gen <i>nodC</i> y análisis del espectro de masas de células enteras obtenido mediante MALDI TOF MS.	122
V.2.3.1. Identificación taxonómica de rizobios noduladores de <i>D. incanum</i> mediante amplificación y secuenciamiento de un fragmento interno del gen ARNr 16S	122

V.2.3.2. Identificación de los rizobios mediante la técnica MALDI TOF MS	125
V.2.3.3. Amplificación y secuenciación de un fragmento interno del gen <i>nodC</i>	129

CAPÍTULO VI. CARACTERIZACIÓN SIMBIÓTICA DE AISLAMIENTOS LOCALES NODULADORES DE *DESMODIUM INCANUM* EN CONDICIONES HIDROPONICAS E INVERNADERO

VI.1 Antecedentes generales.	138
VI.2 Resultados y discusión.	141
VI.2.1. Estimación de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) de rizobios locales en simbiosis con <i>Desmodium incanum</i> en condiciones hidropónicas con soporte inerte.	141
VI.2.1.1 Evaluación de la biomasa vegetal.	142
VI.2.1.2. Caracterización de la nodulación.	148
VI.2.2 Evaluación de la compatibilidad simbiótica de los aislamientos seleccionados en cuatro leguminosas huésped elegidas para este estudio.	152
VI.2.3 Caracterización del comportamiento de aislamientos locales noduladores de <i>Desmodium incanum</i> en condiciones de suelo no estéril e invernadero.	156

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Discusión general	172
Conclusiones y Perspectivas	174

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias	179
-------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura I.1	Esquema general del desarrollo de un nódulo determinado.	5
Figura I.2	Clave artificial para diferenciar las especies argentinas de <i>Desmodium</i> .	9
Figura I.3	<i>Desmodium incanum</i> D.C.	10
Figura I.4	Distribución geográfica de <i>Desmodium incanum</i> en Argentina.	11
Figura I.5	<i>Desmodium incanum</i> : Morfología.	12
Figura I.6	Fruto completo, semilla y plántula de <i>Desmodium incanum</i> .	13
Figura I.7	Estructura molecular básica de los flavonoides.	22
Figura I.8	Estructura general del lipo-quito-oligosacárido o factor Nod.	24
Figura I.9	Esquema general de la simbiosis rizobio-leguminosa.	26
Figura I.10	Desarrollo coordinado de las raíces durante la nodulación.	29
Figura I.11	Enrulado del pelo radical y desarrollo del hilo de infección.	30
Figura I.12	Esquema de corte longitudinal de un nódulo indeterminado y determinado.	32
Figura II.1	Mapa de las provincias y sitios de muestreo de las poblaciones de <i>D. incanum</i> .	47
Figura II.2	Estrategia empleada para la obtención de la colección de rizobios noduladores de <i>D. incanum</i> .	50
Figura II.3	Semillas germinadas de <i>D. incanum</i> a 72 h de incubación a 28° C.	60
Figura III.1	Región de muestreo de <i>Desmodium incanum</i> DC.	72
Figura IV.1	Amplificación de una región interna del gen <i>nifH</i> por PCR.	89
Figura IV.2	Amplificación de una región interna del gen <i>nodC</i> por PCR.	89

Figura IV.3	Establecimiento de una colección de rizobios noduladores de <i>D. incanum</i> .	89
Figura IV.4	Morfología macroscópica de colonias representativas de la colección de rizobios noduladores de <i>Desmodium incanum</i> .	92
Figura IV.5	Análisis de Componentes Principales 1 y 2.	101
Figura IV.6	Análisis de Componentes Principales 2 y 3.	102
Figura V.1	Perfiles de amplificación de ADN genómicos de los aislamientos noduladores de <i>Desmodium incanum</i> .	115
Figura V.2	Dendrogramas obtenidos a partir del análisis de los perfiles BOXAR1-PCR utilizando el coeficiente de similitud de Dice y el agrupamiento UPGMA.	117
Figura V.3	UPGMA-dendrogramas (Coef. de similitud de Dice) derivados de las huellas dactilares BOXA1R-PCR de los aislamientos noduladores de <i>D. incanum</i> en Argentina.	119
Figura V.4	Relaciones filogenéticas entre las regiones ADNr 16S de diferentes rizobios incluyendo los simbiontes seleccionados de <i>D. incanum</i> .	124
Figura V.5	Espectros de masas de las células enteras obtenidos mediante MALDI TOF MS.	126
Figura V.6	Espectro de masas de las células enteras obtenido mediante MALDI TOF MS. Aislamientos seleccionados de cada población <i>D. incanum</i> .	127
Figura V.7	Relaciones filogenéticas entre fragmentos de los genes <i>nodC</i> de diferentes rizobios incluyendo los simbiontes de <i>D. incanum</i> presentes en suelos Argentina.	132
Figura VI.1	Número de nódulos promedio en plantas de <i>D. incanum</i> inoculadas con los rizobios seleccionados y cultivadas en soporte estéril en cámara de crecimiento para plantas.	149
Figura VI.2	Masa seca de nódulos en plantas de <i>D. incanum</i> inoculadas con los rizobios seleccionados y cultivadas en soporte estéril en cámara de crecimiento para plantas.	151
Figura VI.3	Ensayo de inoculación de plantas de <i>P. vulgaris</i> y <i>M. lathyroides</i> con los aislamientos seleccionados.	153
Figura VI.4.	Desarrollo de las plantas de <i>D. incanum</i> a los 60 días de trasplantadas en macetas con suelo no estéril.	158
Figura VI.5.	Efecto de los tratamientos de inoculación sobre el número y peso seco de nódulos de <i>D. incanum</i> cuando crecieron en macetas con suelo no estéril.	159
Figura VI.6.	Efecto de los tratamientos de inoculación sobre el peso seco de las plantas de <i>D. incanum</i> cuando crecieron en macetas con suelo no estéril.	161
Figura VI.7	Relación entre la masa seca nodular y la masa seca aérea de las plantas. Relación entre la masa seca nodular y el nitrógeno total acumulado en la parte aérea de las plantas.	162

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla I.1	Especies del género <i>Bradyrhizobium</i> formadoras de nódulos en leguminosas y planta huésped donde fue aislada.	19
Tabla II.1	Poblaciones de plantas de <i>D. incanum</i> en sus respectivos suelos de origen y procedencia de las plantas trampa.	49
Tabla II.2	Cepas bacterianas de referencia y aislamientos utilizados en este trabajo.	51
Tabla II.3	Secuencia de los <i>primers</i> utilizados en las distintas reacciones de PCR.	56
Tabla II.4	Características físico-químicas del suelo utilizado en el análisis del comportamiento simbiótico de rizobios noduladores de <i>D. incanum</i> en suelo no estéril.	64
Tabla III.1	Poblaciones de <i>Desmodium incanum</i> seleccionadas. Provincias, localidades y georeferenciamiento.	71
Tabla III.2	Distritos fitogeográficos donde se encuentra <i>Desmodium incanum</i> .	72
Tabla III.3	Características edafológicas de los suelos en los lugares de colecta de las poblaciones de <i>Desmodium incanum</i> .	78
Tabla III.4	Características químicas de los suelos de origen de las poblaciones de <i>Desmodium incanum</i> provenientes de distintas regiones ecológicas de Argentina.	79
Tabla IV.1	Evaluación de caracteres morfológicos y nodulación de plantas de <i>Desmodium incanum</i> cultivadas con sus respectivos suelos de origen en condiciones controladas de laboratorio.	87
Tabla IV.2	Colección de aislamientos de rizobios provenientes de poblaciones de <i>Desmodium incanum</i> de Argentina.	90
Tabla IV.3	Características morfológicas macroscópicas de los rizobios noduladores de <i>Desmodium incanum</i> aislados en este trabajo de tesis.	93
Tabla IV.4	Características morfológicas macroscópicas de las cepas de referencia utilizadas.	93
Tabla IV.5	Evaluación de la tolerancia a factores abióticos de las cepas de referencia utilizadas en este estudio.	95
Tabla IV.6	Evaluación de la tolerancia a factores abióticos de los aislados de <i>D. incanum</i> provenientes distintas poblaciones del centro-norte de Argentina.	95
Tabla IV.7	Evaluación del crecimiento de rizobios noduladores de <i>D. incanum</i> , provenientes de distintas poblaciones del centro-norte de Argentina, bajo las condiciones detalladas.	96
Tabla IV.8	Contribución de cada variable y proporción de la variación total explicada para los tres primeros ejes del PCA.	100

Tabla V.1	Resumen de las características del crecimiento de los aislamientos seleccionados de la colección de rizobios noduladores de <i>D. incanum</i> bajo diferentes condiciones de estreses abióticos en medio LMA (Capítulo IV) y tipo de perfil genotípico observado.	121
Tabla V.2	Análisis de las secuencias del gen ARNr 16S de los aislamientos seleccionados.	123
Tabla V.3	Identificación de las cepas seleccionadas de la colección de rizobios noduladores de <i>D. incanum</i> mediante MALDI TOF MS.	128
Tabla V.4	Porcentaje de identidad de las secuencias <i>nodC</i> de los aislamientos simbioses de <i>D. incanum</i> seleccionados.	130
Tabla VI.1	Evaluación de las características morfológicas, biomasa aérea, radicular y la eficiencia relativa (ER) en plantas de <i>D. incanum</i> inoculadas con los aislamientos seleccionados de la Población P5 proveniente de la provincia de Chaco. Id de las plantas 6926.	143
Tabla VI.2	Evaluación de las características morfológicas, biomasa aérea, radicular y el índice de eficiencia relativa (ER) en plantas de <i>D. incanum</i> inoculadas con los aislamientos seleccionados de la Población P8 proveniente de la provincia de Santa Fe. Id de las plantas 6935.	145
TablaVI.3	Evaluación de las características morfológicas, biomasa aérea, radicular y el índice de eficiencia relativa (ER) en la fijación de nitrógeno en plantas de <i>D. incanum</i> inoculadas con los aislamientos seleccionados de la Población P9 proveniente de la provincia de Tucumán. . Id de las plantas 6992.	146
TablaVI.4	Evaluación de las características morfológicas, biomasa aérea, radicular y el índice de eficiencia relativa (ER) en la fijación de nitrógeno en plantas de <i>D. incanum</i> inoculadas con los aislamientos seleccionados de la Población P10 proveniente de la provincia de Corrientes. Id de las plantas 6897.	147
Tabla VI.5	Evaluación de la capacidad de inducir la nodulación y fijación simbiótica de nitrógeno de los rizobios aislados de <i>D. incanum</i> en plantas de <i>P. vulgaris</i> , <i>V. sativa</i> , <i>M. lathyroides</i> y <i>G. max</i> .	153
Tabla VI.6	Materia seca aérea, radicular y número de nódulos de las plantas <i>P. vulgaris</i> y <i>M. lathyroides</i> inoculadas con los aislamientos seleccionados de <i>D. incanum</i> , cultivadas en condiciones de cámara de crecimiento de plantas durante 35 días.	155
Tabla VI.7	Contenido de nitrógeno. Nitrógeno total acumulado en la parte aérea de las plantas e índice de eficiencia relativa (ER) en la fijación de nitrógeno en plantas de <i>D. incanum</i> crecidas en macetas con suelo no estéril e inoculadas con las cepas indicadas.	163

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico ribosómico
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
ADP	Adenosin difosfato
bv	Biovar
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> , herramienta de búsqueda de alineamiento local básico
dNTPs	deoxirribonucleótidos
dS/m	Conductividad deciSiemens por metro
DO	Densidad Óptica
EPS	Exopolisacáridos
FN	Fijación de nitrógeno
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
<i>g</i>	Gravedades
HGT	Transferencia horizontal de genes
Kb	Kilobases
lat.	Lateral
LMA	Medio extracto de levadura manitol
long.	Longitud
M	Molar
μM	Micromolar
Mb	Megabases
MS	Materia seca
N ₂	Nitrógeno gaseoso
NE	Noreste
NF	Factor Nod
NH ₃	Amoníaco
<i>nif</i>	Genes implicados en la fijación de nitrógeno
NO	Óxido nítrico
N ₂ O	Óxido nitroso
<i>(nod)</i>	Genes de nodulación
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , marco de lectura abierto
pb	Pares de Bases
PB	Proteína bruta
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> , Análisis de componentes principales
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PGA	Medio Peptona Glucosa Agar
p/p	Gramos en 100 gramos

PSY	Medio Peptona – Sales minerales - extracto de levadura
pSyms	Plásmidos simbióticos
p/v	Gramos en 100 mililitros
SN	Senescencia nodular
snm	Sobre el nivel del mar
T	Tratamiento testigo
T+N	Tratamiento testigo más nitrógeno
TBE	Buffer tris-borato-EDTA
TE	Buffer tris-EDTA
TY	Medio Triptona Extracto de levadura
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
v/v %	Mililitros en 100 mililitros

En el marco de una agricultura sustentable la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) por rizobios en asociación simbiótica con leguminosas es un factor clave en la conservación de los suelos y la productividad de los cultivos. En el centro y norte de Argentina los pastizales nativos son la fuente principal de alimentos para el ganado. Entre las leguminosas que conforman el paisaje natural se encuentra *Desmodium incanum*, especie nativa de alto valor forrajero, adaptada a ambientes edafoclimáticos variados. Su importancia nutricional se debe principalmente al contenido de nitrógeno al establecer relaciones simbióticas con los rizobios del suelo. El objetivo de esta tesis fue caracterizar a nivel funcional y molecular los rizobios noduladores de *D. incanum* en ecosistemas de Argentina y evaluar sus propiedades simbióticas como recurso en la selección de cepas como posibles inoculantes. Para ello, establecimos una colección de rizobios nativos noduladores de *D. incanum* recuperados de ocho poblaciones localizadas en las provincias de Entre Ríos, Misiones, Formosa, Chaco, Tucumán, Santa Fe y Corrientes. Su amplia distribución geográfica permitió evidenciar que crece en zonas de clima tropical, subtropical y templado, y suelos variados, desde arenosos hasta arcillo- limosos. Se recolectaron 143 cepas nativas de las cuales el 95% provenían de plantas cultivadas en el laboratorio con los suelos de origen de las diferentes poblaciones ensayadas. Los aislados se caracterizaron fisiológica y genéticamente. Luego, se seleccionaron 16 aislamientos que se identificaron amplificando las secuencias parciales de ADNr 16S y *nodC* y por espectrometría de masas MALDI-TOF MS. El estudio de la asociación simbiótica con *D. incanum* se evaluó en ensayos en cámaras de crecimiento para plantas en hidroponía, e invernadero con suelo no estéril. La caracterización fenotípica de la colección permitió reconocer a la mayoría de los rizobios de crecimiento lento, muchos fueron tolerantes a altas temperaturas, salinidad y pH extremos. Además presentaron alta diversidad genética variando según el sitio de origen. Los aislamientos seleccionados principalmente pertenecían al género *Bradyrhizobium* estrechamente relacionado con *B. elkanii*, *B. japonicum* y *B. yuanmingense* y solo un aislamiento pertenecía al género *Rhizobium*. Los fragmentos *nodC* secuenciados mostraron una alta similitud de secuencia con genes *nodC* presentes en *B. elkanii*, dichas secuencias se agruparon en varios clados que contienen secuencias *nodC* de diversos *Bradyrhizobium*. Un grupo de aislados presentaron diferencias en la nodulación y produjeron un mayor peso seco de las plantas en comparación con las fertilizadas con nitrógeno cuando fueron cultivadas en hidroponía. Además, observamos que en ensayo con suelo no estéril la cepa *B. yuanmingense* P10 130 promovió un crecimiento aéreo vegetal significativamente mayor que el resto de los tratamientos inoculados, y tan alto como el observado en las plantas de control fertilizadas con N. También el mayor peso radicular permitió la detección de un posible efecto promotor del crecimiento vegetal de esta cepa. Los

resultados obtenidos en esta tesis constituyen una importante contribución al conocimiento a nivel funcional y molecular de los rizobios noduladores de *D. incanum* en ecosistemas de Argentina. Los aislamientos de la colección presentaron una gran heterogeneidad fenotípica, diversidad genética y amplia variación en términos de efectividad simbiótica. Hemos seleccionado la cepa *B. yuanmingense* P10 130 como un potencial candidato por su tolerancia a altas temperaturas, pH extremos y rendimiento simbiótico para avanzar en la selección de cepas más eficientes y con potencial interés agronómico para utilizarla como bioinoculante en *D. incanum*. La selección de cepas eficientes y adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de nuestro país indica que existe un amplio potencial para incrementar la FBN en la simbiosis rizobio-*D. incanum*.

Palabras clave: Desmodium incanum; rizobios; fijación biológica de nitrógeno.

ABSTRACT

In the framework of a sustainable agriculture the Biological Nitrogen Fixation (BNF) by rhizobia in symbiotic association with legumes is a key factor in the conservation of the soils and the productivity of the crops. In central and northern Argentina, native grasslands are the main source of food for livestock. Among the legumes that make up the natural landscape is *Desmodium incanum*, a native species of high forage value, adapted to varied edaphoclimatic environments. Its nutritional importance is mainly due to the nitrogen content when establishing symbiotic relationships with soil rhizobia. The objective of this thesis was to characterize at the functional and molecular level the *D. incanum*- nodulating rhizobia isolated from Argentinean ecosystems and to evaluate their symbiotic properties as a resource in the selection of strains as possible inoculants. For it, a collection of native *D. incanum* nodulating rhizobia recovered from eight populations located in the provinces of Entre Ríos, Misiones, Formosa, Chaco, Tucumán, Santa Fe and Corrientes was established. Its wide geographic distribution made it possible to show that it grows in zones of tropical, subtropical and temperate climate, and varied soils, from sandy to silty clay. In total 143 native strains were collected, 95% of which came from plants cultivated in the laboratory with the soils of origin of the different populations tested. The isolates were physiologically and genetically characterized. Then, sixteen isolates were selected which were identified by sequencing the 16S rDNA and *nodC* partial sequences and by MALDI-TOF MS mass spectrometry. The study of the symbiotic association with *D. incanum* was evaluated in growth chambers for plants grown in hydroponics, and using non-sterile soil assays in greenhouse. The phenotypic characterization of the collection allowed to recognize most of the slow growing rhizobia, many were tolerant to high temperatures, salinity and extreme pH. They also presented high genetic diversity varying according to the place of origin. The isolates selected mainly belonged to the genus *Bradyrhizobium* closely related to *B. elkanii*, *B. japonicum* and *B. yuanmingense* and only one isolate belonged to the genus *Rhizobium*. The sequenced *nodC* fragments showed high sequence similarity with *nodC* genes present in *B. elkanii*, these sequences were grouped into several clades containing *nodC* sequences of various *Bradyrhizobium*. A group of isolates showed differences in nodulation and produced a higher dry weight of the plants compared to those fertilized with nitrogen when they were cultivated in hydroponics. In addition, we observed that in the assays using non-sterile soil strain *B. yuanmingense* P10 130 promoted a significantly higher aerial plant growth when compared with the rest of the inoculated treatments, and as high as that observed in control plants fertilized with N. Also *B. yuanmingense* P10 130 has the highest radicular weight indicating a possible plant growth promoter effect of this strain. The results obtained in this thesis constitute an important

contribution to the functional and molecular knowledge of the *D. incanum*- nodulating rhizobia in ecosystems of Argentina. The isolates in the collection showed great phenotypic heterogeneity, genetic diversity and wide variation in terms of symbiotic effectiveness. We have selected strain *B. yuanmingense* P10 130 as a potential candidate due to its tolerance to high temperatures, extreme pH and symbiotic performance to advance in the selection of more efficient strains with potential agronomic interest to use it as a bioinoculant for *D. incanum*. The selection of efficient strains and adapted to the edaphoclimatic condition of our country indicates that there is a wide potential to increase FBN in the rhizobia-*D. incanum* symbiosis.

Key words: Desmodium incanum; rhizobia; biological nitrogen fixation.

Tesis Doctoral - Toniutti María Antonieta

CAPÍTULO I

Introducción General

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. El ciclo biológico del nitrógeno

El nitrógeno (N) es uno de los elementos más importantes en los sistemas biológicos y es constituyente de biomoléculas esenciales como ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, pigmentos y vitaminas. Tal como ocurre con el resto de los elementos químicos, en el medio ambiente se presenta en diferentes formas. En la naturaleza se encuentra principalmente en forma gaseosa y constituye aproximadamente el 79% de la atmósfera. A pesar de la abrumadora abundancia de este elemento en la atmósfera y rocas sedimentarias, el nitrógeno es un elemento que limita el crecimiento de plantas ya que éstas sólo son capaces de incorporarlo en sus formas reducidas (también llamadas combinadas), por ello el N es uno de los nutrientes más limitantes en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Dalton & Krammer, 2006) debido a que su forma gaseosa inerte (N_2) no es utilizable por la mayoría de los organismos vivos a excepción de los microorganismos fijadores de nitrógeno. Todo el requerimiento nutricional de nitrógeno de animales y humanos es incorporado, directa o indirectamente a partir de las plantas. Para que el nitrógeno gaseoso (N_2) pueda ser biológicamente disponible debe ser transformado ó “fijado” de su forma gaseosa a amoníaco (NH_3) y posteriormente asimilado por procesos bioquímicos. Esta transformación se denomina Fijación de Nitrógeno (FN) y requiere gran cantidad de energía para romper el triple enlace del N_2 . Se fija a través de procesos abióticos como descargas eléctricas, combustión de compuestos orgánicos y actividades volcánicas que liberan energía formando óxidos de N que posteriormente se disuelven en el agua de lluvia y llegan a la tierra en forma de NH_3 . A nivel mundial aproximadamente el 12% anual se fija de esta manera. Otra forma mediante la cual el N_2 es incorporado a la biósfera es la fijación industrial mediante el uso de altas temperaturas y presiones en el proceso de Haber – Bosch para la producción de fertilizantes químicos nitrogenados, fijándose anualmente un 20% del N global y consumiendo 3 – 5% del gas natural del mundo (Bottomley & Myrold, 2015).

El crecimiento demográfico constituye uno de los grandes problemas que debe enfrentar la humanidad. A consecuencia del incremento de la población mundial durante el último siglo, se han implementado nuevas prácticas agrícolas dentro de las cuales se destaca el comienzo de la utilización masiva de fertilizantes nitrogenados producidos industrialmente por el proceso Haber-Bosch (Olivares *et al.*, 2013). Si bien estos

fertilizantes han contribuido enormemente a una producción alimentaria suficiente para sostener el crecimiento de la población, los costos ecológicos asociados a la producción y utilización masiva de estos productos son evidentes en el suelo, el agua y el aire. La producción industrial de NH_3 a partir de N_2 requiere el empleo de grandes cantidades de energías no-renovables tales como gas y petróleo. En la agricultura, el uso de fertilizantes no sule las carencias de N a escala mundial y su producción tiene un alto costo económico y energético. La eficiencia de incorporación de nitrógeno en los cultivos es alrededor del 35%, por lo que el nitrógeno remanente en los suelos es utilizado por bacterias nitrificantes y desnitrificantes que contribuyen a las emisiones de NO_x y N_2O . La liberación de estos gases nitrogenados (N_2O , NO_x , NH_3) a la atmósfera, contribuye a la destrucción de la capa de ozono, al efecto invernadero y la lluvia ácida, por lo tanto a la contaminación del aire y al calentamiento global que constituyen un riesgo para el medio ambiente. Además, las prácticas de labranza intensivas contribuyen al escurrimiento superficial y percolación a las napas de agua subterráneas del nitrógeno residual, favoreciendo así la eutrofización de ríos y lagos (Vance, 2001; Fowler *et al.*, 2013; Olivares *et al.*, 2013). Estos son sólo algunos de los costosos efectos producidos por la fertilización química, que evidencian una necesidad de cambio de las prácticas agronómicas a procedimientos sustentables.

Por otro lado, una manera ecológica y económica de FN es a través de la actividad metabólica de microorganismos procariotas, llamados diazótrofos, conocida como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) que permite combinar el N_2 a presión atmosférica normal y temperatura ambiente gracias a un complejo enzimático conocido como nitrogenasa.

I.2.Fijación biológica de nitrógeno.

La FBN es la responsable del 65% del N biológicamente disponible que ingresa en los ecosistemas terrestres, unos 140 millones de toneladas métricas por año y que puede ser utilizado por las plantas, contribuyendo a la mejora y productividad de los cultivos (Galloway *et al.*, 2008).

La FBN es un proceso de reducción que convierte el N_2 en NH_3 cuya reacción es catalizada por la nitrogenasa, un complejo proteico que se encuentra exclusivamente en los organismos procariotas (Simms & Taylor, 2002). La nitrogenasa es un complejo multienzimático constituido por dos componentes proteicos, el dímero de componente II (Fe-proteína) codificada por los genes *nifH* y el tetrámero de componente I (molibdo-

hierro (Mo-Fe)- proteína codificada por los genes *nifD* y *nifK*. Para que la nitrogenasa actúe como catalizador de la reacción necesita ser activada por ATP que se hidroliza dando ADP y fosfato inorgánico. La cantidad de ATP utilizado por mol de nitrógeno reducido es variable según las condiciones y se estima entre 15 y 25 moles.

La enzima nitrogenasa es altamente sensible al oxígeno (O₂), inactivándose de forma irreversible, e incluso inhibiéndose su síntesis en presencia de este elemento. La protección al oxígeno de la nitrogenasa se debe a diferentes mecanismos, que para las bacterias simbióticas incluyen la síntesis de la leghemoglobina, nodulina tardía, asociada a la membrana que rodea al bacteroide. Como consecuencia de ello el interior del nódulo efectivo es de color rosa debido a las grandes cantidades de esta proteína. La leghemoglobina es una hemoproteína con hierro, cuyo grupo hemo es sintetizado por la bacteria y la porción proteica es sintetizada por la planta. Esta molécula suministra oxígeno al bacteroide a una tasa apropiada para que sea empleado de forma óptima como aceptor terminal de electrones de una cadena transportadora aeróbica que trabaja a bajas tensiones de este gas. Así permite que haya en el nódulo una tensión baja de oxígeno que no afecte a la actividad de la nitrogenasa. Una vez que en el interior del bacteroide se alcanza una tensión de oxígeno suficientemente baja, se inducen los genes *nif*, que codifican el complejo nitrogenasa y otras proteínas regulatorias involucradas en el control de la FBN.

La FBN contribuye con una parte considerable del N combinado en la Tierra y permite a algunas plantas crecer sin fertilizantes nitrogenados, evitando los problemas ambientales y económicos que ocasionan su síntesis y aplicación en los suelos.

Los microorganismos responsables de la FBN no constituyen un grupo taxonómico homogéneo, sino que están ampliamente distribuidos en grupos parafiléticos de bacterias y algunas arqueobacterias con diferentes estilos de vida y metabolismos (aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos, metanótrofos, en vida libre y en simbiosis) (Raymond *et al.*, 2004).

Los rizobios de vida libre sobreviven bien en el suelo y forman asociaciones superficiales con los tejidos radiculares. Un segundo grupo coloniza los tejidos internos y se los denomina endofíticos. Los fijadores simbióticos, sólo son capaces de fijar nitrógeno cuando se encuentran formando parte de una relación simbiótica con una planta huésped. Son parte de este grupo algunos géneros de actinomicetes (*Frankia*) y de cianobacterias (*Anabaena* y *Nostoc*), y el conjunto de α y β -proteobacterias conocidos

como rizobios que son capaces de establecer simbiosis con plantas leguminosas y formar nódulos en sus raíces (Wagner, 2011).

Los rizobios y leguminosas se asocian a través de un complejo proceso de interacción en el que la percepción recíproca a lo largo del camino simbiótico, sirve de señal de diferenciación para inducir cambios bioquímicos y morfológicos de ambos participantes, que finalizan en la formación nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de las plantas (Dudeja *et al.*, 2012).

El proceso de nodulación depende del intercambio de señales químicas entre la bacteria y la leguminosa como se observa en la figura I.1. Luego de una serie de eventos en el nódulo maduro los bacteroides reducen el N_2 a NH_3 (Krishnan & Bennet, 2006).

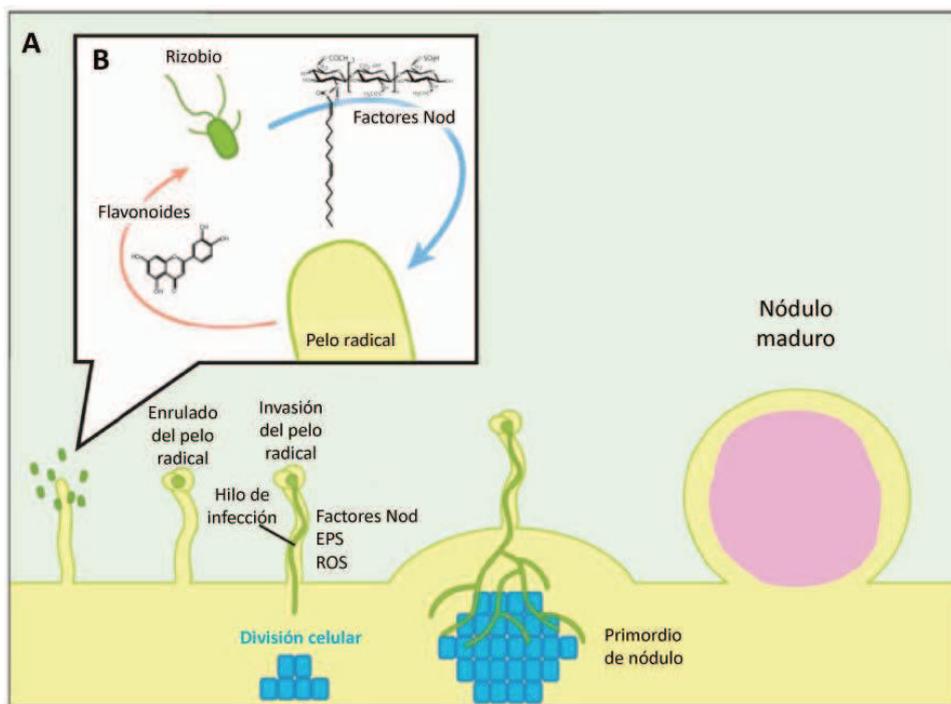


Figura I.1 Esquema general del desarrollo de un nódulo determinado (A) con las principales moléculas que intervienen en el reconocimiento (B). Los flavonoides secretados por la leguminosa en el suelo son percibidos por el rizobio que dispara la producción del factor Nod. Entre las respuestas generadas en el hospedador se produce el enrulado del pelo radical y su invasión. La invasión del pelo radical 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 nódular. Modificado de Gibson *et al.* (2008).

El amoníaco producido es transferido directamente a la planta en forma de amidas ó ureidos dependiendo del tipo de leguminosa. Este proceso le permite a la planta disponer de nitrógeno combinado para sus diferentes requerimientos metabólicos. Sin embargo y como veremos en las próximas secciones, las especies de rizobios no nodulan y fijan nitrógeno con cualquier leguminosa, es necesario que haya un cierto grado de

especificidad. Si bien el éxito de la asociación depende tanto del huésped vegetal como del rizobio, la misma se ve limitada muchas veces por factores climáticos y edáficos. Estos factores afectan a cada uno de los simbioses y al proceso de asociación en sí mismo (Sheokand *et al.*, 2012). En ese proceso, el número de nódulos finales está cuidadosamente regulado para evitar infecciones innecesarias que son energéticamente costosas para la planta. Así, dado que el nicho simbiótico está naturalmente limitado, acceden al mismo aquellas cepas del suelo que muestran las mejores cualidades en términos de capacidad asociativa (mayor competitividad simbiótica).

La inoculación de suelos con cepas seleccionadas por poseer máxima capacidad de fijación de nitrógeno ha resultado muchas veces poco eficiente. El principal impedimento para que estos rizobios seleccionados sean buenos inoculantes, ha sido su pobre capacidad de competir con los rizobios nativos por un nicho en la planta (Graham & Vance, 2000)

El género *Desmodium* ha sido estudiado en muchos países del mundo debido a la diversidad de especies, lugares de origen y variedad de usos (forrajero, medicinal, etc.) que presenta (Ohashi, 2005). La amplia distribución de *Desmodium incanum* en pastizales naturales del Centro y Norte del país, y el desconocimiento de las cepas de rizobios que la nodulan, la hacen una especie forrajera interesante para estudiar la biodiversidad de cepas de rizobios capaces de nodular esta planta en sus diferentes ambientes naturales.

I.3. Las leguminosas

La familia Leguminosae Juss. (Fabaceae Lindl.) es una de las más numerosas y diversas de las plantas con flores, de distribución cosmopolita y de gran importancia para el hombre al igual que las gramíneas, debido a su habilidad de establecer simbiosis con los rizobios (Graham & Vance, 2003). En función de ello, representa un importante papel en el mantenimiento de la sustentabilidad de los suelos y recuperación de áreas degradadas, participando activamente en el ciclo del nitrógeno (Vitousek *et al.*, 2013). Esta familia ocupa el tercer lugar luego de las familias Orchidaceae y Asteraceae y a ella pertenecen 727 géneros y 19.325 especies, distribuidas en 36 tribus (Lewis *et al.*, 2005). En Argentina habitan 113 géneros y 732 especies, de las cuales 156 son endémicas (Zuloaga & Morrone, 1999).

Históricamente se han reconocido para esta familia tres subfamilias: Caesalpinoideae, Mimosoideae y Papilionoideae (Burkart, 1939; 1952). Estudios filogenéticos basados en estructuras moleculares, indican que los representantes de la subfamilia Caesalpinoideae conforman un grupo parafilético, en contraste con las Mimosoideae y Papilionoideae que

son monofiléticas (Bremer *et al.*, 1998). Por lo dicho, se considera que el número de subfamilias podría ser superior a las tradicionalmente reconocidas (APG II, 2003; Haston *et al.*, 2009).

La subfamilia Mimosoideae DC. comprende 3.270 especies pertenecientes a 82 géneros y 4 tribus distribuidas en regiones tropicales y subtropicales, y algunos géneros en zonas templadas del mundo (Lewis *et al.* 2005). Las plantas presentan hábitos variados con especies arbóreas, arbustivas, lianas y herbáceas; hojas bipinnadas (excepcionalmente pinnadas); flores en general pequeñas, con los pétalos soldados en la base, actinomorfas, agrupadas en cabezuelas, racimos o panojas; estambres numerosos, con largos filamentos y anteras pequeñas.

La subfamilia Caesalpinoideae DC. comprende 171 géneros y 2.250 especies, distribuidas en 4 tribus (Doyle *et al.*, 2000). Sus especies presentan un hábito arbóreo, arbustivo, lianas o herbáceo; sus hojas pueden ser bipinnadas, pinnadas o bifolioladas; flores zigomorfas, con 5 pétalos, uno de los cuales se halla diferenciado (estandarte) y cubierto en la base por los demás; estambres generalmente 10, libres entre sí; inflorescencia generalmente en racimos.

La subfamilia Papilionoideae Juss., también conocida como Faboideae Rudd, posee 13.800 especies distribuidas en 483 géneros y 28 tribus (Lewis *et al.*, 2005). Sus especies son árboles, arbustos, lianas, trepadoras volubles o hierbas; sus hojas pinnadas, trifolioladas o palmatipinnadas; flores zigomorfas, con 5 pétalos irregulares, el superior más grande (estandarte) y encerrando a los demás, y dos pétalos inferiores unidos formando una quilla que envuelve y protege a los órganos sexuales; inflorescencia generalmente en racimos.

Las tres subfamilias se caracterizan por formar nódulos en sus raíces siendo menos frecuente en las Caesalpinoideae (Lloret & Martínez-Romero, 2005); por el contrario, la subfamilia Papilionoideae es la más rica en especies y en la mayoría de ellas la presencia de nódulos y la capacidad de fijación biológica de N₂ son muy comunes (Sprenst, 2007).

La habilidad simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno puede jugar un papel importante en los ecosistemas naturales favoreciendo la absorción de nutrientes a la planta y especies asociadas. En estos sistemas las leguminosas interactúan con diferentes cepas de rizobios, pero muchas de estas interacciones son poco eficientes a nivel de la FBN. El conocimiento y manejo agronómico de las interacciones simbióticas de poblaciones nativas de rizobios es un factor clave en la dinámica y persistencia de las leguminosas en sistemas naturales.

En pasturas naturales algunos géneros presentan alto valor forrajero contribuyendo a elevar la calidad de las mismas mejorando la producción ganadera extensiva. En Argentina los pastizales nativos del Centro y Norte del país son la fuente principal de alimentos para el ganado, presentan una importante variación de especies, principalmente gramíneas y leguminosas. El beneficio de estas últimas a la productividad resulta no solo en mejorar el valor proteico de la dieta animal cuando es consumida, sino también el nitrógeno transferido a la gramínea en forma indirecta por muerte de sus raíces y directamente a través del nitrógeno fijado (Ribeiro *et al.*, 2007).

1.3.1. Género *Desmodium* Desv.

El género *Desmodium* tiene cerca de 280 especies distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Puhua *et al.*, 2010), y posee centros de diversificación en África-Madagascar, este de Asia, América del Norte, México, y en zonas tropicales y subtropicales de América del Sur y Australia (Ohashi, 2005). Recientemente Hyde *et al.* (2012) reportaron 450 especies de *Desmodium* en regiones cálidas, especialmente en el este de Asia, Brasil y México. En América existen dos centros de diversificación específica importantes, uno en México y otro en Brasil (que se extiende hasta Argentina) con algunas especies comunes, (Schubert, 1980). Su distribución ocurre entre las latitudes de 30° S y 30° N, con precipitaciones que exceden los 900 mm anuales y ente 0 y 3000 m de altitud sobre el nivel del mar (Marques & Paim, 1993).

El género *Desmodium* pertenece a la tribu Desmodieae (Benth.) Hutch., subfamilia Papilionoideae, siendo el de mayor riqueza específica de la tribu y se reconoce por su destacada contribución a la producción forrajera en los trópicos debido a su capacidad para adaptarse a los suelos de baja fertilidad y tolerar la sequía. Estas especies representan un importante recurso genético para la producción forrajera, protección del suelo y la mejora de los sistemas de producción en regiones tropicales subhúmedas y húmedas (Heider *et al.*, 2009). Taxonómicamente, la tribu Desmodieae es considerada afín a la tribu Phaseoleae, presentando características vegetativas similares (Ohashi *et al.*, 1981). Estudios filogenéticos recientes muestran a las dos tribus en un linaje monofilético incluidas en Phaseoleae (*sensu lato*) relativamente próxima a la subtribu Kennediinae y posiblemente como grupo hermano de *Mucuna* (Ohashi, 2005).

En Argentina se dispone de una revisión taxonómica del género basada en caracteres exomorfológicos (Figura I.2) y su documentación a través de la incorporación a herbario (Vanni, 2001).

1.	Plantas herbáceas, ramas postradas, decumbentes o erguidas 50 hasta 80 cm alt. (cuando superan esta altura, hojas unifolioladas)	2
1.	Arbustos, tallos ramificados o simples de 0,60 m hasta 3 m alt., hojas generalmente trifolioladas (la única especie que mide 0,60 m alt. es <i>D. intermedium</i> , el resto supera los 0,80 m)	14
2(1).	Hojas generalmente trifolioladas	3
2(1).	Hojas unifolioladas	11
3(2).	Brácteas que persisten hasta la madurez de los frutos. Fruto con artejos con margen tortuoso o sinuado	14. <i>D. neo-mexicanum</i>
3.	Brácteas prontamente caducas, frutos con artejos de margen rectos no sinuado	4
4(3).	Estípulas soldadas en toda su longitud o en parte de su borde opuesto a la base del peciolo, pueden ser libres en ramas adultas	11. <i>D. incanum</i>
4.	Estípulas libres en todas las ramas	5
5(4).	Frutos con artejos de 14-15,5 mm long., arriñonados, de color pajizo	17. <i>D. riedelii</i>
5.	Frutos con artejos de 2,5-7 mm long., redondeados, subcuadrados o triangulares, pardo oscuros, verdes, castaños o rojisos	6
6(5).	Racimos breves, 20-30 mm long., densos, terminales o axilares	4. <i>D. barbatum</i>
6.	Racimos laxos, terminales, raquis desarrollados mayores, de 30 mm long. hasta 500 mm long., en panículas amplias	7
7(6).	Tallos cilíndricos, lisos o con estriás leves	8
7.	Tallos 2-3-surcados	10
8(7).	Estípulas laterales a la inserción de la base foliar, auriculadas, pétalos blancos	2. <i>D. affine</i>

Figura I.2: Clave artificial para diferenciar las especies argentinas de *Desmodium*. Solo incluye a *Desmodium incanum* y especies afines. Tomado de Vanni (2001).

Una revisión más reciente se realizó para Brasil (Lima, 2011) donde se menciona que la mayoría de los géneros de la tribu Desmodieae se presentan en el sur y sureste asiático, en regiones tropicales, subtropicales y templadas (Ohashi, 2005). *Desmodium*, *Hylodesmun* y *Lespedeza* Michx son los únicos géneros de la tribu con representantes en el viejo y nuevo mundo y solamente *Desmodium* tiene una parte de las especies restringidas a los Cerrados y Pampa en América del Sur (Lima *et al.*, 2010). Este género presenta una nomenclatura histórica relativamente compleja. La diversidad de caracteres morfológicos, incluyendo las especies de *Desmodium* y géneros afines, con amplios límites de variación morfológica y superposición de caracteres, asociados con la amplia distribución geográfica, dificulta la circunscripción de *Desmodium*. Nuevos estudios han contribuido a la identificación y clasificación del género a partir de la macro y micromorfología de los frutos, destacando el tipo de tricomas (Freitas *et al.*, 2014).

Por otro lado, si bien algunas especies de este género son consideradas invasoras (Lorenzi, 2008), otras poseen potencial para control biológico (Pickett *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2014; Hooper *et al.*, 2015), uso medicinal (Xueqin *et al.*, 2011), actividad fitoremediadora (Kitamura *et al.*, 2016), y la mayoría de sus especies tienen importancia económica como forrajeras (Boldrini, 1993) por su aporte de nitrógeno a través de la fijación simbiótica con rizobios del suelo, siendo esta simbiosis de considerable importancia agrícola y ecológica para la recuperación y sustentabilidad de las tierras. En Australia, Date (1977) halló que las especies de *Desmodium* nodulaban con un amplio rango de cepas de rizobios, pero esta nodulación frecuentemente resultaba inefectiva, presentando dos subgrupos de inoculación, por lo que fue necesario el empleo de una cepa eficiente para obtener buenos resultados con este género.

En nuestro país el género está representado por 23 especies, que habitan en el noreste (NE) y noroeste (NO) del país, compartiendo ambas regiones solamente especies como *Desmodium incanum*, *Desmodium affine*, *Desmodium uncinatum*, *Desmodium tortuosum* y *Desmodium adscendens* que solo crece en Misiones. La región más rica en representantes es el NE con 17 especies entre las que se encuentran aquellas que poseen hojas unifoliadas (Burkat, 1939; 1952; 1987; Vanni, 2001). Varias especies, entre las que se encuentra *D. incanum*, se destacan por su importancia como plantas forrajeras y su capacidad de fijar nitrógeno en asociación simbiótica con rizobios. Esta característica es de vital importancia en relación a su capacidad de ser empleadas en nutrición animal y como aporte de nitrógeno al sistema suelo-planta.

1.3.2 *Desmodium incanum* (Sw.) DC.

Desmodium incanum (Figura I.3) es una especie americana, perenne, de amplia distribución, desde el sur de América del Norte hasta Uruguay y Argentina. En nuestro país Vanni (2001; 2008) cita esta especie para las provincias de Catamarca,



Figura I.3. *Desmodium incanum* D.C. Flora virtual de la Estación Biológica El Verde (Ackerman *et al.*, 1991)

Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Salta, Tucumán, Misiones y Santa Fe (Figura I.4), siendo una de las especies de más amplia distribución dentro del género (Vanni, 2001).

Para esta especie De la Peña & Pensiero, (2011) recopilaron los siguientes nombres vulgares: “pega pega”, “taha-taha”, “taja”, “taya-nde-rejey”, “toja”, “voy contigo”, mientras que en estados Unidos de América es conocida como “creeping beggar-weed”.

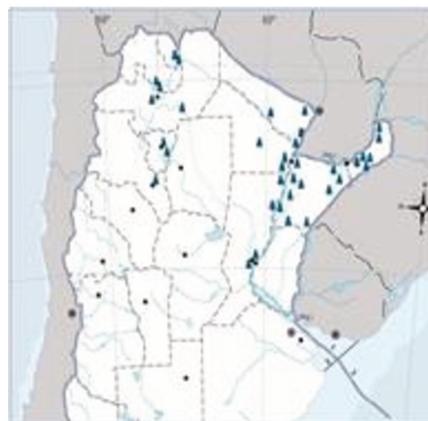


Figura I.4: Distribución geográfica de *Desmodium incanum* en Argentina. Adaptado de Vanni (2001).

1.3.2.1. Morfología

Desmodium incanum es una especie herbácea, perenne, de ciclo primavero-estival, con hábito de crecimiento postrado o ascendente. Posee tallos erectos que pueden alcanzar 15 a 50 cm de altura, y tallos decumbentes radicantes en los nudos, y un sistema radicular bien ramificado. Indumento de pelos hialinos, incurvos, de densidad variable, con pelos uncinados breves. Las hojas son trifoliadas, siendo muy común que las hojas basales queden reducidas a un folíolo. Estípulas de 4-12 mm de longitud, triangulares, ciliadas, estriadas, unidas en el margen opuesto a la inserción del pecíolo, libres en las ramas adultas. Pecíolos de 4-21 mm de longitud, con igual indumento que el tallo, pelos uncinulados, más densos, estipelas aleznadas. Folíolo terminal de 18-70 mm long. x 8-39 mm lat., obovado a elíptico, levemente emarginado, epifilo con pelos uncinulados breves, densos, algunos pelos hialinos, densos sólo en el margen, venación sobresaliente en toda la lámina, con pelos uncinulados breves y densos. Folíolos laterales de 14-60 mm long. x 9-35 mm lat., elípticos a ovales, asimétricos con epifilo e hipofilo como los folíolos terminales. Pecíolos y folíolos con pelos uncinados. Racimos generalmente terminales, flores geminadas con 3 brácteas basales prontamente caducas. Flores de 5-7 mm long. Cáliz campanulado, de 4,5 mm long., tubo de 1,5 mm long., dientes, de 2,5 mm long., agudos. Pétalos violáceos, unguiculados. Estandarte de 8 mm long., obovado, uña de 0,5 mm long. Alas de 6 mm long. x 1,5 mm lat., oblongas, uña de 1 mm long., quilla de 5,5 mm long. x 1,5 mm lat., oblonga, incurva. Frutos en lomento con 3-6 artejos de 4-6 mm long. x 3-3,5 mm lat., ovales, muy adhesivos por el indumento denso de pelos uncinulados, borde superior recto, itsmo grueso (Vanni, 2001). (Figura I.5).

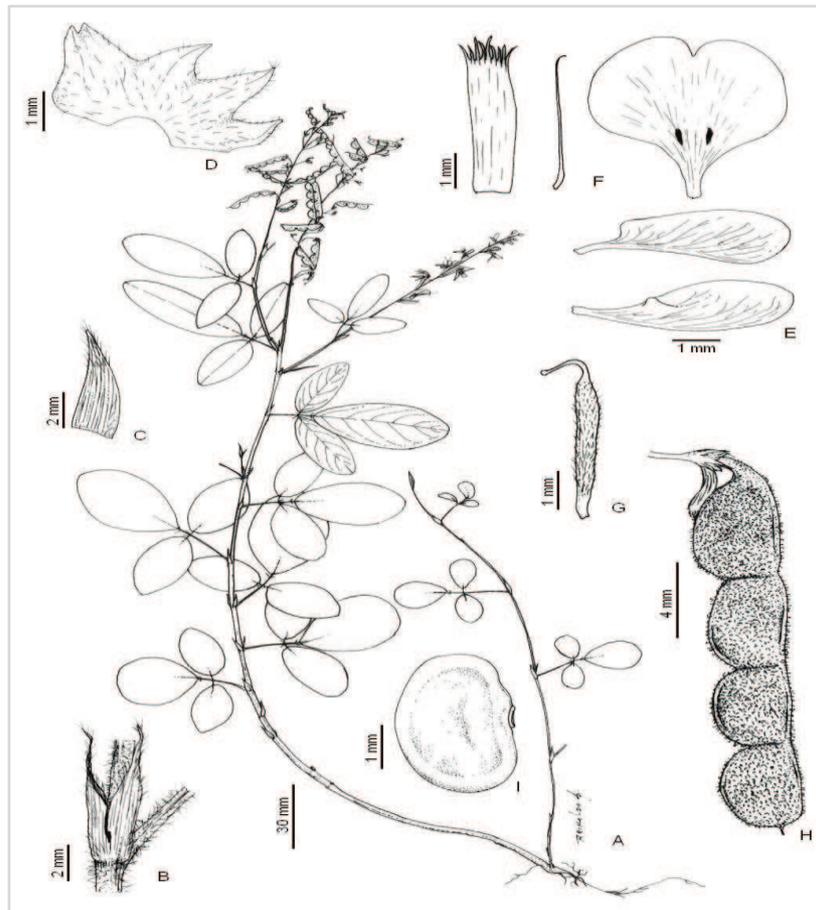
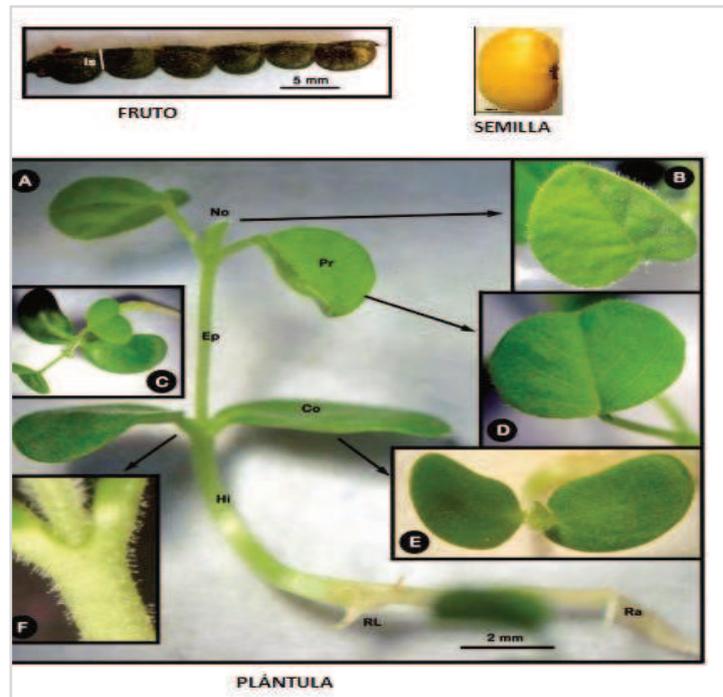


Figura I.5: *Desmodium incanum*: Morfología. A: Hábito de crecimiento. B: estípula de la rama. C: cara externa de la estípula. D: Cara externa del cáliz abierto. E: Pétalos de la corola, de abajo hacia arriba: quilla, ala y estandarte. F: Androceo diadelfo abierto. G: Gineceo. H: Fruto. I: Semilla-Tomado de Lima (2011).

En el caso de las semillas en *D. incanum*, como otras leguminosas silvestres, es común la presencia de semillas duras, es decir, con dormancia por presentar sus tegumentos impermeables al agua. En esta especie la dureza es elevada y constituye una forma de sobrevivencia o adaptación a las condiciones ambientales (Burkart, 1952).

Figura I.6 Fruto completo, semilla y plántula de *Desmodium incanum*. A. Aspecto general de la plántula; B. Nomófilo; C. Inserción de protófilos; D. Protófilos; E. Forma de los cotiledones; F. Detalle del indumento en la zona del nudo cotiledonar. Abreviaturas: Co, cotiledón; Ep, epicótilo; Hi, hipocótilo; No, nomófilo; Pr, protófilo; Ra, raíz principal; RL, raíz lateral. Tomado de Scandaliaris *et al.* (2013)



La planta posee dos períodos de floración y fructificación, en noviembre-diciembre y en febrero-marzo (Vanni, 2001). Esta especie es polinizada comúnmente por abejas u otros polinizadores generalistas, admite la fecundación cruzada, aunque también ha sido señalada la autofecundación (Marques & Paim, 1993). Estudios recientes realizados por Aleman *et al.* (2014) han mostrado que esta especie presenta un mecanismo de polinización explosiva en el que la estructura floral juega un papel importante. Para estos autores si bien la activación es fundamental para las flores explosivas, en especies autocompatibles como *D. incanum* se pueden producir futos y semillas sin intervención de los polinizadores. Un aporte para el reconocimiento de esta especie en su ambiente natural y su diferenciación de otras especies del mismo género lo constituye el estudio realizado por Scandaliaris *et al.* (2013) sobre caracteres exomorfológicos y anatómicos de fruto, semillas y plántulas de *D. incanum* (Figura I.6). Estos autores concluyeron que los resultados aportaron datos originales y fotografías de los estadios de fruto, semillas y plántulas de la especie.

1.3.2.2 Adaptabilidad a las condiciones del medio

D. incanum habita tanto en zonas con abundante precipitación, entre 1500 y 3000 mm.año⁻¹, como en regiones con precipitaciones inferiores a 1000 mm.año⁻¹, y desde el nivel del mar hasta los 1800 msn. Se la encuentra en el interior de bosques, y en lugares soleados de sabanas, llanuras de inundación, bordes de caminos y áreas cultivadas. Es

una planta que se adapta a un amplio rango de suelos, desde arenosos a arcillosos y de pH 4 a 8 pero crece mejor en suelos ligeramente alcalinos, neutros y fértiles (Skerman *et al.*, 1991).

1.3.2.3 Importancia de la especie

D. incanum es una especie que integra nuestras pasturas naturales, presenta buenas características como forrajera, ya que es considerada moderadamente palatable debido a su contenido en taninos, es persistente bajo pastoreo y bien aceptada por los animales (Boldrini, 1993). La productividad es intermedia siendo en promedio 6,5 t.ha⁻¹año⁻¹, con un contenido de proteína cruda 15%, digestibilidad del 39% en prefloración (Marques & Paim, 1993) y 0,18% de fósforo (Fernandez *et al.*, 1993). Generalmente responde bien al encalado, y también a la fertilización fosfatada al igual que las especies *D. intortum* y *D. uncinatum* (Ogola *et al.*, 2012). Resiste el pastoreo y es muy compatible con gramíneas como *Penisetum clandestinum* (kikuyo), *Digitaria decumbens* (pasto pangola), *Cynodon dactylon* (gramilla), *Paspalum dilatatum* (pasto miel), *Paspalum notatum* (pasto horqueta) y *Axonopus compressus* (pasto jesuita) (Crosa *et al.*, 1999). Estudios realizados por Silva *et al.* (2001) mostraron que diferentes dosis de fertilización fosfatada alteraron la partición de la biomasa y la translocación de asimilados favoreciendo el crecimiento radicular. Además, su importancia nutricional se debe principalmente a su capacidad de fijar nitrógeno y establecer relaciones simbióticas especialmente con rizobios del género *Bradyrhizobium* (Gu *et al.*, 2007). En la medicina popular, se utilizan las hojas en decocción como antidiarreico (Barboza *et al.*, 2009). Asimismo, Delle Monache *et al.* (1996) aislaron y caracterizaron tres isoflavonoides provenientes de raíces de *D. incanum* que presentan una acción antimicrobiana. Estudios más recientes mostraron que esta especie, junto a otras del género, presenta en sus semillas determinada concentración de flavonoides, aceite y ácidos grasos que agregarían valor para la salud del ganado, como suplemento en la dieta (Xueqin *et al.*, 2011; Morris *et al.*, 2014). Estudios realizados por Kitamura & Maranhão (2016) mostraron que *D. incanum* es una especie con potencial uso para la fitorremediación de suelos contaminados por el petróleo.

1.3.2.4. Otras especies de *Desmodium*

Otras especies del género son importantes por su potencial forrajero. Entre ellas se destacan *D. intortum* (Mill.) Urb. (“Greenleaf”) nativa de América, que ha sido utilizada ampliamente como forrajera en el este de África, Australia y Sudamérica (Skerman *et al.*,

1988; Bell *et al.*, 2011), posee buen valor nutritivo, necesita suelos moderadamente fértiles y responde positivamente a la fertilización fosfatada, pudiendo tolerar suelos ácidos, anegamiento y soportar temperaturas más bajas que la mayoría de las leguminosas tropicales. Otras especies de valor forrajero son: *D. velutinum* con buena producción forrajera en suelos molisoles fértiles y de pH básico, siendo también una alternativa viable en suelos oxisoles, menos fértiles y de pH muy ácidos (Tiemann *et al.*, 2009). *D. heterocarpon* (L.) DC. subsp. *ovalifolium* (Prain) H. Ohashi, con sus cultivares comerciales Itabela (CIAT 350) y Maquenque (CIAT 13651), es nativa del sureste asiático; *D. uncinatum* (Jacq.) DC. (“Silverleaf”), nativa de Centro y Sudamérica se destaca por su buena calidad forrajera, tolerancia a los suelos ácidos, aunque menos resistente a la sequía que *D. intortum*; *D. barbatum* (L) Benth., especie también americana que se asocia bien con gramíneas de los géneros *Setaria* y *Panicum*, y que puede fijar importantes cantidades de nitrógeno pero que posee bajo vigor de plántulas.

Estudios recientes pusieron en evidencia que exudados de raíz de *D. uncinatum* y *D. intortum* poseen propiedades alelopáticas debido a su capacidad de controlar a *Striga hermonthica* (DEL.), una planta parásita ubicua que crece en amplio espectro de cultivos alimentarios, entre ellos maíz. Estos *Desmodium* inhiben el crecimiento de la radícula de la planta parásita a través de la excreción de exudados por la raíz que además disminuyen el banco de semillas en el suelo (Khan *et al.*, 2014).

I.4. Los rizobios como microsimbiontes

Los rizobios son α - y β -proteobacterias habitantes del suelo que han adquirido por transferencia horizontal, genes relacionados con la capacidad de asociarse en simbiosis con raíces de plantas leguminosas para formar nódulos fijadores de N_2 (MacLean *et al.*, 2007). Los rizobios son organismos aerobios gram-negativos, tienen morfología normalmente bacilar y en general son móviles por la presencia de un flagelo polar o subpolar y de dos a seis flagelos. Estos microorganismos son capaces de establecer simbiosis con leguminosas, y engloban una gran cantidad de bacterias del suelo que a pesar de su gran diversidad fenotípica y genotípica comparten la capacidad para formar nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces o tallos de las leguminosas, y en raíces de otras especies como *Parasponia spp.* (Ulmácea). Actualmente, abarcan un grupo de bacterias muy diversas desde el punto de vista taxonómico, metabólico y genético debido a que, en los últimos años, el número de especies descritas se ha incrementado rápidamente y la clasificación se ha vuelto más compleja. A pesar que la taxonomía de

los rizobios es continuamente revisada por el *International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee for the Taxonomy of Rhizobium*, la clasificación actual, basada en criterios moleculares, si bien no es definitiva, agrupa a los rizobios en 14 géneros de α -proteobacterias: *Agrobacterium* (*Rhizobium*), *Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) y 3 géneros de β -proteobacterias: *Burkholderia*, *Cupriavidus* y *Herbaspirillum* (Weir, 2012, <http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy>; de Lajudie & Young, 2017). La evolución de la misma se detalla en el punto I.4.

I.4.1 Taxonomía

En un comienzo, la taxonomía de las nuevas especies de rizobios se basaba principalmente en la especie de la leguminosa que nodulaba la bacteria, y se definió como grupos de inoculación cruzada. La descripción de estas especies se registró en el Manual de Bergey (Bergey, 1984), y en el año 1980 fueron oficialmente validadas en la revista *International Journal of Systematic Bacteriology* (IJSB). Luego la situación comenzó a cambiar al aplicar un mayor número de criterios fenotípicos y moleculares que revolucionaron la clasificación de los rizobios. Actualmente la taxonomía rizobiana es polifásica y se basa en caracteres morfológicos, fisiológicos y moleculares (Lindström & Young, 2009). Dentro de estos últimos, y considerando las incongruencias filogenéticas reportadas entre los genes que constituyen parte del genoma básico y los genes simbióticos, la reconstrucción de la filogenia de los rizobios debe considerar tres criterios: genes cromosomales comunes del genoma básico para ubicar su posición filogenética; genes involucrados en la FBN para establecer relaciones con otras bacterias y debido a que la FBN es considerada una característica ancestral de amplio espectro filogenético; y genes de la nodulación por ser buenos marcadores de la co-evolución de los rizobios con su hospedero y su origen geográfico (Wang & Martínez-Romero, 2000). Asimismo, las observaciones de Rivas *et al.* (2009) indican que, a pesar de que en la actualidad la clasificación de los rizobios está basado en el gen ribosómico 16S (o 16S rRNA) que codifica para un componente de la subunidad 30S de los ribosomas procariontes, en ocasiones presenta limitaciones para diferenciar entre especies. Por esta razón, en los últimos años se ha propuesto para la identificación y análisis filogenético en determinados grupos de rizobios, la utilización de algunos genes esenciales en la viabilidad de la célula.

Además, es importante señalar que durante muchos años se pensó que los rizobios eran las únicas bacterias capaces de originar nódulos en raíces de leguminosas, sin embargo en los últimos años se ha documentado la existencia de bacterias que forman nódulos y fijan nitrógeno en no leguminosas y se encuentran filogenéticamente alejadas de los rizobios.

El Phylum Proteobacteria que pertenece al Dominio Bacteria es hasta ahora el más grande, diverso y agrupa cinco clases designadas por letras griegas α , β , γ , δ y ϵ . La mayoría de los rizobios pertenecen al grupo α proteobacterias (Martínez-Romero, 1994; Martínez-Romero & Caballero-Mellado, 1996) se incluyen en el Orden Rhizobiales y comprende las familias *Rhizobiaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Phyllobacteriaceae* y *Brucellaceae* (Garrity *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2009; Shamseldin *et al.*, 2017). Los géneros *Rhizobium*, y *Ensifer* (*Sinorhizobium*) y el nuevo género *Shinella* (Lin *et al.*, 2008) se incluyen en la familia *Rhizobiaceae* y los antiguos géneros *Agrobacterium* y *Allorhizobium* se fusionaron en uno solo, y actualmente todas sus especies se incluyen en el género *Rhizobium* (Young *et al.*, 2001). La familia *Bradyrhizobiaceae* está representada principalmente por el género *Bradyrhizobium*. El género *Azorhizobium*, que forma nódulos en los tallos de *Sesbania*, se ubica en la familia *Hyphomicrobiaceae*. Los géneros *Mesorhizobium* y *Phyllobacterium* se han incluido en la nueva familia *Phyllobacteriaceae*. Una ampliación más reciente del conocimiento acerca de las bacterias formadoras de nódulos en leguminosas fue el grupo de las β proteobacterias, actualmente presenta una sola familia *Burkholderiales* con los géneros *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001) y *Cupriavidus* (*Ralstonia*) (Chen *et al.*, 2001), y a otras familias de la α - proteobacteria como por ejemplo *Methylobacterium* (*Methylobacteriaceae*) (Jourand *et al.*, 2004), *Dovosia* (*Hyphomicrobiaceae*) (Bautista *et al.*, 2010) y *Ochrobactrum* (*Brucellaceae*) (Trujillo *et al.*, 2005). La clasificación de las bacterias que nodulan las leguminosas se encuentran en permanente cambios, Shamseldin *et al.* (2017) informaron recientemente que hay 238 especies de bacterias que nodulan leguminosas distribuidas en 18 géneros. Si bien el nombre “rizobios” no resulta en la actualidad como el más adecuado para describir a las bacterias formadoras de nódulos, todavía se continúa utilizando en la literatura.

I.4.1.1 Familia *Bradyrhizobiaceae*

Como hemos comentado anteriormente, la nomenclatura tradicional de *Rhizobium* fue modificada cuando Jordan (1982) basándose en características morfológicas, fisiológicas,

bioquímicas y genéticas, reclasificó algunas especies separando las de crecimiento lento en un nuevo género, *Bradyrhizobium*, que fija nitrógeno en simbiosis con plantas de soja (*Glicine max*). La nomenclatura se basó en características fisiológicas diferentes de otros rizobios (Jordan, 1984). Luego, el avance de los métodos moleculares para el análisis filogenético, particularmente aquellos basados en la secuencia de los genes 16S rRNA permitió la creación de la familia *Bradyrhizobiaceae* que incluye géneros fijadores de nitrógeno con diferentes características pero con tasas de crecimiento lento, similares (Garrity *et al.*, 2005).

La familia *Bradyrhizobiaceae* contiene tres géneros *Bradyrhizobium*, *Blastobacter* y *Photorhizobium*. El género *Bradyrhizobium* incluye 36 especies, mientras que *Blastobacter* y *Photorhizobium* contienen sólo una sola especie (Shamseldin *et al.*, 2017). La taxonomía de *Bradyrhizobiaceae* resulta muy confusa, siendo una de las más distintivas en término de inclusión de géneros que son fenotípicamente muy diversos y presentan características fisiológicas y ecológicas extremas (Marcondes de Sousa, *et al.*, 2014).

I.4.1.2 Especies actualmente descritas del género *Bradyrhizobium*

El género *Bradyrhizobium* se caracteriza por agrupar bacterias Gram negativas de crecimiento lento o muy lento, reacción alcalina en medios de cultivo que contienen manitol como fuente de carbono (Jordan, 1982) y son capaces de establecer una relación simbiótica fijadora de nitrógeno con varias especies leguminosas, incluyendo especies herbáceas y leñosas de origen tropical y templado, y leguminosas acuáticas como *Aeschynomene* y no leguminosa como el género *Paraponia* (Menna *et al.*, 2006). Además, estas bacterias se han reportado como endófitos de arroz salvaje y moderno (*Oriza sativa* L.) y *Bradyrhizobium betae* como endófito de remolacha azucarera (*Beta bulgaris* L) para el que no se conoce estado simbiótico (Rivas *et al.*, 2004). También se han encontrado algunos *Bradyrhizobium* que pueden formar nódulos en leguminosas y llevar a cabo la fotosíntesis (Molouba *et al.*, 1999), algunos fotosintéticos fueron reportados como endófitos de arroz salvaje africano (Chaintreuil *et al.*, 2000).

En la actualidad se amplió el número de especies reconocidas dentro del género *Bradyrhizobium* que forman nódulos en leguminosas. A continuación, se muestran junto a su planta hospedera donde se aisló por primera vez (Tabla I.1).

Tabla I.1. Especies del género *Bradyrhizobium* formadoras de nódulos en leguminosas y planta huésped donde fue aislada. Las citas de referencia describen a las especies (página siguiente).

Género/especie	Planta huésped	Referencia
<i>B. japonicum</i>	<i>Glicine max</i>	Jordan, 1984 *
<i>B. elkanii</i>	<i>Glicine max</i>	Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glicine max</i>	Xu <i>et al.</i> , 1995
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza, sp.</i>	Yao <i>et al.</i> , 2002.
<i>B. canariense</i>	<i>Genisteae</i>	Vinuesa <i>et al.</i> , 2005
<i>B. desnitrificans</i>	<i>Aeschynomene indica</i>	Van Berkum <i>et al.</i> , 2006 **
<i>B. iriomotense</i>	<i>Entrada koshunensis</i>	Islam <i>et al.</i> , 2008
<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2009
<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2009
<i>B. cytisi</i>	<i>Cytisus villosa</i>	Chahbourne <i>et al.</i> , 2011
<i>B. lablabi</i>	<i>Lablab purpureus</i>	Chang <i>et al.</i> , 2011
<i>B. rifense</i>	<i>Cytisus villosus</i>	Chahboune <i>et al.</i> , 2012 *****
<i>B. huanghuaihaiense</i>	<i>Glicine max – Vigna unguilata</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2012
<i>B. daqingense</i>	<i>Glicine max</i>	Wan <i>et al.</i> , 2013
<i>B. diazoefficiens</i>	<i>Glicine max</i>	Delamuta <i>et al.</i> , 2013***
<i>B. oligotrophicum</i>	<i>Aeschynomene indica</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> ,
<i>B. arachidis</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	Wang <i>et al.</i> , 2013
<i>B. retamae</i>	<i>Retama sphaerocarpa y</i>	Guerrouj <i>et al.</i> , 2013
<i>B. ganzhouense</i>	<i>Acacia melanoxylon</i>	Lu <i>et al.</i> , 2014
<i>B. icense</i>	<i>Phaseolus lunatus (L).</i>	Durán <i>et al.</i> , 2014
<i>B. ingae</i>	<i>Inga laurina (Sw.)</i>	Da Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>B. manausense</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>B. neotropiale</i>	<i>Centrolobium paranaense</i>	Zilli <i>et al.</i> , 2014
<i>B. ottawaense</i>	<i>Glicine max</i>	Yu <i>et al.</i> , 2014
<i>B. paxllaeri</i>	<i>Phaseolus lunatus (L).</i>	Durán <i>et al.</i> , 2014 (b).
<i>B. valentinum</i>	<i>Lupinus mariae-josephae</i>	Durán <i>et al.</i> , 2014 (a)
<i>B. erythrophlei</i>	<i>Erythrophleum fordii</i>	Yao <i>et al.</i> , 2015
<i>B. ferriligni</i>	<i>Erythrophleum fordii</i>	Yao <i>et al.</i> , 2015
<i>B. lupini</i>	<i>Lupinus</i>	Peix <i>et al.</i> , 2015
<i>B. subterraneum</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	Gronemeyer <i>et al.</i> , 2015a
<i>B. guangdongense</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	Li <i>et al.</i> , 2015
<i>B. guangxiense</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	Li <i>et al.</i> , 2015
<i>B. tropiciagri</i>	<i>Neonotonia wightii</i>	Delamuta <i>et al.</i> , 2015
<i>B. embrapense</i>	<i>Desmodium heterocarpon</i>	Delamuta <i>et al.</i> , 2015
<i>B. lupini comb</i>	<i>Lupinus</i>	Peix <i>et al.</i> , 2015
<i>B. kavagense</i>	<i>Leguminosas tradicionales de Namibia</i>	Gronemeyer <i>et al.</i> , 2015b
<i>B. vignae</i>	<i>Vigna - Archis</i>	Gronemeyer <i>et al.</i> , 2016

Referencias:

- **Rhizobium japonicum* (Buchanan, 1980) reclasificado.
- ** *Blastobacter denitrificans* (Hirsch & Müller, 1985) reclasificado.
- *** *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110^T reclasificado.
- **** *Agromonas oligotrófica* (Ohta & Hattori, 1983) reclasificado.
- ***** *Bradyrhizobium rifense* (Chahboune, *et al.*, 2011) especie validada.

Como se describe más adelante (Capítulo IV y V) la mayoría de los aislamientos noduladores de *Desmodium incanum* que se presentan en esta tesis corresponden al género *Bradyrhizobium*.

I.5. Estadio de vida libre y colonización radicular

Los rizobios son bacterias de vida libre que pueden sobrevivir como saprófitos por largos períodos de tiempo en ausencia de plantas leguminosas. En el suelo se comportan como bacilos móviles incapaces de fijar nitrógeno y su abundancia está condicionada por las características fisicoquímicas del nicho, principalmente la textura, estructura y contenido de materia orgánica que les permitirá disponer de agua, oxígeno y competir por nutrientes en el suelo. Los principales factores que determinan su tamaño poblacional son, la ausencia de leguminosa huésped y factores ambientales abióticos como la acidez o alcalinidad, contenido de materia orgánica, y contaminación con metales pesados. Por otro lado, se conoce que pueden formar biopelículas donde adquieren una organización que les ofrece protección ante sustancias tóxicas, radiaciones ultravioletas, desecación, entre otros factores estresantes y se establecen sobre superficies bióticas o abióticas. La arquitectura de las biopelículas se presenta como microcolonias en una matriz de exopolisacáridos y canales por donde circula agua y nutrientes (Stoodley *et al.*, 2002). Las bacterias pueden desprenderse de la matriz por señales externas como falta de nutrientes, permitiendo a los rizobios colonizar nuevos hábitats como la superficie de una raíz en crecimiento; así los rizobios presentan una quimiotaxis positiva a muchos de los exudados que liberan las raíces de las plantas hospedadoras pudiendo colonizar una zona del suelo en íntimo contacto con las raíces denominada rizosfera. Dentro de los compuestos presentes en los exudados radicales se encuentran aminoácidos, proteínas, azúcares, flavonoides e isoflavonoides, carbohidratos, vitaminas (Robinson & Bauer, 1993) y alcoholes. Entre estos compuestos, principalmente los flavonoides e isoflavonoides, pueden ayudar inicialmente a colonizar la rizosfera actuando como quimio-atrayentes, o menos probable, como promotores del crecimiento de los rizobios (Cooper, 2004).

El conjunto de eventos de vida libre son luego determinantes de la competitividad y vida simbiótica del rizobio (ver punto I.6). Evidentemente el conjunto de características adquiridas durante este período perfilan al rizobio hacia la interacción con la planta, sin embargo el detalle molecular de este perfil óptimo para una eficiente competición es complejo y difícil de abordar experimentalmente. En las siguientes secciones describiremos el complejo entorno que los rizobios habitan haciendo énfasis en la interfase de suelo que rodea la raíz (rizósfera) y los eventos iniciales que allí suceden (llegada a la rizósfera, reconocimiento, adhesión).

I.6. Desarrollo del estado simbiótico

I.6. 1. Las etapas tempranas de preinfección

I.6.1.1. Quimiotaxis y colonización radicular

El suelo constituye un nicho oligotrófico complejo, donde conviven un gran número de microorganismos que compiten por su sobrevivencia. En este sentido, la asociación con la planta provee una ventaja competitiva para los rizobios. La capacidad de establecer una comunicación específica entre rizobios y plantas es producto de una extensa co-evolución (Martínez-Romero, 2009) que ha permitido a la planta desarrollar la habilidad para diferenciar entre potenciales simbioses.

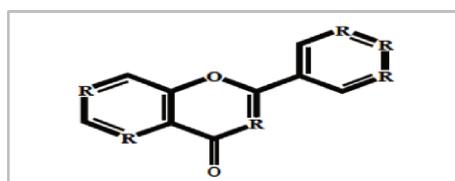
La quimiotaxis bacteriana hacia los exudados de las raíces de las plantas es un importante evento en las interacciones entre las leguminosas y los rizobios. Las plantas exudan un alto nivel de nutrientes y muchos de ellos actúan como quimiotácticos para las bacterias. Las diferentes bacterias son quimiotácticas positivas a azúcares, aminoácidos, ácidos dicarboxílicos (por ej. succinato, malato, fumarato) y compuestos aromáticos (Robinson & Bawer, 1993). La unión de los rizobios a la superficie de la planta es esencial para el establecimiento de una interacción a largo plazo de la bacteria con su huésped. Las lectinas de las plantas son proteínas que se unen reversiblemente a un mono u oligosacárido, podrían servir como receptores de exopolisacáridos bacterianos (EPS) y mediar la especificidad en la simbiosis rizobium-leguminosa (Rudiger & Gabius, 2001). Si bien la función molecular de los polisacáridos de superficie en rizobios sigue siendo poco clara (Laus *et al.*, 2006), se han postulado varias funciones diferentes de los EPS y posiblemente actúen como una molécula señal para determinar la especificidad del huésped, En este sentido Kawaharada *et al.* (2015) recientemente han identificado un gen

en *Lotus japonicus*, *EPR3*, que codifica una quinasa similar al receptor que controla esta infección. Estos investigadores han demostrado que mutantes en *EPR3* son defectuosos en la percepción de la EPS purificados, y que *EPR3* une EPS directamente y distingue EPS bacterianos compatibles e incompatibles. Asimismo, encontraron que la expresión *EPR3* es inducible y depende de la percepción de los factores de nodulación (*Nod*). Así, la compatibilidad planta-bacteria y el acceso de las bacterias a las raíces de leguminosas están regulados por un mecanismo de dos etapas que implica el reconocimiento secuencial de receptores mediado tanto por los factores *Nod* como por los EPS.

I.6.1.2. Secreción de flavonoides e inducción de genes *nod*

La interacción entre los rizobios y la planta huésped comienza con una etapa inicial de intercambio de señales químicas que conducen al reconocimiento específico mutuo. En condiciones de hambreado de N, las leguminosas liberan con sus exudados radiculares una serie de moléculas que son reconocidas específicamente por los rizobios con los que van a iniciar la simbiosis, estas moléculas denominadas flavonoides (derivados de la 2-fenil-1,4-benzopirona) suelen ser flavonas y flavononas en rizobios de crecimiento rápido, e isoflavonas en el caso de *Bradyrhizobium*. Los flavonoides son compuestos policíclicos, liberados por las plantas en la rizosfera. Su estructura está definida por dos anillos aromáticos y un anillo pirona, (Figura I.7) las modificaciones específicas de esta estructura básica produce diferentes clases de flavonoides, incluidas chalconas, flavononas y flavonas, flavonoides, isoflavonoides, cumestanos y antocianidinas (Harborne & Williams, 2000).

Figura I.7. Estructura molecular básica de los flavonoides. Los radicales R indican los posibles sitios de modificaciones y adiciones de grupos funcionales que varían de acuerdo a la especie vegetal.



Se han identificado más de 4.000 flavonoides diferentes en plantas vasculares (Perret *et al.*, 2000); sin embargo, no todos son activos como inductores de los genes de la nodulación y se cree que las leguminosas huésped son discriminadas de las no huésped en parte, sobre la base de los flavonoides específicos que liberan (Parniske & Downie, 2003). Los flavonoides son liberados en mayor cantidad cerca del extremo radical y se

producen concentraciones óptimas cerca del pelo emergente que es el sitio más favorable para la infección del rizobio. Su rol más importante en la iniciación de la simbiosis es su interacción con el producto de la expresión del gen *nodD* del microsimbionte para formar un complejo proteíno-fenólico, un regulador de otros genes de nodulación (*nod*) que son responsables de la síntesis de señales recíprocas de la raíz de la planta. La combinación de proteínas NodD con los flavonoides adecuados dispara la producción de moléculas señales altamente específicas, por los rizobios, los lipo-quito-oligosacáridos ó factores Nod, por medio de la activación de los genes *nod* específicos (Cooper, 2004).

En los últimos años varias contribuciones han demostrado claramente el papel de los flavonoides en la nodulación, estudios realizados por (Subramanian *et al.* 2007; proporcionaron evidencia genética que las isoflavonas son esenciales para la nodulación de raíces de soja debido a su capacidad para inducir genes *nod* en *Bradyrhizobium japonicum*. Zhang *et al.* 2007) en estudios genéticos utilizando *Medicago truncatula*, como planta modelo, determinaron la importancia de las flavonas en la nodulación. Además de los flavonoides se han identificado otros inductores de genes *nod* de ciertas especies de rizobios, tales como betaínas (Chen & Murata, 2002), xantonas (Phillips *et al.*, 1992), ácidos aldónicos (Gagnon & Ibrahim, 1998), compuestos fenólicos simples como vainillina y coniferilico, ácido clorogénico, ácido ferúlico (Gagnon & Ibrahim, 1998). En particular, en *Bradyrhizobium japonicum*, se ha encontrado que los jasmonatos son inductores de los genes *nod* tan potentes como la genisteína (Mabood *et al.*, 2006; Wasternack & Hause, 2013)

I.6.1.3. Síntesis de factores de nodulación (FN) lipo-quito-oligosacáridicos.

El evento clave en la formación de los nódulos es la síntesis y liberación por los rizobios de pequeñas moléculas que son detectadas por la planta y desencadenan la formación del nódulo (Geurts & Bisseling, 2002) Estas moléculas se definen químicamente como lipoquitoologosacáridos y se denominan factores Nod (NF). Los NF, constituyen la primera señal de respuesta de los rizobios hacia las raíces en pos de dar inicio al proceso de infección y son detectadas por una serie de leguminosas huésped que inducen cambios importantes en el desarrollo de la planta, necesarios para la entrada de los rizobios en el huésped (Geurts & Bisseling, 2002). De esta forma la producción de los NF por la bacteria resulta ser el mayor determinante de la especificidad en la simbiosis rizobio-leguminosa

definiendo el rango de hospedadores susceptibles de ser infectados por una cierta cepa o especie de rizobio (Perret *et al.*, 2000). Estas moléculas también inducen la división celular y la expresión genética dentro del cortex y periciclo de la raíz donde se inicia el desarrollo del nódulo (Cullimore *et al.*, 2001).

Los NF se determinaron por primera vez en 1990 para *Sinorhizobium meliloti* (Lerouge *et al.*, 1990). La estructura de estos factores comprende un núcleo básico de longitud variable formado por residuos de N-acetil-D-glucosamina enlazado por uniones β 1-4 (Figura I.8). En el grupo amino correspondiente al azúcar del extremo no reductor se une una marcada variedad de ácidos grasos mediante uniones amida, los cuales, dependiendo de cada factor Nod, tendrán diferente grado de saturación. Sobre esa estructura básica, y dependiendo de la especie de rizobio, se encuentran modificaciones o sustituciones muy variadas tanto en el extremo reductor como en el no reductor.

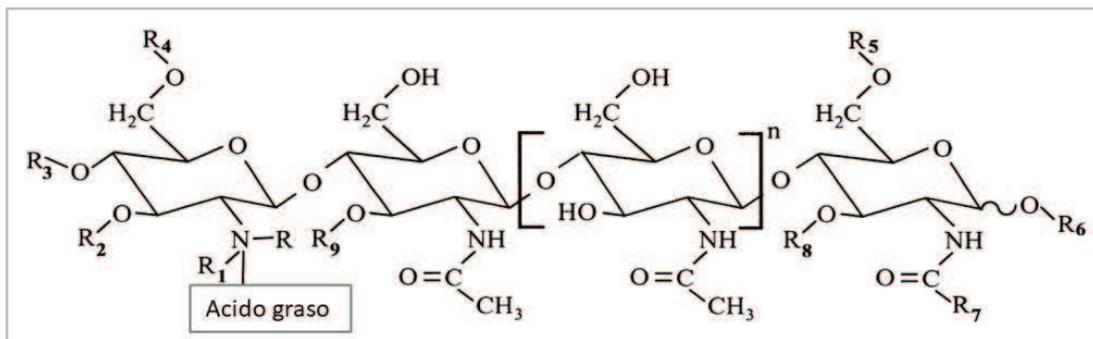


Figura I.8. Estructura general del lipo-oligo-oligosacárido o factor Nod. La estructura básica del factor Nod ($n = 0-3$). Símbolos R1-R9 indican posibles modificaciones estructurales del esqueleto: R1 - grupo metilo añadido por la proteína NodS; R2 y R3 - grupos carbamoilo agregadas por NodO; R4 - sustituciones acetilo o carbamoilo agregadas por NodL y NodU, respectivamente; posición R5 puede estar sustituido por sulfato (NodH), acetil (NodX), fucosil (NodZ), y metilo grupos (NoeI); R6 - manosil y glicerol modificaciones; R7 - grupo acetilo; R8 - grupo arabinosil (NoeC); R9 - Grupo fucosil; el acilo graso se añade por enzimas NodFE. Tomado de Janczarek *et al.* (2015).

Muchos NF de diferentes especies de rizobios han sido identificados y difieren en cuanto al número de residuos de glucosamina, la longitud y saturación de la cadena de ácidos grasos y la naturaleza de las modificaciones de esta columna vertebral básica. Estas variaciones definen gran parte de la especificidad de especies que se observa en la simbiosis (Perret *et al.*, 2000). Las proteínas codificadas por los genes bacterianos *nodA*, *nodB* y *nodC* están involucradas en la biosíntesis de la estructura del núcleo básico de los factores Nod. Adicionalmente los NF presentan modificaciones de naturaleza variable (sulfurilaciones, acetilaciones, carbamilaciones y metilaciones entre otras) en diferentes

posiciones del núcleo básico. La introducción de grupos sustituyentes y las modificaciones químicas realizadas al ácido graso acoplado a la glucosamina terminal en el núcleo básico son ejecutadas por proteínas codificadas por otro grupo de genes *nod* (*nodEF*, *nodG*, *nodH*, *nodPQ*, *nodL*, etc) y por genes *noe* y *nol*.

La longitud del núcleo básico, la estructura del resto N-acilo acoplado al residuo terminal, y la identidad de los sustituyentes que “decoran” al esqueleto básico son los determinantes estructurales que caracterizan un NF y varían entre especies de rizobios. Esta variación es precisamente uno de los factores que determina las diferentes especificidades entre especies de rizobios y de leguminosas (Lerouge *et al.*, 1990). Es importante mencionar que una especie de rizobio puede sintetizar una familia de NF, dificultando así la predicción del rango de huéspedes a partir de la estructura de los NF que produce un rizobio en particular. La detección de los NF por parte de la planta es mediada por los receptores de múltiples dominios extracelulares, pertenecientes a la familia LysM que se encuentran expuestos en la superficie externa de los pelos radiculares (Garg, 2007).

I.6.1.4. Otros determinantes de especificidad.

Además de los flavonoides y NF, en ciertas leguminosas la especificidad se encuentra regulada a otro nivel, que incluye proteínas de rizobio secretadas por los sistemas de secreción del tipo I, III, IV y VI (Figura I.9). Si bien los mecanismos de acción de estas proteínas no están completamente dilucidados, se cree que su rol es complementar la señal inducida por los NF (Downie, 2014).

Un mecanismo caracterizado en sólo dos especies de rizobios (*R. leguminosarum* bv. *viciae* y *Rhizobium* sp BR816) es la secreción, a través del sistema de secreción del tipo I, de la proteína de unión a Ca^{+2} , NodO. La transcripción del gen *nodO* se encuentra regulada por flavonoides y NodD. Se ha demostrado que la secreción de NodO extiende el rango de hospedador (Economou *et al.*, 1994; Vlassak *et al.*, 1998).

El segundo mecanismo involucra proteínas de secreción denominadas Nop (del inglés: Nodulation Outer Proteins) secretadas por el sistema de secreción de tipo III. Los genes que codifican para las proteínas Nop y el sistema de transporte tipo III son inducidos por NodD y flavonoides, a través del activador transcripcional *ttsI* que regula la transcripción por medio de su unión a promotores especiales, las cajas *tts*. El rol de estas Nop en la nodulación es dependiente de la planta huésped y una misma proteína puede producir un

efecto positivo, negativo o nulo en la nodulación (Marie *et al.*, 2003; Janczarek *et al.*, 2015).

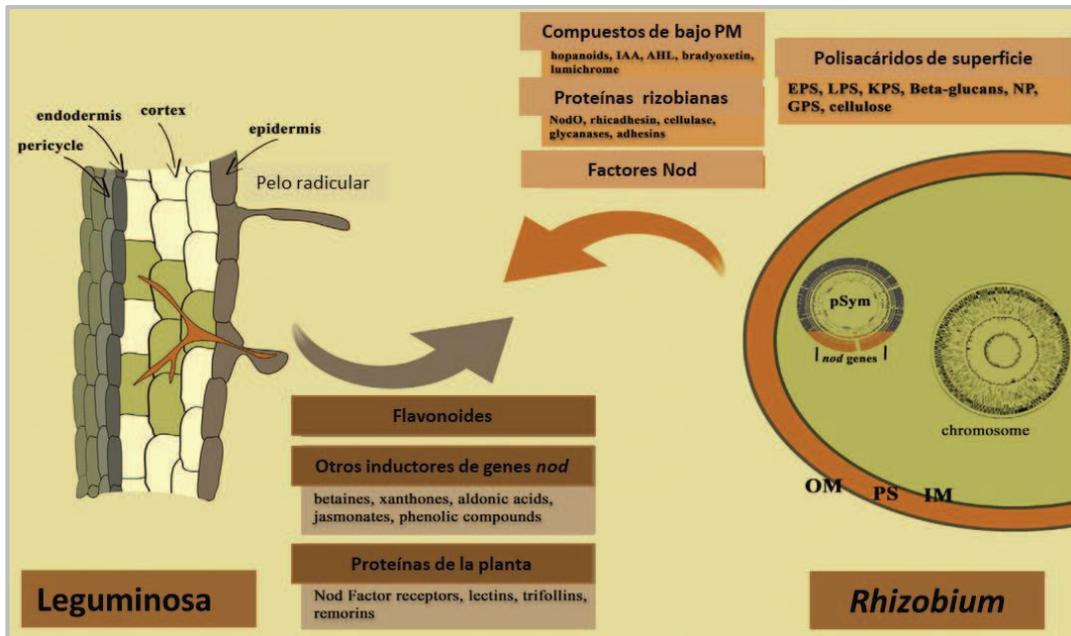


Figura I.9. Esquema general de la simbiosis rizobio-leguminosa. Señales y otros compuestos derivados de la planta y de la bacteria que participan en esta interacción. Imagen adaptada de Janczarek *et al.*, (2015).

Se ha descrito que también los sistemas de secreción de tipo IV (T4SS) y VI (T6SS) juegan un rol en la competencia y la especificidad de la interacción para ciertas interacciones particulares (Nelson & Sadowsky, 2015). Por ejemplo, se ha encontrado que la pérdida del T4SS en *Mesorhizobium loti* hace que no pueda competir eficientemente por la ocupación de nódulos en *Lotus japonicus*, sin embargo, es capaz de nodular *Leucaena leucocephala*, una planta heteróloga (Hubber *et al.*, 2004). Los sistemas de secreción de tipo VI fueron descubiertos hace unos años, siendo una proteína de tipo RbsB la única proteína secretada descrita, para el caso de *R. leguminosarum*, cuyo rol en la simbiosis es desconocido (Fauvart & Michiels, 2008). En base al análisis de secuencias genómicas, Bingle *et al.* (2008) han reportado la presencia de T6SS en al menos tres géneros de rizobios. Además de *R. leguminosarum*, también se encontraron secuencias conservadas de T6SS en los genomas de *B. japonicum* y *M. loti*. A raíz del reciente interés de los T6SS en bacterias patógenas, este hallazgo representa otra oportunidad para comparar la conservación funcional de las vías de secreción en patogénesis y simbiosis.

I.6.1.5. El proceso de adsorción a la superficie radicular

El proceso de adsorción involucra a la planta leguminosa a través de lectinas y aglutininas, o del rizobio como polisacáridos superficiales, fibrillas de celulosa y adhesinas (ricadhesina) (Lodeiro *et al.*, 2000). Las lectinas son glicoproteínas secretadas por la punta del pelo radicular y se unen específicamente a estructuras de carbohidratos presente en la superficie de la bacteria y pelo radicular actuando como puente entre ambos socios. 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). Sin embargo, otros autores apoyan la hipótesis de que la función principal de las lectinas de las plantas puede residir en una etapa posterior a la adhesión (Brelles-Mariño & Boiardi, 1996). Estudios realizados por estos autores demostraron que el tratamiento de bacterias con lectinas de la leguminosa antes de la inoculación, en la simbiosis *Rhizobium etli* -*Phaseolus vulgaris* aumenta la infectividad y la formación del hilo de infección.

Las adhesinas como ricadhesinas y RapA1 son proteínas bacterianas que median la interacción entre la planta y los rizobios. La ricadhesina, una proteína secretada dependiente de Ca^{+2} cumple un rol dominante en la adhesión primaria a pH ligeramente alcalino (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007). Uniones mediadas por ricadhesinas son comunes en la familia *Rhizobacteraceae* incluyendo los géneros *Bradyrhizobium* y *Agrobacterium* (Brelles Mariño & Ané, 2008). Por otro lado se han caracterizado un conjunto de adhesinas secretadas por el sistema de secreción de tipo I, denominadas proteínas adherentes de rizobios (RAPs), que reconocen polisacáridos superficiales de las bacterias y se encuentran involucradas en la unión de bacterias entre sí, cumpliendo su rol en la segunda etapa de asociación y agregación de las bacterias en la punta de los pelos radicales (Downie, 2010).

En términos generales, se ha descrito al proceso de adhesión de los rizobios a 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 (Laus *et al.*, 2005)

I.6.2. La infección

La infección se inicia por medio de dos mecanismos dependiendo principalmente de la especie leguminosa, y requiere en general de los FN y polisacáridos de superficie bacteriana (Downie, 2010). Una forma de infección del huésped es mediante el ingreso de las bacterias a la raíz de la planta a través de fisuras ocasionadas en la epidermis como consecuencia de la emergencia de raíces laterales o adventicias (*crack entry*). Las bacterias invaden directamente las células corticales y luego se dispersan por los espacios intercelulares hasta llegar al primordio del nódulo. Se cree que este mecanismo de infección es el más antiguo (Sprent, 2007). Este tipo de infección ha sido caracterizada en *Sesbania rostrata*, en esta leguminosa las bacterias parecen crecer en los espacios intercelulares formando focos de infección donde pueden formar un centro de señalización e inducir la infección y nodulación (Goormachtig *et al.*, 2004a,b). Este tipo de infección ha sido revisada por Capoen *et al.* (2010). También ha sido reportado el origen de la infección de rizobios a través de la infección epidérmica directa intercelular en mutantes de *Lotus japonicus* (Madsen *et al.*, 2010).

Otro mecanismo de infección y el más estudiado es el proceso mediante el cual los rizobios penetran a través de los pelos radiculares en leguminosas como arveja, tréboles, poroto, soja *Medicago sp.* y *Lotus sp.* Este proceso se muestra en la Figura I.10 y I.11, y es el que detallamos a continuación.

La interacción simbiótica comienza cuando las bacterias colonizan la superficie de la raíz e inducen la curvatura de la punta del pelo radicular (Oldroyd *et al.*; 2011). El enrulamiento del pelo radicular se cree que es causado por una reorientación gradual y constante de la dirección del crecimiento del mismo que puede ser causada por los factores Nod al ser reguladores del crecimiento (Oldroyd, 2007). La invaginación del pelo radicular a través del hilo de infección es controlada por la planta huésped (Madsen *et al.*, 2010). Las bacterias quedan atrapadas dentro de la depresión del rulo y por una actividad celulósica son capaces de degradar la pared celular vegetal, luego la membrana celular se invagina y nuevo material es depositado por la planta y se forma un canal llamado el hilo de infección (Limpens & Bisseling, 2003). Este hilo de infección contiene una matriz polisacáridica de origen bacteriano y glicoproteica de origen vegetal. El enrulamiento solo se produce en unos pocos pelos en la zona radicular que es susceptible a los rizobios, mientras que la mayoría de los pelos radiculares dentro de esta zona muestran un comportamiento alterado o deformado. Si más de una bacteria queda atrapada, el proceso

de formación del hilo de infección tiende a seleccionar un solo tipo, por lo que, en general, la infección proviene de una única bacteria (clonal) (Gage & Margolin 2000).

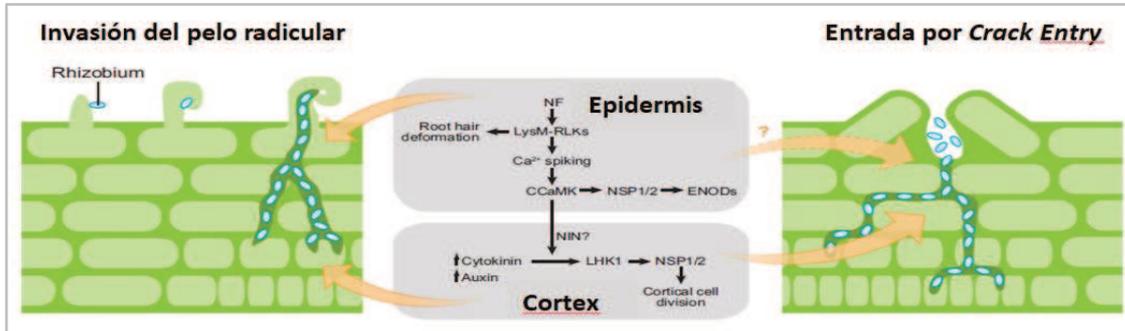


Figura I.10. Desarrollo coordinado de las raíces durante la nodulación. La infección bacteriana puede ocurrir ya sea a través del pelo de la raíz o bien en grietas en la epidermis (crack entry). La invasión del pelo de raíz se inicia mediante la adhesión bacteriana a los pelos de raíz y la deformación del pelo atrapa a la colonia de bacterias. Los hilos de infección inician la invasión bacteriana de la corteza. Concomitante con estas respuestas epidérmicas, las células corticales activan la división celular para formar el meristema del nódulo. Durante la entrada, las respuestas epidérmicas asociadas con la percepción del factor Nod conducen a la expresión de genes y a oscilación de Ca⁺² dentro y alrededor del núcleo. Las respuestas corticales están asociadas con el aumento de citoquininas y auxinas; que son percibidas por proteínas de señalización (LHK1, GRAS, GAI, RGA) y su activación conduce a la inducción de la división celular en células corticales. La infección, sin embargo, requiere la cascada de señalización antes mencionada pero además requiere de la otra vía desencadenada por los FN. La activación de esta otra vía se cree que requiere una ROP-GTPasa que activa la producción de especies reactivas de oxígeno y un influjo de Ca⁺² en la punta de los pelos radiculares. Esta cascada de señalización regula la dinámica del citoesqueleto, el tráfico vesicular y la señalización de lípidos asociados con el crecimiento apical y el desarrollo del hilo de infección. Abreviaturas: ENODs, genes de nodulación temprana; NIN, creación de nódulos, LysM-RLK, motivo lisina - receptor similar a la quinasa. (Oldroyd & Downie, 2008).

Antes de que el hilo de infección alcance las células de la base del pelo radicular, las células corticales de la raíz son inducidas a diferenciarse activando su ciclo celular y causando su división para formar el primordio nodular. También se activan las células del periciclo y se someten a divisiones celulares. El hilo de infección atraviesa las capas exteriores de las células para alcanzar el primordio nodular y se ramifica en las células corticales, iniciando un proceso de diferenciación anunciado por el agrandamiento de las células. En el hilo de infección los rizobios se multiplican activamente pero permanecen confinados por la pared celular del vegetal. A medida que se desarrolla el primordio nodular las bacterias se liberan del extremo de infección por endocitosis y se diferencian en bacteroides rodeados de la membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidal MPB (Garg, 2007).

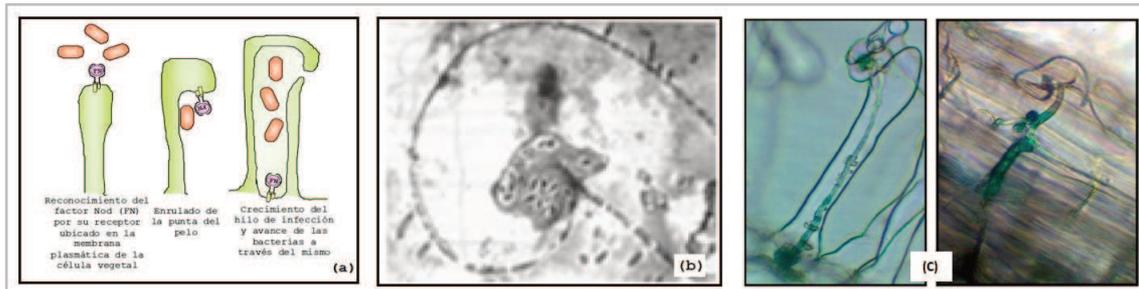


Figura I.11. Enrulado del pelo radical y desarrollo del hilo de infección. A) Esquema del proceso de formación del hilo de infección, tomado de Parniske & Downie (2003). B) Micrografía electrónica original de Sahlman & Fahraeus (1963) mostrando el enrulado de la punta del pelo y los rizobios atrapados en el bolsillo que se forma. C) La imagen de la izquierda muestra un hilo de infección de la raíz del guisante que ha enroscado sobre sí mismo. Las bacterias expresan *lacZ* a partir de un promotor constitutivo y se tiñeron utilizando el sustrato cromogénico X-gal. La imagen de la derecha muestra otro hilo de infección que se ha extendido a capas epidérmicas y subepidérmicas. Imágenes: Walker S., Babraham Instituto, Cambridge.

El factor Nod sería necesario durante todo el proceso de infección e incluso para una correcta invasión del nódulo (Jones *et al.*, 2007). Al inicio de la infección causará oscilaciones de calcio en todas las células, las epidérmicas y las de la corteza, y consecuentemente activará la expresión de genes de nodulación temprano. Asimismo, los EPS son elementales para una infección exitosa, ya que, además de estar implicados en el reconocimiento rizobio-leguminosa, son responsables de inhibir en parte las respuestas de defensa de la planta (Brelles Mariño & Ané, 2008).

La liberación de las bacterias en las células vegetales se inicia mediante la formación de una gotita de la infección, o más habitualmente en las posiciones de la curvatura de infección donde la pared celular se interrumpe y los rizobios entran en contacto directo con la membrana plasmática de la célula huésped. Luego la membrana celular de la planta crece más y las bacterias ocupan el lumen de las células vegetales por endocitosis. La estructura recién formada, que consiste en bacterias que se están diferenciando en bacteroides encerradas en la MPB se denomina simbiosoma. Los bacteroides se caracterizan por tener un tamaño hasta diez veces mayor a su estado de bacteria, ausencia de flagelos, incapacidad de duplicarse y utilizan como única fuente de carbono los ácidos málico y succínico cedidos por la planta. Además, presentan una importante adaptación fisiológica con relación a su capacidad enzimática, en particular se expresa la nitrogenasa. La membrana del simbiosoma se comporta tanto como una interfase física, como

mediando el intercambio de metabolitos entre los simbiosomas, siendo ambas funciones esenciales para la formación de los nódulos. En nódulos maduros la membrana del simbiosoma representa una mezcla de proteínas que se asemejan a las proteínas de la membrana plasmática y tonoplasto. Además, aquellas proteínas implicadas en el transporte de energía, procesos metabólicos, formación de nódulos y la función de señales de respuesta de patógenos, han sido identificadas a partir de la membrana del simbiosoma (Emerich & Krishnan, 2014). Como se ha mencionado, esta membrana se debe agrandar para permitir la división y el crecimiento del bacteroide, y puede estar integrado por cientos de bacteroides, cada uno encerrado en su propia membrana simbiosomal. En nódulos determinados los simbiosomas se fusionan y/o los bacteroides se dividen en el simbiosoma, lo que resulta en simbiosomas que contienen varios bacteroides. Sin embargo en los nódulos indeterminados la división del bacteroide es junto con el simbiosoma y en su mayoría resultan bacteroides individuales dentro de un simbiosoma. Durante este proceso se requiere una gran cantidad de lípidos y la síntesis de proteínas desde las células de los nódulos infectados (Garg, 2007). Paralelamente a este evento y una vez inducido el primordio nodular, continúan las divisiones mitóticas de las células corticales, sufren un proceso de desdiferenciación que conducen a la formación del tejido meristemático cuya función es generar el crecimiento del nódulo. De acuerdo a las características de la leguminosa se pueden formar dos tipos de nódulos: los determinados y los indeterminados (Figura I.12).

Los nódulos determinados (Figura I.12B) son de forma esférica debido a que presentan tejido meristemático perisférico no permanente, el crecimiento se basa en la expansión y no en la división celular y alcanzan su crecimiento máximo en pocas semanas. En estos nódulos las células infectadas más jóvenes están inmediatamente por debajo del tejido perisférico, los simbiosomas maduros ocupan la zona intermedia y los senescentes la región central. El tejido central presenta células no vacuoladas que provienen de divisiones de la hipodermis, y células muy vacuoladas que forman el parénquima que rodea al tejido central, que provienen de divisiones de células del periciclo. Los haces vasculares corren por el tejido periférico en ambos tipos de nódulos.

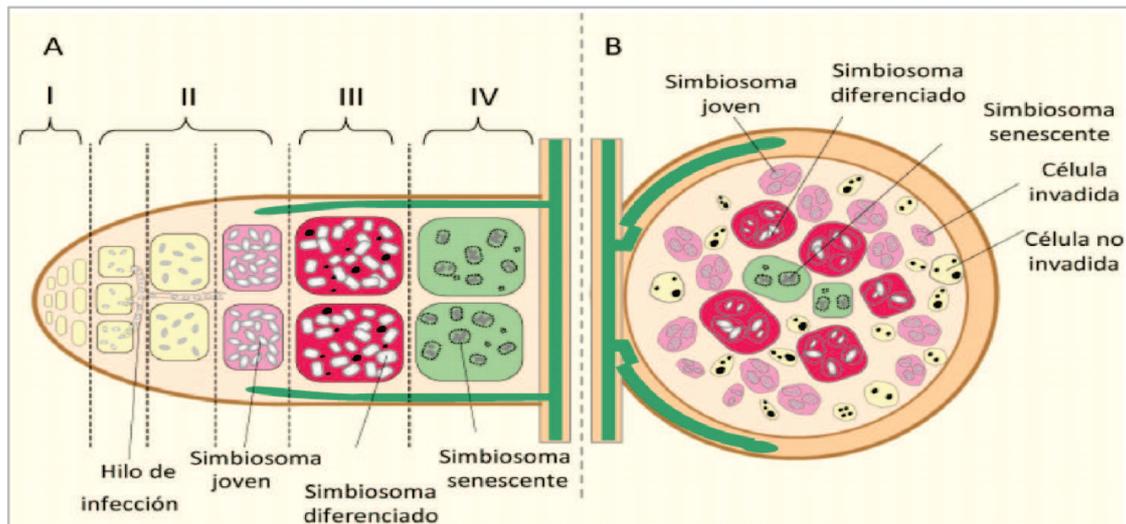


Figura I.12. Esquema de corte longitudinal de un nódulo indeterminado (A) y determinado (B). (Tomado de Althabegoiti, 2010)

Los nódulos indeterminados (Figura I.12A) son alargados debido a que las células del cortex interno generan un meristema apical persistente. En estos nódulos se distinguen cuatro zonas transversales, llamadas zona I o del meristema libre de bacterias, zona II donde penetran los hilos de infección y los bacteroides se dividen y diferencian, zona III o zona de simbiosomas fijadores de N_2 y zona IV donde se encuentran bacteroides en senescencia. Las plantas que forman nódulos indeterminados imponen un programa de endoreduplicación genómica del rizobio (Vinardell *et al.*, 2003) para aumentar indirectamente su tasa metabólica y poder aportar los requisitos energéticos de la fijación de nitrógeno. Una vez logrado este grado de diferenciación, es necesaria la disminución de la presión parcial de oxígeno para que la maquinaria de fijación de nitrógeno se exprese correctamente y luego la nitrogenasa encuentre el ambiente propicio para su funcionamiento, la producción de leghemoglobinas por parte de la planta conduce a la generación de microaerobiosis. Dentro de las especies que forman nódulos indeterminados se distribuyen principalmente en regiones templadas, aunque pueden encontrarse algunas excepciones en esta amplia clasificación (Brett *et al.*, 2010), las más conocidas son *Trifolium* (trébol), *Medicago sativa* (alfalfa) y *Pisum sativum* (arveja).

Las especies que forman nódulos determinados se encuentran generalmente en regiones tropicales y subtropicales, siendo las más conocidas *Glycine max* (soja) y *Phaseolus vulgaris* (poroto) o subtropicales como *Lotus japonicus*.

Tal como se detalla en el punto siguiente (Ver punto I.6.3), en el nódulo se fija nitrógeno por un período de tiempo determinado después del cual esta actividad decrece dando lugar a la lisis y, finalmente la senescencia. Durante el proceso de senescencia nodular (SN) se presentan cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos. Dichos cambios están muy relacionados con la transición de la fase vegetativa a la reproductiva de la planta, así como las condiciones de estrés en que pueda estar la leguminosa. En nódulos determinados, como en el caso de la simbiosis *B. japonicum* – *Glicine max*, la senescencia comienza en la zona central de la corteza y se extiende hacia la periferia hasta causar el deterioro total del nódulo, este proceso es irreversible y los bacteroides mueren. En contraste, la zona de SN en nódulos indeterminados como en *Medicago sativa* se inicia en la región proximal o base del nódulo y presenta varios períodos de senescencia y recuperación durante la vida de la planta, los bacteroides continúan vivos, salen del nódulo y vuelven al suelo.

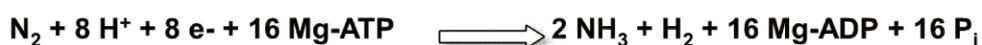
Durante la SN del nódulo se producen cambios morfológicos como la pérdida de la turgencia, cambio de color rosado por la presencia de la leghemoglobina a oscuro, disminución en el número de bacteroides y alteraciones en diversas organelas celulares como el aparato de Golgi, mitocondrias, cloroplastos y la membrana celular (Puppo *et al.*, 2005). También ocurren cambios fisiológicos como el aumento de especies reactivas de oxígeno (H_2O_2 , superóxidos, radical hidroxilo), oxidación y decrecimiento de la concentración de la leghemoglobina y disminución de la actividad nitrogenasa. También se producen alteraciones en los reguladores de crecimiento, metabolismo del nitrógeno, poliaminas y ferritina. El proceso de SN es inducido por una señal sistémica como la reducción del aporte de carbohidratos a la raíz, o a través de un regulador hormonal producido en la parte aérea de la planta y transportado hacia la raíz.

El lapso de tiempo que lleva el proceso de senescencia de los nódulos es variable, dependiendo de la planta, de la cepa de rizobio y de las condiciones ambientales. La senescencia del nódulo está marcada por los cambios fisiológicos mencionados, además durante este proceso las MPBs se fusionan y los simbiosomas se van agrupando en una vacuola, que conduce a la lisis de los bacteroides (Muller *et al.*, 2001). Las bacterias que no llegaron a diferenciarse se liberan e incrementan substancialmente las poblaciones de suelo. Los rizobios entonces restablecen su metabolismo adaptado al estado planctónico, luego de lo cual se supone que se establecen en el suelo hasta el próximo ciclo de nodulación.

Poco se conoce sobre los mecanismos moleculares involucrados en la SN. Cualquier manipulación genética que conduzca al retardo de la SN podría incrementar el tiempo de fijación de nitrógeno lo que implicaría un beneficio desde el punto de vista agronómico y ambiental (Puppo *et al.*, 2005).

I.6.3. Fijación simbiótica de nitrógeno – Expresión de la nitrogenasa.

La FBN la llevan a cabo los bacteroides que se encuentra en el simbiosoma y es catalizada por la enzima nitrogenasa de acuerdo a la siguiente ecuación:



La expresión del complejo de la nitrogenasa y de las enzimas necesarias para llevar a cabo la respiración microaeróbica es controlada por una cascada regulatoria que se activa luego de la percepción de bajos niveles de oxígeno en el bacteroide por el sistema de dos componentes integrado por las proteínas FixJ y FixL. En términos generales, en condiciones de baja tensión de O₂, FixJ-L inducen la expresión de las proteínas FixK y NifA, las cuales activan la expresión de los genes *fix* y los genes *nif* respectivamente. Además en el bacteroide la expresión de los genes *nif* está positivamente regulada por el hambreado de N a través del factor σ^{54} (Fischer, 1994). Estos cambios transcripcionales en el rizobio diferenciado están acompañados por cambios que conllevan a una regulación negativa en la mayoría de otros procesos metabólicos, direccionando así el metabolismo de la bacteria para llevar a cabo de forma casi exclusiva la FBN.

La nitrogenasa además de reducir el N₂ puede reducir otros compuestos como el acetileno y los protones a hidrógeno molecular, esta última es una reacción catalizada por la nitrogenasa que ocurre normalmente en forma simultánea con la reducción del N₂, esto genera una pérdida de eficiencia del sistema fijador de nitrógeno por consumo de ATP.

Los bacteroides dependen totalmente de la planta para obtener la energía necesaria para fijar el nitrógeno, los principales compuestos orgánicos transportados al interior de los bacteroides a través de la MPB son los intermediarios del ciclo del ácido cítrico, en particular los ácidos de cuatro carbonos como succinato, malato y fumarato. Éstos ácidos son utilizados como donadores de electrones para la producción de ATP. El producto que se obtiene de la actividad nitrogenasa es el amonio, que se asimila formando glutamato y glutamina que son aminoácidos precursores de proteínas. En las leguminosas de origen

templado el nitrógeno es exportado principalmente en forma de glutamina y asparagina, representando este último entre un 60%-70% de total de compuestos nitrogenados exportados. Aunque la proporción entre las distintas amidas puede variar, las leguminosas de origen templado exportan amidas independientemente de si obtienen el nitrógeno o no a través de la FBN. Sin embargo, las leguminosas de origen tropical exportan amidas, glutamina y asparagina fundamentalmente, cuando crecen a expensas de una fuente de nitrógeno mineral y, sin embargo, al establecer una asociación simbiótica, estas especies pasan a sintetizar ureidos como compuesto para distribuir el nitrógeno al resto de la planta.

I.6.4. Competencia de los rizobios por el nicho simbiótico. Transferencia horizontal de genes y modificaciones de la capacidad simbiótica.

Los rizobios se caracterizan por su capacidad de interactuar con las raíces de las plantas leguminosas y establecer una relación simbiótica. Estudios moleculares han permitido descubrir que la mayor parte de la información requerida para el establecimiento de la simbiosis se encuentra localizada en plásmidos simbióticos (pSym), o en islas simbióticas dependiendo del tipo de rizobio.

El genoma bacteriano está restringido a genes que codifican para funciones básicas como la traducción, transcripción, regulación y metabolismo primario de la bacteria. Una parte de esa información puede ser intercambiada, perdida o ganada por transferencia horizontal de genes. La mayoría del material transferido horizontalmente es parte de un paquete genético flexible (Boucher *et al.*, 2001) que contiene genes que son útiles para la adaptación a un determinado medio ambiente pero que no son indispensables para la sobrevivencia de la bacteria. Estos genes son los que se encuentran implicados en la fijación de nitrógeno (*nif*) y genes implicados en la nodulación (*nod*). La ubicación de estos genes puede ser cromosomal en islas simbióticas como ocurre en *Mesorhizobium loti* y en el género *Bradyrhizobium* ó extracromosomal en plásmidos simbióticos como en *Rhizobium leguminosarum bv. viciae*, *Rhizobium etli* y *Sinorhizobium meliloti*.

Con el desarrollo y abaratamiento de los costos de las tecnologías de secuenciamiento masivo, se han logrado grandes avances en el estudio del origen y evolución de los rizobios. Sin embargo, en la familia *Bradyrhizobiaceae* el origen y mecanismo de la transmisión de los genes simbióticos sigue siendo poco conocida. En tal sentido, se ha reportado recientemente, un aislamiento de *Bradyrhizobium sp.* que posee su genoma compuesto por un cromosoma y un plásmido de 0,7 Mbps. Se encontró que dicho

plásmido codifica genes relacionados con funciones simbióticas incluyendo nodulación, fijación de nitrógeno, y sistemas de secreción de proteínas el tipo III / IV y posee un menor contenido de GC (60,1%) en relación al del cromosoma (64,4%). Okazaki *et al.*, (2015) han sugerido que este plásmido podría estar relacionado con el origen de la isla simbiótica que se encuentra presente en el genoma de otros *Bradyrhizobium*.

La presencia de plásmidos en los rizobios, principalmente en los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, es una característica importante. El número y tamaño entre diferentes especies y dentro de una misma especie de rizobio, es muy variable pudiendo llegar a representar cerca del 50% del genoma (Pistorio *et al.*, 2008). En los plásmidos simbióticos suelen encontrarse los genes necesarios para la nodulación y la FBN, pero la mayoría de los plásmidos no tienen una función asociada y frecuentemente se los denomina plásmidos crípticos o no simbióticos. La función de estos plásmidos podría ser, entre otras, la de conferir propiedades adicionales que le permitan a las poblaciones bacterianas colonizar y competir en comunidades naturales.

La transferencia horizontal de genes (HGT, del inglés “*Horizontal Gene Transfer*”) puede tener ciertas implicancias cuando se utilizan a los rizobios como inoculantes ya que puede existir una HGT de las bacterias introducidas, a la población nativa del suelo. Sullivan *et al.*, (1995) demostraron que genes cromosomales simbióticos de una cepa inoculante de *Mesorhizobium loti* fueron transferidas a bacterias no simbióticas lo que les permitió nodular en una pastura de *Lotus corniculatus*. Estudios más recientes (Barcellos *et al.*, 2007) confirmaron la HGT entre cepas de *B. japonicum* utilizadas como inoculantes y cepas indígenas en la región de los Cerrados en Brasil.

I.7. Factores ambientales que inciden sobre el establecimiento de las asociaciones simbióticas rizobio-leguminosa.

Como hemos mencionado en las secciones precedentes, el establecimiento de las simbiosis fijadoras de nitrógeno rizobio-leguminosa es el resultado de una compleja serie de eventos coordinados de inter-comunicación y diferenciación entre ambos simbioses, planta y bacteria. Finalmente se formarán nódulos radicales ocupados por rizobios, encargados de fijar nitrógeno atmosférico a través de su actividad nitrogenasa. En este contexto, el modo en que cada participante de la simbiosis percibe al otro está siempre condicionado por el entorno químico y el espacio físico en el que se encuentran. En este marco, los diferentes factores ambientales pueden modificar el metabolismo de los rizobios, la generación de sus señales simbióticas, y/o la transmisión de las mismas para

ser efectivamente percibidas por la contraparte. Durante la preinfección, cuando los rizobios todavía no han ingresado aún a la raíz de la planta huésped, factores ambientales tales como temperatura, salinidad, pH, presencia de nitratos, elementos tóxicos y fotosíntesis inadecuada (entre otros) pueden ser condicionantes absolutos del establecimiento y desarrollo de la simbiosis (Brockwell *et al.*, 1995). En particular el suelo, y el medio ambiente en términos más genéricos, deben ser considerados por lo tanto como partícipes inseparables de este proceso simbiótico. Hoy en día contamos con abundante información sobre el modo en que diferentes tipos de suelo y de estreses ambientales modifican a cada uno de los simbioses y a su propia comunicación (Zahran, 1999). Como veremos en las secciones siguientes, el factor ambiente agrega una variable compleja y poco susceptible de generalizaciones al esfuerzo de comprender el proceso simbiótico en condiciones naturales.

I.7.1. Acidez del suelo

La acidificación del suelo es un proceso natural que ocurre muy lentamente en suelos con alta pluviometría con la consecuente pérdida de bases. Sin embargo la agricultura intensiva, muy extractiva y el uso de fertilizantes de reacción ácida acelera este proceso. La acidez es un problema complejo, debido a, en parte, elevadas concentraciones de protones, principalmente cuando el pH del suelo es inferior a 5. Además, la variación en la concentración de protones afecta la biodisponibilidad y toxicidad de aluminio y magnesio, y disminuye la disponibilidad de calcio, molibdeno y fósforo. En estas condiciones el aluminio móvil en la solución del suelo puede alcanzar niveles tóxicos para las plantas y las bacterias del suelo (Barrientos *et al.*, 1994)

Asimismo, las poblaciones de rizobios varían en su tolerancia a los principales factores ambientales (Wei *et al.*, 2008). La acidez del suelo es un problema muy importante que enfrenta muchas regiones agrícolas del mundo y limita la productividad de las leguminosas ya que la mayoría requieren un suelo neutro o ligeramente ácido para el crecimiento, especialmente cuando dependen de la FBN (Bordeleau & Prevost, 1994). Las leguminosas y sus rizobios presentan diferentes respuestas a la acidez del suelo y algunas especies como *Medicago sativa* son muy sensibles, mientras que otras como *Desmodium incanum* toleran condiciones ácidas (Silva *et al.*, 2001; Maldaner *et al.*, 2014). El pH del suelo constituye uno de los principales factores limitantes de la fijación de nitrógeno debido al retraso o supresión de la formación de los nódulos porque afecta directamente la sobrevivencia de los rizobios o indirectamente limitando la disponibilidad

de nutrimentos como calcio, magnesio y molibdeno y/o la presencia de elementos tóxicos como el aluminio y magnesio.

Los rizobios varían en su tolerancia a diferentes valores de pH. Las cepas de crecimiento rápido en general son menos tolerantes a pH ácidos que las de crecimiento lento como *Bradyrhizobium*, aunque algunas cepas pertenecientes a las especies *R. loti* y *R. tropici* son muy tolerantes a la acidez (Graham *et al.*, 1994). Varios trabajos han demostrado que el pH citoplasmático de las bacterias ácido tolerantes es menos afectado por la acidez externa. Asimismo, Aaron y Graham (1991) reportaron altos niveles de potasio y glutamato citoplasmático en células de *R. leguminosearum* bv. *phaseoli* sometidas a este tipo de estrés.

En general, cuando el pH del suelo es inferior a 5, el fracaso de la nodulación de la leguminosa se debe a la baja persistencia de los rizobios en tales condiciones. En este contexto, la selección de rizobios ácido-tolerantes ha sido utilizada para mejorar el establecimiento y desempeño exitoso de la simbiosis (Del papa *et al.* 1999). Por otro lado, en el establecimiento de la simbiosis, la etapa más sensible a las condiciones de acidez del suelo se produce en la fase de infección, al inicio de la unión del rizobio con el pelo radicular, y la leguminosa es el factor limitante para el establecimiento de la simbiosis. Las distintas especies de leguminosas difieren en su tolerancia a la acidez. En condiciones de acidez se limita mucho la persistencia de los cultivos, la simbiosis, y a consecuencia de ello el manejo adecuado de la fertilización nitrogenada. Téngase en cuenta que la provisión de nitrógeno a la leguminosa depende fuertemente de la FBN resultante de su asociación con rizobios eficientes. Sin el uso de fertilizantes nitrogenados, la restricción para introducir y estabilizar el uso de leguminosas en suelos ácidos condiciona fuertemente el uso de otros cultivos en un marco sustentable. Además el agregado de cal o carbonatos a los suelos con pH ácidos permitiría aumentar o reestablecer la población de rizobios y mejorar la eficiencia simbiótica.

I.7.2. Temperatura

Otro factor limitante son las temperaturas extremas que afectan la sobrevivda de los rizobios en el suelo y a las leguminosas, principalmente tropicales que crecen generalmente en ambientes de altas temperaturas. Asimismo, las plantas dependientes del nitrógeno fijado simbióticamente son más afectadas que aquellas plantas que utilizan el nitrógeno del suelo. En el caso de los microorganismos, las altas temperaturas pueden

producir varios efectos, pero la desnaturalización de las enzimas constituye el factor más limitante para su supervivencia, presentando variaciones según el género o la especie. También disminuye la producción de sideróforos, compuestos hierro-quelantes producidos por los rizobios, más difundido entre las especies del género *Rhizobium* que en *Bradyrhizobium* ya que éste género evolucionó en suelos ácidos donde el hierro está normalmente más disponible. Generalmente los rizobios pueden sobrevivir en suelos secos y toleran temperaturas más altas, incluso hasta 40°C o mayores, sin embargo, si el suelo está húmedo, temperaturas inferiores a la señalada se convierten en perjudicial para la persistencia de los rizobios.

La temperatura óptima para la nodulación y fijación de nitrógeno varía entre especies y géneros pero dentro de un pequeño rango, en general entre los 20°C - 30°C (Date & Ratcliff, 1989), siendo temperaturas entre 35°C y 40°C críticas para el desarrollo del proceso simbiótico (Michiels *et al.*, 1994). Cuando estas condiciones se producen en la zona radicular, se afecta fuertemente la adhesión bacteriana y la fijación de nitrógeno (Mohammadi *et al.*, 2012) así como también la infección del pelo radicular, diferenciación del bacteroide y la estructura y funcionamiento de los nódulos. Varios autores han reportado que las altas temperaturas afectan la calidad de los exudados radiculares, la producción de flavonoides y enzimas de hidrólisis de la pared celular como pectinasas y xilanasas (Sheokand *et al.*, 2012)

I.7. 3. Salinidad

La salinidad es un serio problema para la agricultura principalmente en las regiones áridas y semiáridas donde las precipitaciones no son suficientes para transportar las sales fuera de la zona de exploración radicular. Casi el 40% de las tierras del mundo pueden ser categorizadas con potenciales problemas de salinidad, siendo Argentina uno de los países más afectados por halomorfismo después de Rusia y Australia, según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).

Las sales predominantes son generalmente cloruros y sulfatos de sodio, calcio y a veces magnesio y pueden estar presentes pequeñas cantidades de carbonatos y bicarbonatos. Estos suelos son moderadamente alcalinos y en general requieren riego para su uso agrícola (Niste *et al.*, 2013). El incremento de la salinidad resulta en una disminución de la producción de los cultivos y afecta las poblaciones microbianas del suelo, provocando toxicidad y estrés osmótico (Thrall *et al.*, 2008). La mayoría de las plantas leguminosas requieren un suelo neutro o ligeramente ácido para el crecimiento, especialmente cuando

depende de la fijación simbiótica de nitrógeno, siendo la planta huésped más sensible a la salinidad que su contraparte los rizobios. Singleton *et al.*, (1982) mencionan que las condiciones salinas pueden limitar la simbiosis porque se afecta la supervivencia y proliferación de rizobios en el suelo y en la rizosfera, inhibe el proceso de infección, afecta directamente la función nodular y / o reduce el crecimiento de las plantas, la fotosíntesis y la demanda de nitrógeno. Estudios realizados por Zahran (1991) reportan varias leguminosas tolerantes a las sales como *Vicia fava*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*. Otras como *Medicago sativa* y *Acacia* son tolerantes a las sales pero menos que sus rizobios. También la simbiosis leguminosa-rizobio y la formación del nódulo son más sensibles a la salinidad o estrés osmótico que los rizobios (Nabizadeh *et al.*, 2011). El estrés salino inhibe el punto de inicio de la relación simbiótica, reduce la actividad fijadora de nitrógeno, atribuido usualmente a la reducción de la respiración nodular (Ikeda *et al.*, 1992), y a la disminución de la producción de leghemoglobina en el citosol (Garg & Manchanda, 2008).

Las bacterias del género *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son más tolerantes a la sal que su leguminosa huésped y muestran una marcada variación en su tolerancia al estrés salino. Singleton *et al.* (1982) no encontraron correlación entre la habilidad de distintas cepas de rizobios para crecer al 0,6 % P/V de cloruro de sodio y el origen de las mismas provenientes de suelos salinos y no salinos. Parece no existir relación entre la salinidad del suelo de origen y la sensibilidad de distintas cepas a este factor. Muchas especies bacterianas se adaptan a las condiciones salinas por acumulación intracelular de solutos orgánicos llamados osmolitos que le permiten contrarrestar el efecto de la deshidratación por la baja actividad del agua del medio que las rodea, los rizobios utilizan este mecanismo de osmoadaptación. También cambios en la morfología, alteraciones en la composición de la membrana celular y producción de trehalosa son procesos de adaptación que permiten la supervivencia de los rizobios bajo condiciones de estrés salino (Streeter, 2003; Medeot *et al.*, 2007). Además las cepas que producen EPS son, en general, más tolerantes a la salinidad (Xavier *et al.*, 2007).

El éxito de la simbiosis bajo estrés salino requiere la selección de rizobios nativos de dichos ambientes. La inoculación de leguminosas con rizobios tolerantes a la alta salinidad mejora la fijación de nitrógeno en ambientes salinos. Sin embargo, la adaptación de la leguminosa huésped a dicho ambiente es el factor más importante para que se produzca una simbiosis efectiva.

I.7.4. Humedad

La humedad óptima para los rizobios en el suelo es el 75% de la capacidad de campo pero pueden sobrevivir en aquellos ambientes con limitados contenidos de agua. Allí la densidad de la población tiende a ser más baja hasta que se reestablecen las condiciones, si bien hay rizobios adaptados a esos ambientes. Asimismo la supervivencia y la actividad de los microorganismos pueden depender de la distribución entre los microhábitat y los cambios del contenido hídrico del suelo. Las bacterias tienen la capacidad de tolerar el estrés por desecación por la síntesis o acumulación de osmolitos en sus células. La trehalosa es un osmolito que puede proteger las macromoléculas de la célula rizobiana frente a un estrés por desecación.

El déficit hídrico puede conducir a cambios morfológicos en las bacterias así como una eventual reducción de la infección y nodulación en la leguminosa huésped. Contenidos de humedad muy bajos pueden conducir a una reducción significativa del número de hilos de infección dentro de los pelos radicales e inhibir la nodulación (Zahran, 1999).

El estrés por sequía afecta negativamente la FBN en las leguminosas principalmente en el establecimiento y la actividad simbiótica. Además, el cambio en la turgencia de las hojas produce variaciones en el flujo del floema modificando la actividad nodular. El transporte de agua y nutrimentos a los nódulos se realiza a través del floema, por lo tanto la sensibilidad de la fijación del nitrógeno a la sequía podría ser consecuencia de la dependencia del flujo del floema de las hojas que a su vez es sensible al potencial hídrico foliar. Por lo tanto la economía del agua de los nódulos puede ser sensible a los cambios del estado hídrico de la planta. Dependiendo de la morfología, los nódulos indeterminados son más tolerantes a la sequía y al tener meristema permanente se pueden recuperar cuando se reestablecen las condiciones de humedad, en cambio los nódulos determinados son más sensibles y presentan baja capacidad de recuperación (Sheokand *et al.*, 2012) Además, las leguminosas tropicales que exportan ureídos como producto de la FBN son más sensibles a las condiciones de sequía en el suelo.

I.7. 5. Deficiencia de nutrientes

El fósforo es el segundo elemento limitante para el desarrollo de las leguminosas después del nitrógeno. Más del 30% de las tierras cultivables del mundo presentan deficiencia de este elemento que en general no está disponible sino formando complejos insolubles con cationes. Los suelos tropicales y subtropicales son particularmente propensos a la deficiencia de fósforo para la planta, siendo esencial también para el

proceso de nodulación y fijación de nitrógeno. Los nódulos son fuertes sumideros de fósforo en comparación con las raíces, hojas y brotes y una carencia de este nutrimento disminuye notablemente la formación de nódulos. Algunas leguminosas presentan mecanismos adaptativos para tomar el fósforo del suelo cuando este elemento es deficiente aumentando la producción y secreción de fosfatasas ácidas, modificando la arquitectura de la raíz y asociándose a micorrizas (Vance *et al.*, 2003).

Por otro lado, las cepas de rizobios difieren en relación a su tolerancia a la deficiencia de fósforo, las de crecimiento lento son más tolerantes que las de crecimiento rápido a bajos niveles de este nutrimento. Al-Niemi *et al.*, (1997) han informado que *Rhizobium tropici* en estado de vida libre y como bacteroide responde al estrés por fósforo aumentando su capacidad de transporte e induciendo la expresión de diversas fosfatasas. En general, la nodulación, la fijación de nitrógeno y las actividades específicas del nódulo están directamente relacionadas a la disponibilidad/suministro de fósforo a la planta.

Otros elementos importantes que afectan la nodulación y fijación de nitrógeno son el calcio, azufre y potasio. Los requerimientos de calcio, al igual que el fósforo se incrementan bajo condiciones de estrés severas. La salinidad y acidez afectan la disponibilidad de calcio en las etapas iniciales de la formación del nódulo. También la multiplicación de los rizobios en la rizósfera está limitada por la baja disponibilidad de calcio debido a que juega un papel esencial en la división celular, elongación, estructura y función de la membrana (O'Hara *et al.*, 1988). Además, es importante en las primeras etapas de la infección pudiendo inhibir el encurvamiento y la nodulación, si la disponibilidad de calcio es baja.

La iniciación del nódulo se ve afectada por deficiencia de cobalto a través de su efecto sobre los rizobios y el boro limita desarrollo del nódulo alterando el crecimiento celular de la planta. Otro elemento que condiciona el desarrollo nodular es el hierro porque afecta a los rizobios, distintas cepas que presentan diferentes capacidades para adquirir este elemento y su limitación dificulta el desarrollo simbiótico. El molibdeno es un micronutriente esencial como componente de la enzima nitrogenasa, al igual que el hierro, por lo que la función nodular requiere más de este elemento que la planta huésped, pero en algunas simbiosis fijadoras de nitrógeno puede limitarse por la baja disponibilidad de calcio, hierro, cobre y cobalto (O'Hara *et al.*, 1988).

El nitrógeno es un elemento crítico para la mayoría de las plantas debido a su falta de disponibilidad (Graham & Vance, 2003). Este elemento combinado afecta el desarrollo de los nódulos y la fijación de nitrógeno. La presencia en el suelo de iones amonio y

nitratos inhibe la nodulación aunque las leguminosas difieren en la susceptibilidad a estos compuestos. Un exceso de nitratos disminuye la deformación de pelos radicales, la adhesión microbiana a sus paredes y el número de hilos de infección, siendo en consecuencia menos factible que se inicie el proceso simbiótico. Por otro lado el amonio producido por la actividad nitrogenasa se asimila rápidamente, pero el nitrato proveniente del suelo necesita ser previamente reducido por la enzima nitrato-reductasa, sin embargo un exceso de amonio reprime la producción y actividad de la nitrogenasa (Frioni, 1999).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

Consideraciones Generales

Desmodium incanum es una leguminosa nativa que presenta un gran potencial forrajero, sin embargo el desconocimiento sobre distintos aspectos de esta leguminosa ha sido una de las causas del escaso desarrollo que ha tenido los planes de domesticación y mejoramiento en el país. En el marco de una producción sustentable la FBN por rizobios en asociación simbiótica con *Desmodium incanum* es un factor importante en la conservación de los suelos y la producción de forraje para consumo animal.

HIPÓTESIS

Se centra en que las poblaciones de rizobios nativos noduladores de *D. incanum* presentan amplia diversidad genética y variada capacidad para fijar nitrógeno entre los simbioses, ello colaborará en la tarea de seleccionar cepas más eficientes con potencial interés agronómico.

En el presente trabajo se pretende caracterizar a nivel bioquímico y molecular los rizobios noduladores de *Desmodium incanum* como así también la asociación simbiótica entre ambos. Abordaremos los objetivos que se describen a continuación, a fin de evaluar aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de las bacterias aisladas de nódulos de *Desmodium incanum* recolectados en el campo y los provenientes de ensayos de laboratorio. Los resultados que se obtengan permitirán seleccionar cepas más eficientes que constituyen un material valioso como potenciales candidatos para ser considerados en los programas de selección de rizobios como inoculantes.

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar a nivel funcional y molecular los rizobios noduladores de *Desmodium incanum* en ecosistemas de Argentina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar plantas de poblaciones de *Desmodium incanum* de diferentes ambientes.

- Establecer una colección de rizobios naturales noduladores de *Desmodium incanum* aislados de plantas y suelos.
- Caracterizar fenotípica y genotípicamente la colección de los aislados.
- Estudiar y caracterizar las propiedades simbióticas de cepas representativas de la colección.
- Evaluar la habilidad de las cepas para la Fijación Biológica de Nitrógeno.
- Evaluar la performance en suelo de los aislamientos que presenten potencial interés agronómico.

Tesis Doctoral - Toniutti María Antonieta

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos

II.1. Poblaciones de estudio de *D. incanum* y aislamientos de rizobios

II.1.1. Poblaciones de estudio de *D. incanum*

Se recolectaron nódulos de raíz, muestras de suelo y semillas de ocho poblaciones de *D. incanum* de diversas regiones de centro y norte de Argentina (Figura II.1). Para cada población se registraron sus coordenadas geográficas a través de un posicionamiento geográfico satelital (GPS). Cada población que se colectó estaba representada al menos por cinco plantas y se herborizó un ejemplar que fue determinado taxonómicamente y conservado en el Herbario “Arturo E. Ragonese” (reconocido internacionalmente bajo la sigla SF) de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

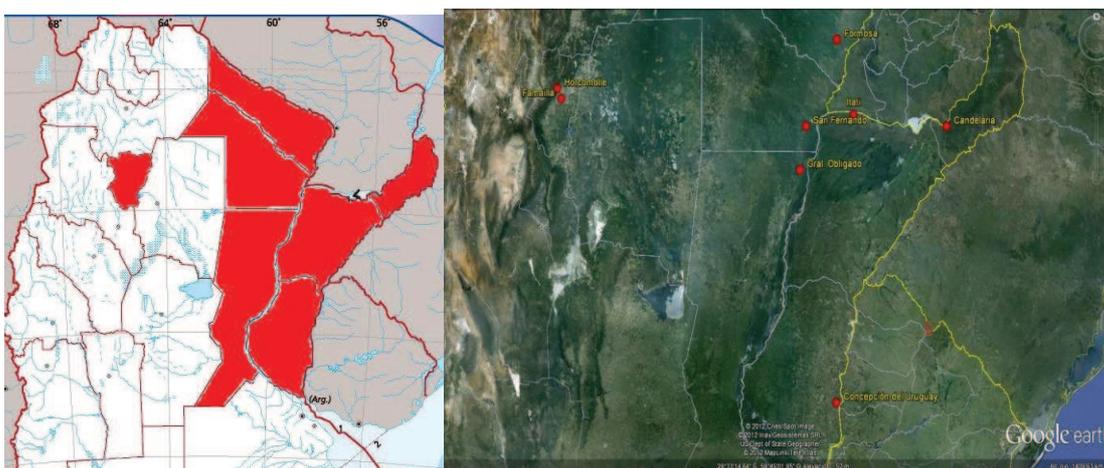


Figura II.1. Mapa donde se señalan las provincias y los sitios de muestreo de las poblaciones de *D. incanum*. (Google Earth, <https://www.google.com/maps>).

Se recogieron semillas de 20 a 40 plantas para asegurar una muestra representativa y se almacenaron a 4 °C. En cada sitio de colección se analizaron las características fisicoquímicas de una muestra del suelo (Tabla III.4 Cap. III). Las características de ambiente, vegetación y edáficas más relevantes de los sitios muestreados fueron almacenadas en un banco de datos.

II.1.2. Aislamiento de rizobios a partir de nódulo

Los nódulos de las distintas poblaciones de *Desmodium incanum* DC recolectados, fueron removidos con un bisturí y posteriormente cada uno colocado en fosas de placa multipocillo estériles. Luego se los desinfectó superficialmente según el siguiente protocolo:

- Tratamiento con alcohol 96° durante 60 segundos.
- 1 lavado con agua destilada estéril.
- Tratamiento con peróxido de hidrógeno (30 volúmenes) durante 3 a 4 minutos.
- 6 lavados con agua destilada estéril

Posteriormente en cada pocillo se agregaron 300 µl de H₂O destilada estéril y los nódulos fueron macerados individualmente, para liberar los rizobios. A partir de estas suspensiones, se realizó el aislamiento sembrando una alícuota sobre el medio de cultivo sólido diferencial LMA (Levadura-manitol-Agar). Las placas inoculadas con la muestra fueron incubadas en estufa a 28 °C durante 10 días y a partir de una colonia aislada se realizó otro aislamiento en el mismo medio (Vincent, 1970). Luego de la incubación se observó el desarrollo de las estrías (aspecto, coloración, velocidad de crecimiento) y aquellas colonias aisladas que se correspondieron a las características descritas para los rizobios (Vincent 1970) fueron repicadas a otra placa con medio LMA para disponer de cultivos puros. Se tomaron muestras de esta última placa para conservar los aislamientos en medio CLM con agregado de glicerol al 50 %.

II.1.3. Aislamiento de rizobios a partir de muestras de suelo

Preparación de las muestras

Las muestras de suelos recogidas fueron oreadas a temperatura ambiente para eliminar el exceso de humedad, luego se tamizaron utilizando una malla de 2 mm. El tamiz se desinfectó con alcohol 96 ° y se flameó antes de tratar cada muestra con el fin de evitar contaminaciones. Luego las muestras de suelo fueron conservadas a 4 °C hasta el momento de ser analizadas.

Recuperación de los rizobios

La recuperación de los rizobios se realizó con la ayuda de las diferentes poblaciones de plantas de *D. incanum* hospedantes que actuaron como plantas trampa (Tabla II.1). Para ello se sembraron semillas germinadas en condiciones de asepsia en vasos de 350

Tabla II.1. Poblaciones de plantas de *Desmodium incanum* en sus respectivos suelos de origen y procedencia de las plantas trampa.

P	Id P	Suelo de origen		Planta trampa	Id	Lugar de procedencia	
		Provincia	Departamento			Provincia	Departamento
P1	6837	Entre Ríos	Uruguay	<i>D. incanum</i>	6850	Entre Ríos	Concordia
P3	6888	Misiones	Candelaria	<i>D. incanum</i>	6897	Corrientes	Itatí
P4	6907	Formosa	Formosa	<i>D. incanum</i>	6907	Formosa	Formosa
P5	6926	Chaco	San Fernando	<i>D. incanum</i>	6926	Chaco	San Fernando
P6	6989	Tucumán	Famailla	<i>D. incanum</i>	6989	Tucumán	Famailla
P8	6935	Santa Fe	Gral. Obligado	<i>D. incanum</i>	6935	Santa Fe	Gral.Obligado
P9	7565	Tucumán	Yerba Buena	<i>D. incanum</i>	6992	Tucumán	Capital
P10	6897	Corrientes	Itatí	<i>D. incanum</i>	6897	Corrientes	Itatí

Referencias:

P: Población, Id: Identificación correspondiente al número de catálogo de colección del Dr. Pensiero (UNL).

cm³ de capacidad que contenían vermiculita estéril y suelo de origen en relación 5:1. Las plantas permanecieron en cámaras de crecimiento 70 días regándolas periódicamente con agua destilada estéril. (Ver sección II.7.3).

Las plantas fueron cosechadas y los nódulos recolectados se conservaron en tubos con sílica-gel. Luego fueron rehidratados durante cinco horas en agua destilada estéril antes de someterlos al proceso de desinfección superficial, y se procesaron como se detalló anteriormente.

La vermiculita fue esterilizada por tindalización en autoclave, sometiéndola durante 30 minutos a 120 °C.

II.1.4. Colección de aislamientos noduladores de *D. incanum*

A partir de los nódulos recolectados de campo y aquellos provenientes de las muestras de suelo en condiciones de crecimiento controlado, se realizaron aislamientos de rizobios en medio LMA como se detalló en la sección II.1.2 y II.1.3.

En la Figura II.2 se detalla el esquema de trabajo utilizado para establecer la colección de rizobios noduladores de *D. incanum*.

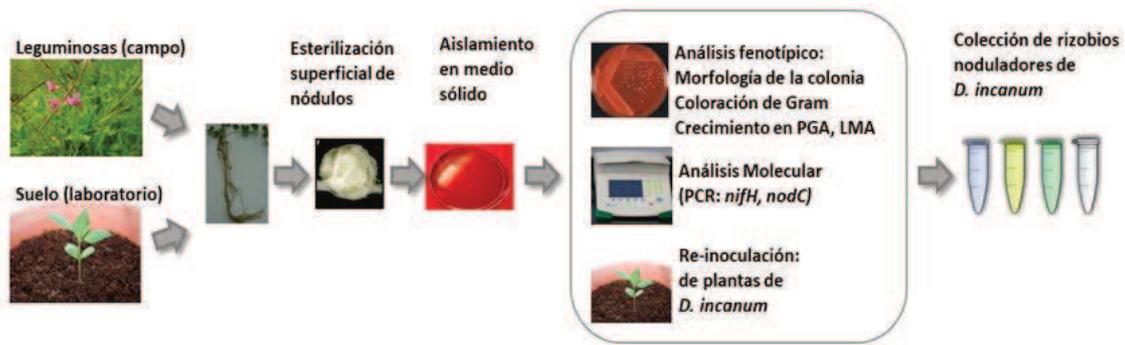


Figura II.2: Estrategia empleada para el establecimiento de la colección de rizobios noduladores de *D. incanum*. A partir de diferentes muestras (leguminosas silvestres y nódulos generados en ensayos de nodulación realizados en condiciones controladas con nuestras de diferentes suelos) se extrajeron nódulos, de los cuales se aislaron y analizaron las rizobacterias.

Los aislamientos obtenidos fueron clasificados de acuerdo a la población de plantas (sitios de origen) y conservados según se describe en la sección II.2.3 de este capítulo. Cada aislamiento se codificó con la letra P asignándole el primer número correspondiente a la población seguido de un número correspondiente al aislado.

Los rizobios aislados fueron sometidos a diversas pruebas para descartar la presencia de posibles contaminantes:

- Tinción diferencial de Gram (Vincent, 1970)
- Característica de crecimiento en PGA: se sembraron los cultivos en placas con medio PGA y se incubaron a 28 °C. Se conservaron las cepas que no presentaron crecimiento o fue muy escaso luego de 48-72 h de incubación, ni modificaron el pH del medio que indica la presencia de contaminantes (CIAT, 1988).
- Pruebas de nodulación en *D. incanum*: los aislados fueron confirmados ensayando su capacidad de producir nódulos en la planta huésped (Vincent, 1970) empleando frutos extraídos de las poblaciones de plantas colectadas en el campo se extrajeron las semillas, que fueron superficialmente desinfectadas y germinadas como se detalla en sección II.7.1, y se colocaron en macetas con una mezcla de vermiculita y perlita estéril (1:1). Luego de 10 días, las plántulas fueron inoculadas con los aislamientos correspondientes al sitio de origen de cada planta como se describe en la sección II.7.2. Las plantas permanecieron en condiciones de crecimiento controlado y 45 días post-infección, fueron removidas y examinadas para corroborar la presencia de nódulos. A partir de los nódulos formados se aislaron las cepas en medio LMA.

II.2. Cepas bacterianas y medios de cultivo para rizobios

II.2.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas (cepas de referencia y aislamientos de suelos argentinos) utilizadas durante esta Tesis se detallan en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Cepas bacterianas de referencia y aislamientos utilizados en este trabajo.

Espece bacteriana	Cepa	Referencia/Fuente
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	E109	INTA, Argentina
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	SEMIA 5079	PESAGRO, Brasil
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	USDA 6 ^T	Kaneko <i>et al.</i> , 2002
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i>	USDA110 ^T	Colección USDA
<i>Bradyrhizobium. elkani</i>	USDA 76 ^T	Colección USDA
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	CCBAU0071 ^T	Yao <i>et al.</i> , 2002
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	3622 ^T	Gu <i>et al.</i> , 2007
<i>Bradyrhizobium betae</i>	PL7461	Rivas <i>et al.</i> , 2004
<i>Bradyrhizobium betae</i>	DSM 17288 ^T	Rivas <i>et al.</i> , 2004
<i>Bradyrhizobium desnitrificans</i>	DSM 1113 ^T	van Berkum <i>et al.</i> 2006
<i>Bradyrhizobium jicamae</i>	PAC 68 ^T	Ramirez-Bahena, M.H. 2009
<i>Rhizobium hainanmense</i>	CCBAU57015 ^T	Gu <i>et al.</i> , 2007
<i>Ensifer meliloti</i>	LPU63	Del Papa <i>et al.</i> , 1999
<i>Ensifer teranga</i>	CB3126	Fornasero <i>et al.</i> , 2014
Rhizobios noduladores de <i>D. incanum</i> (Argentina)	PN - XXX	Referencia/Fuente
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	P1 - 2	Este trabajo
<i>Rhizobium</i> spp	P1 - 5 (3 _c)	ídem
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	P3 - 18	ídem
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	P4 - 13	ídem
<i>Rhizobium</i> spp	P4 - 2 (2 _c)	ídem
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	P5 - 23	ídem
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	P6 - 20	ídem
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	P8 - 23	ídem
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	P9 - 15	ídem
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	P10 -17 (1 _c)	ídem
<i>Rhizobium</i> spp	P10 - 5 (1 _c)	ídem

Referencias: PN: Población-número. XXX: número de aislamientos. (XXXc): número de aislamientos recuperados a partir de nódulos de campo del total de la población.

II.2.2. Medios de cultivo y conservación de rizobios

Para cultivar las cepas de rizobios, se utilizó el medio de cultivo extracto de levadura-manitol-agar (LMA). La composición (en g.l⁻¹) del caldo extracto de levadura-manitol (CLM) se detalla a continuación: extracto de levadura 0,4; manitol 10; NaCl 0,1; MgSO₄.7H₂O 0,2; K₂HPO₄ 0,5; rojo congo 2,5.10⁻⁵ (Vincent 1970).

En los ensayos de identificación bacteriana se eligió el medio PSY o TY. El medio PSY (Regensburger & Hennecke, 1983) contiene peptona 1 g l⁻¹, extracto de levadura, 1 g l⁻¹, KH₂PO₄ 0,3 g l⁻¹, Na₂ HPO₄ 0,3 g l⁻¹, MgSO₄.7 H₂O 0,1 g l⁻¹, CaCl₂ 0,05 g l⁻¹ y micronutrientes: Na₂MoO₄.2H₂O 0,1 mg l⁻¹, ZnSO₄ 2H₂O 1 mg l⁻¹, Fe Cl₃ CuSO₄ .5H₂O 0,5 mg l⁻¹, MnCl₂ 0,15 mg l⁻¹, H₃BO₃ y biotina 0,2 mg l⁻¹. En forma independiente se autoclavaron el MgSO₄.7 H₂O y el CaCl₂.2H₂O para completar el medio. La solución de micronutrientes se esterilizó por filtración con filtros Millipore de 0,22 µm y se preparó en un stock 1.000 X. El medio TY (Beringer, 1974) posee la siguiente composición: CaCl₂.2H₂O 0,7 g l⁻¹, triptona 5 g l⁻¹, extracto de levadura 3 g l⁻¹.

Para detectar la presencia de posibles contaminantes se utilizó el medio Peptona-Glucosa-Agar (PGA) según lo recomendado por el CIAT, (1988) cuya composición es la siguiente: glucosa 5 g l⁻¹; peptona 10 g l⁻¹ y púrpura de bromocresol (1% en etanol) 10ml l⁻¹ (Somasegaran & Hoben, 1985).

En las pruebas de acidificación -alcalinización se modificó el CLM adicionando el indicador de pH azul de bromotimol (0.5 % (p/v) en alcohol etílico 96°) 2,5.10⁻⁵ g.l⁻¹ en sustitución del colorante rojo congo (Somasegaran & Hoben 1985). La determinación se realizó observando la variación del color del indicador en el caldo de cultivo: pH menor de 6,5 color amarillo indica acidificación del medio, pH 6,8 color verde, y pH superior a 7,5 color azul, corresponde a la alcalinización del mismo. Para los experimentos de tolerancia a la acidez y alcalinidad, el medio LMA fue modificado acidificándolo con HCl 1 N estéril o alcalinizándolo con NaOH 0,5 N estéril.

En los experimentos de recuento de rizobios presentes en el suelo por el método del número más probable (NMP) se utilizó como diluyente Agua de peptona cuya composición es: peptona 1 g l⁻¹, hexametáfosfato sódico [(NaPO₃)₆] 10 g l⁻¹.

En todos los casos, para la preparación de medios sólidos se añadió agar al 1,5 % y la esterilización de los medios y las soluciones stock se realizó durante 20 minutos a 121 °C en autoclave.

II.2.3. Conservación de cepas

Para su conservación a largo plazo las bacterias fueron cultivadas en CLM sin rojo congo hasta fase logarítmica tardía, se suplementaron con glicerol estéril 25 % (v/v) o 50 % (v/v) y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

II.3. Evaluación de la sensibilidad rizobiana a diferentes tipos de estreses abióticos

Se evaluó la capacidad de los aislamientos noduladores de *D. incanum* para crecer en medio LMA seleccionando diferentes condiciones de estrés, por ser éstas las que pueden estar presentes en los suelos donde habita esta planta. Para probar la tolerancia a la salinidad de los aislados, se añadieron 10 μl de una dilución de cultivo que contenía aprox. 10^4 bacterias. ml^{-1} en placas LMA con diversas concentraciones de NaCl -i. e., 0,5 % p/v (0,08 M), 1 % p/v (0,17 M), 2 % p/v (0,34 M) y 3 % p/v (0,51 M). La capacidad de cada aislado para crecer en las diferentes concentraciones de NaCl se registró 10 días después de la incubación bacteriana a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. En un ensayo comparable, se estudió la tolerancia al pH de los aislamientos con placas LMA que contenían medios a pH ajustados a 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 y 10,0. El efecto de la temperatura sobre el crecimiento de los aislados se investigó con placas LMA (pH 7) incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas estas pruebas se realizaron por duplicado y se estimó el crecimiento bacteriano en una escala de 0 a 3 (0, la falta de crecimiento, 3, desarrollo completo) comparándolo con placas control pH 7, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0,01 % p/v (0,002 M) NaCl.

Se utilizaron como control las siguientes cepas tipo: *Rhizobium hainanense* CCBAU57015T, *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 10071T, *Bradyrhizobium elkanii* USDA 76T y *Bradyrhizobium liaoningense* U 3622T.

II.4. Técnicas de biología molecular

II.4.1. Preparación de una solución de ADN a partir de microorganismos cultivados en medio sólido.

El ADN genómico bacteriano se extrajo utilizando la metodología descrita por Boom y colaboradores (Boom, et al. 1990). Se resuspendieron cinco a diez colonias aisladas en 400 μl de NaCl 1 M en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, las mismas fueron tomadas con un ansa o una punta (tip) a partir de una caja LMA o TY. Se agitó con vortex para favorecer

la homogenización de la muestra. Luego se centrifugó 10-15 minutos a 21.000 g para recolectar los rizobios, el *pellet* fue resuspendido en 250 μ l de una solución (20 % p/v) de sacarosa en TE mediante vorteo y con la ayuda de una punta de tip. Luego se agregó 250 μ l de lisozima (5mg.ml⁻¹ en TE) a cada muestra y se incubó a 37° C en estufa durante una hora. Finalizado ese tiempo se agregó 50 μ l de sarcosil-pronasa (10 mg.ml⁻¹ en TE), se mezcló manualmente sin vortear y fue incubado nuevamente en estufa a 37 °C durante una hora. Luego se centrifugó 15 minutos o hasta la formación del *pellet* a 21.000 g y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo donde se agregó 10 μ l de una suspensión de sílica al 30 % p/p (en agua). Esta suspensión se vorteoó y centrifugó, y el *pellet* bien formado fue lavado con 400 μ l de solución de lavado (50 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,5; 2,5 mM EDTA; 50 % V/V etanol), esta operación se repitió dos veces más. Posteriormente se retiró el sobrenadante y el *pellet* se secó en estufa 10 a 15 minutos a 37 °C. Luego fue resuspendido en 70 μ l de agua bidestilada estéril y se incubó en un baño termostático a 60 °C durante 10 minutos. Finalmente se centrifugó 3 minutos a 21000 g y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Las muestras así preparadas se conservaron a -20 °C.

II.4.2. Preparación de una solución de ADN a partir de microorganismos cultivados en medio líquido

Se centrifugaron 500 μ l de un cultivo saturado en TY a 21.000 g durante 3-4 minutos. El sedimento fue lavado con 300 μ l de agua bidestilada estéril y luego se procedió según el protocolo descrito en la sección II.4.1.

Todas las soluciones usadas para la extracción de ADN se esterilizaron previamente en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

II.4.3. Condiciones generales de PCR

Todas las amplificaciones del trabajo fueron realizadas en los termocicladores Bioer o Mastercycler gradient de Eppendorf. Las condiciones de PCR fueron variables de acuerdo a los *primers* utilizados. Alícuotas de 2 a 5 μ l de los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X, posteriormente fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (5x10⁻⁴ mg/ml) y fotografiados bajo luz UV. Las imágenes fueron digitalizadas con la cámara Kodak DC120. Todos los geles fueron preparados en cubas de electroforesis de 7 x 10 cm; 15 x 10 cm o 25 x 15 cm (BIO-RAD) y las fuentes de poder utilizadas fueron PowerPac 200 y 300 (BIO-RAD).

II.4.4. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *nifH*

Se amplificó una región de 784 pb del gen *nifH*. Los *primers* utilizados nifHf/nifHR (Tabla II.3) fueron descritos por Laguerre *et al.* (2001). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l, con 50 a 100 ng de ADN, buffer de polimerasa (10 mM Tris-Cl pH 9), 1,5 mM MgCl₂, 20 μ M de cada dNTP, 0,1 μ M de cada primer y 0,6 U de *Taq* polimerasa. El ciclo empleado para la amplificación constó de las siguientes etapas: una desnaturalización inicial 94° C, 4 minutos seguida de 36 ciclos de amplificación: 94 °C, 30 segundos; 53 °C, 20 segundos y 72 °C, 1 minuto con una elongación final a 72 °C por 2 minutos.

II.4.5. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *nodC*

Se amplificó una región de 930 pb del gen *nodC*. Los *primers* utilizados nodCF/nodCI (Tabla II.3) fueron descritos por Laguerre *et al.* (2001). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l, con 50 a 100 ng de ADN, buffer de polimerasa (10 mM Tris-Cl pH 9), 2,5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0,4 μ M de cada primer y 1 U de *Taq* polimerasa. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: una desnaturalización inicial 94° C, 4 minutos seguida de 36 ciclos de amplificación: 94 °C, 30 segundos; 53 °C, 20 segundos y 72 °C, 1 minuto con una elongación final a 72 °C por 2 minutos

II.4.6. Amplificación por PCR de secuencias internas del gen 16S ARNr

Para la amplificación de la secuencia del gen 16S ARNr se utilizaron los *primers* rD1/fD1 descritos por Weisburg *et al.* (1991) o 27f y 1385r descritos por Weidner *et al.* (1996) y detallados en la Tabla II.3. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Laguerre *et al.* (1994).

El ciclo empleado para la amplificación constó de las siguientes etapas: una desnaturalización inicial 94 °C, 4 minutos seguida de 35 ciclos de amplificación: 94 °C, 1 minuto; 52 °C, 1 minuto y 72 °C, 2 minutos con una elongación final a 72 °C por 4 minutos.

II.4.7. Obtención de perfiles de *fingerprint* de ADN, mediante la amplificación genómica con *primers* BOXA1R y MBOREPI

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l, con 2,5 μ l de las preparaciones de ADN, buffer de polimerasa (10 mM Tris-Cl pH 9: 25 °C), 3 mM

MgCl₂, 200 μM de cada dNTP, 1,5 μM de cada *primer* y 1 U de *Taq* polimerasa. En la Tabla II.3 se muestran las secuencias de los *primers* utilizados.

El ciclo empleado para la amplificación para MBOREP1-PCR constó de las siguientes etapas: una desnaturalización inicial 94 °C, 4 minutos seguida de 35 ciclos de amplificación: 94 °C, 1 minuto; 48 °C, 1 minuto y 65 °C, 8 minutos con una elongación final a 72 °C por 8 minutos.

El ciclo empleado para la amplificación para BOXA1R-PCR constó de las siguientes etapas: una desnaturalización inicial 94 °C, 4 minutos seguida de 36 ciclos de amplificación: 94 °C, 20 segundos; 50 °C, 1 minuto y 68 °C, 8 minutos con una elongación final a 68 °C por 16 minutos.

Tabla II.3. Secuencia de los *primers* utilizados en las distintas reacciones de PCR.

Nombre	Oligonucleótido: Secuencia (5'→3')	Referencia
rD1	AAGGAGGTGATCCAGCC	Weisburg <i>et al.</i> (1991).
FD1	AGAGTTTGATCCTgGCTCAG	Weisburg <i>et al.</i> (1991).
27f	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	Weidner <i>et al.</i> (1996)
1385r	CGGTGTGTRCAAGGCC	Weidner <i>et al.</i> (1996)
MBOREP 1	IIIICGICGICATCIGGC	Versalovic <i>et al.</i> (1991)
MBOREP 2	ICGICTTATCIGGCCTAC ^a	Versalovic <i>et al.</i> (1991)
BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	De Bruijn <i>et al.</i> (1992)
Y1	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	Young <i>et al.</i> (1991)
Y2	CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT ^a	Young <i>et al.</i> (1991)
nifHF	TACGGNAARGGSGGNATCGGCA ^a	Laguerre <i>et al.</i> (2001)
nifHR	AGCATGTCTYCSAGYTCNTCCA	Laguerre <i>et al.</i> (2001)
nodCF	AYGTHGTYGAYGACGGTTC ^a	Laguerre <i>et al.</i> (2001)
nodCI	CGYGACAGCCANTCKCTATTG ^a	Laguerre <i>et al.</i> (2001)

Referencias:

^a Y=C o T, H=A, C o T, R=A o G, S=C o G, K=G o T, N=A, C, G o T, I=inosina

II.4.8. Electroforesis de ADN: Separación e identificación de fragmentos de ADN

La verificación de la calidad de las preparaciones de ADN y la separación de fragmentos de ADN se llevaron a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa de concentración entre 0,8 % y 1,5 % en *buffer* TBE (Tris 89 mM, EDTA Na₂ 2,5 mM, H₃BO₃ 89 mM, pH=8,2). Este mismo *buffer* se utilizó como solución de corrida. El voltaje de trabajo varió entre 50 y 120 volts/cm según los tamaños a separar. Como solución de

siembra se utilizó sacarosa 40 % y azul de bromofenol 0,25 % en una relación 5 μ l solución de ADN en agua o TE / μ l solución de siembra. El agregado de 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio a los geles de agarosa permitió la visualización de los fragmentos de ADN por transiluminación con luz ultravioleta de $\lambda = 260$ nm. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital bajo iluminación UV.

El ADN amplificado en los *fingerprints* fue analizado mediante una electroforesis horizontal en geles de agarosa 1,5 % en buffer TBE 0.5X sembrando una alícuota de 10 μ l de la mezcla de reacción. La electroforesis fue llevada a cabo a 100 V durante 1 hs, en buffer TBE 0,5X.

La estimación del tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos por PCR se realizó utilizando como patrón de peso molecular el marcador comercial Ladder 50 bp o Ladder 100 bp (Productos Bio-Lógicos) o bien el ADN del fago λ digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII*.

En todos los casos los perfiles de fingerprints fueron analizados estableciendo como presencia (1) o ausencia (0) de bandas para cada individuo. Los datos fueron utilizados para generar dendogramas UPGMA (Coeficiente de similitud de DICE) a partir del análisis de los *fingerprints* derivados de BOXA1R-PCR empleando los programas FAMD (Fingerprint Analysis with Missing Data) versión 1.23 beta (Schluter & Harris, 2006) y MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 5 (Tamura *et al.*, 2011). El software Cross Checker se utilizó para la construcción de la matriz binaria. Los cladogramas fueron construidos con el propósito de observar los grupos de aislados según el sitio de procedencia (Figura V.2) y separar los grupos de aislados con mayor similitud dentro de cada población (Figura V.3). Para cada aislado fueron considerados valores de similitud mínima del 70 % y máxima del 100 %.

II.4.9. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Los productos de PCR fueron amplificados y corridos en geles de agarosa (1-2 %). Las bandas correspondientes fueron eluidas del gel y purificadas usando el kit comercial Gel Purification Kit (Bioneer) o alternativamente los *primers* y nucleótidos en exceso fueron eliminados mediante precipitación del producto de PCR con una solución PEG 8000 al 20 % (Rosenthal *et al.*, 1993) o por tratamiento enzimático con ExoSAP (Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del proveedor. Esta alternativa provee una forma sencilla de limpiar los productos de PCR antes de la secuenciación. La exonucleasa I elimina los

cebadores en exceso, mientras que la fosfatasa alcalina de camarón elimina fosfatos 5' terminales de los dNTPs restantes.

II.4.10. Determinación de la concentración de ADN en una muestra

La concentración y calidad de las preparaciones de ADN se analizó por medidas de la absorbancia a 260 y 280 nm. Las medidas y cálculos fueron realizados en un equipo Nanodrop ND1000 (Nanodrop Technologies) según las especificaciones del fabricante.

II.4.11. Secuenciamiento de fragmentos de ADN

Las secuencias nucleotídicas parciales de los genes 16S rADN y *nodC* se obtuvieron en el servicio de secuenciación de INTA Castelar (Argentina) o Macrogen (Corea).

II.5. Programas informáticos destinados al análisis de secuencia

Las secuencias nucleotídicas parciales de ADNr 16S y *nodC* se depositaron en GenBank con los números de acceso KX857639 a KX857654 y KX857655 a KX857659, respectivamente. Las búsquedas de similitud de ADN y proteínas se llevaron a cabo con el programa BLAST del Centro Nacional de Información de Biotecnología. El análisis de la secuencia ADNr 16S se realizó contra la base de datos EzBiocloud ADNr 16S (que sólo contiene las secuencias curadas de cepas tipo; <http://www.ezbiocloud.net/>). Las secuencias de nucleótidos se alinearon con ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). El paquete de software MEGA 7 se usó para análisis filogenéticos usando el ajuste indicado en cada figura específica. Los alineamientos ADNr 16S se realizaron utilizando fragmentos internos de secuencias que abarcan las posiciones homólogas a los nucleótidos 180 a 1350 del gen ADNr 16S de *B. elkanii* USDA 76^T (U35000).

Los alineamientos *nodC* se realizaron utilizando secuencias que cubren aprox. 680 pb con las posiciones homólogas que se extienden entre los nucleótidos 460 a 1140 del gen *nodC* en *B. elkanii* USDA 76^T (HQ233221). Los análisis filogenéticos se llevaron a cabo utilizando el programa MEGA 7 (la historia evolutiva se dedujo utilizando el método estadístico de máxima probabilidad (método de *Maximum Likelihood*) basado en el modelo de Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993). La filogenia se reconstruyó a partir de fragmentos *nodC* amplificados según Laguerre *et al.* (2001). Las secuencias de ADN de referencia fueron obtenidas de GenBank. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística

se obtienen de forma automática mediante la aplicación de los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por parejas calcula utilizando el método de Maximum Composite Likelihood (MCL), y luego se selecciona la topología con un valor de probabilidad log superior. Se empleó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias de tipo evolutivas entre sitios. El análisis de confianza se llevó a cabo a través del método *bootstrapping* mediante la realización de 1000 réplicas de la construcción del árbol filogenético.

II.6. Identificación y clasificación de rizobios por MALDI-TOF MS

La espectrometría de masas, conocida como *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS), es una técnica utilizada en la identificación de microorganismos mediante la creación de un espectro basado en el perfil de proteínas, que es único para una especie dada. En este trabajo, la identificación y clasificación de rizobios mediante MALDI-TOF MS se realizó utilizando un espectrómetro de masas Ultraflex III MALDI-TOF / TOF y el software MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) de acuerdo con Jia *et al.* (2015). En primer lugar se amplió la base de datos de referencia con cepas pertenecientes a diversas especies de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* como se informó anteriormente por Ferreira *et al.* (2011) y Sánchez-Juanes *et al.* (2013). Las cepas de referencia incluidas en la base de datos de la biblioteca MALDI Biotyper 3.1 extendida para la identificación de especies basadas en MALDI-TOF MS se muestran en la Tabla II.2. La preparación de la muestra se llevó a cabo de acuerdo con la recomendación del fabricante, ya sea recogiendo una sola colonia (frotis directo) o 1 µl de sobrenadante que contenía proteínas (método de extracción con etanol/ácido fórmico) de cepas *Bradyrhizobium* spp. y *Rhizobium* spp. cultivadas en medio PSY suplementado con 0,1% de arabinosa o medio TY, respectivamente. Las muestras se colocaron sobre la diana MALDI y se recubrieron con 1 µl de solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en solución orgánica (acetoniitrilo al 50 %, ácido trifluoroacético al 2,5 %). Los espectros se registraron mediante el software Flex Control 3.3 (Bruker Daltonics) en un modo lineal positivo a una tensión acelerada de 19 KV en el intervalo de 2 a 20 KDa. La intensidad del láser se eligió de manera que se obtuviesen espectros con intensidades de pico máximas absolutas, que oscilaban entre aproximadamente 5×10^3 y 10^4 unidades arbitrarias. La calibración

externa se realizó con el estándar de prueba bacteriana Bruker (Bruker Daltonics). Las identificaciones MALDI-TOF MS se clasificaron utilizando los valores de puntuación descritos en Ferreira et al. (2011): ≥ 2 especies de identificación; entre 1,7 y 1,9 identificación de género; <1.7 sin identificación.

II.7. Ensayos con plantas

Los ensayos con plantas se realizaron para la recuperación de rizobios de suelo (II.1.3) para confirmar los aislamientos que nodulan *D. incanum* a través de pruebas de nodulación (II.1.4) y para estimar la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en condiciones hidropónicas (II.7.4), en suelo no estéril (II.7.6) y compatibilidad simbiótica en otras leguminosas (II.7.5).

Las leguminosas utilizadas en este trabajo fueron las siguientes: *D. incanum*, *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium lathyroides*, *Vicia sativa* y *Glycine max*.

II.7.1. Desinfección y germinación de semillas

Las semillas de *D. incanum*, *Macroptilium lathyroides* y *Vicia sativa* fueron previamente escarificadas en forma manual con papel de lija. Este método provoca fisuras en el tegumento causando aumento de la permeabilidad de las semillas (Burkart, 1952). Luego, estas semillas así como las de *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max* se desinfectaron superficialmente como se describe en Fornasero et al. (2014). Finalmente, se enjuagaron seis veces con H₂O destilada estéril y se mantuvieron en agua una hora hasta hinchazón.

Las semillas pequeñas se distribuyeron en placas de Petri sobre agar-agua 1,0 % p/v) y permanecieron en oscuridad a 28 °C de temperatura durante 72-96 h hasta su germinación (Figura II.3), las semillas más grandes se colocaron en bandejas con papel humedecido con agua estéril y se incubaron en las mismas condiciones.

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



Figura II.3. Semillas germinadas de *D. incanum*

Luego, de acuerdo al tipo de ensayo, las semillas que presentaron una radícula de 10-15 mm de longitud fueron colocadas en vasos conteniendo vermiculita y suelo de origen (5:1), como soporte inerte, y libre de nitrógeno fijado, vermiculita más perlita estériles (1:1) o bien en macetas con suelo (no estéril) más arena estéril (3:1). Las semillas no comerciales *Desmodium incanum*, *Macroptilium lathyroides* y *Vicia sativa* utilizadas en los ensayos fueron provistas por el Banco de Germoplasma “Ing. Agr. José Mario Alonso” FCA-UNL a través de los viajes de colecta realizados en el centro y norte de Argentina. Las semillas de Soja Grupo de maduración VI (*Glicine max*) y poroto blanco tipo alubia (*Phaseolus vulgaris*) fueron provistas por la Cátedra de Cultivos Extensivos (FCA-UNL).

II.7.2. Preparación del cultivo bacteriano e inoculación de las plántulas

El cultivo bacteriano utilizado para inocular las plantas se preparó partiendo de una colonia aislada de la bacteria, la cual fue posteriormente incubada a 28 °C en agitación continua a 180 rpm en medio CLM durante cinco días. Previamente se realizó un ensayo en el que se determinó por el Método de recuento en placas, las unidades formadoras de colonia (ufc) de las suspensiones celulares de cada muestra (Vincent, 1970).

A partir de los cultivos saturados se sedimentaron los rizobios por centrifugación para eliminar restos de medio de cultivo y se resuspendió el sedimento en igual volumen de PBS estéril. El buffer fosfato salino PBS contiene: 1,44 g l⁻¹, Na₂HPO₄, 0,22 g l⁻¹ KH₂PO₄, 0,2 g l⁻¹, KCl y 8 g l⁻¹ NaCl, pH entre 7.2 y 7.4. Se tomaron 10 ml de esta suspensión (aprox. y se los depositó sobre el tallo adyacente a la raíz de la plántula para evitar la dispersión del inoculante. En todos los ensayos se incluyeron controles de leguminosas sin inocular.

Las plantas fueron regadas periódicamente con agua destilada estéril, o con solución mineral libre de nitrógeno Jensen (Jensen, 1942) para proveer de los nutrientes necesarios para el crecimiento. La solución mineral libre de nitrógeno Jensen contiene: 1 g l⁻¹ CaHPO₄, 0,2 g l⁻¹ MgSO₄.7H₂O, 0,2 g l⁻¹ NaCl, 0,2 g l⁻¹ K₂HPO₄ y 0,1 g l⁻¹ FeCl₃.6H₂O. La solución fue esterilizada en autoclave 20 minutos a 120°C. Se le agregó luego 1 ml.l⁻¹ de la siguiente solución de micronutrientes: 3,73 g l⁻¹ KCl, 1,55 g l⁻¹ H₃BO₃, 0,85 g l⁻¹ MnSO₄.H₂O, 0,13 g l⁻¹ CuSO₄.5H₂O, 0,58 g l⁻¹ ZnSO₄.7H₂O, 0,018 g l⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄.H₂O.

II.7.3. Condiciones de cultivo de plantas en cámara de crecimiento

En todos los ensayos donde se utilizaron condiciones controladas se empleó una cámara de crecimiento de plantas mantenida bajo 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, 50-60% de humedad relativa y 25-28 °C.

II.7.4. Estimación de la FBN en condiciones hidropónicas

Semillas germinadas de *D. incanum* fueron transferidas a vasos de poliestireno de 350 cm^3 de capacidad conteniendo vermiculita: perlita (1:1) estéril regadas con solución mineral Jensen libre de nitrógeno. Se realizó un raleo previo a la inoculación quedando una plántula por maceta. Repeticiones de 5 plántulas fueron inoculadas con 2 ml de una suspensión saturada de rizobios (10^8 ufc/ml) en medio CLM más 8 ml de agua destilada estéril. Además de los tratamientos inoculados se incluyeron controles no inoculados sin y con adición de KNO_3 0,05 % (p/v) (70 ppm N) dividido en cinco aplicaciones desde el inicio del ensayo, y plantas inoculadas con la cepa de referencia *Rhizobium hainanense* CCBAU 57015T. Las macetas se mantuvieron en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas durante 60 días, y las plantas se regaron periódicamente con solución Jensen diluido (1:5) o agua destilada estéril. Luego de 6 semanas de inoculadas se cosecharon 5 plantas por tratamiento. Se separó la parte aérea (tallo y hojas), raíz y los nódulos. Se midió la altura desde la base del tallo hasta el ápice de la planta, longitud de raíz y el número de nódulos por planta. Todo el material fue secado en estufa a 60 °C hasta peso constante. Se determinó el peso de la parte aérea y radicular de las plantas y masa nodular.

El índice de eficiencia relativa (ER) fue calculado a través de la fórmula adaptada de Brockwell, *et al.* (1966) donde:

$$\text{ER} = \frac{(\text{MS TI} - \text{MS T})}{(\text{MS T+N} - \text{MS T})} \times 100$$

Referencias:

- EF: Índice de eficiencia relativa (%)
- MS TI: Materia seca de las plantas tratamiento inoculado (mg)
- MS T: Materia seca tratamiento control (mg)
- MS T+N: Materia seca tratamiento control con nitrógeno (mg)

II.7.5 Ensayos de compatibilidad simbiótica

Se evaluó la capacidad de los aislamientos seleccionados por su eficiencia simbiótica en condiciones hidropónicas para formar nódulos y fijar nitrógeno eficientemente

mediante la inoculación cruzada en plantas de *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium lathyroides*, *Vicia sativa* y *Glicine max*. Las semillas germinadas como se describió en la sección II.7.1, se colocaron individualmente en vasos de poliestireno de 350 cm³ conteniendo vermiculita: perlita (1:1) estéril y se inocularon con 2 ml (10⁸ ufc/ml) de la suspensión bacteriana en medio CLM. Las plántulas permanecieron en cámaras de crecimiento en condiciones controlada durante 35 días regándolas periódicamente con solución Jensen (libre de nitrógeno) diluído (1:5) alternando con agua destilada estéril. Los grupos de plantas se hicieron por cuadruplicado y a los tratamientos inoculados se incluyeron un control no inoculado sin y con el agregado de KNO₃ 0,05 % (p/v) (70 ppm N). Después de este período se evaluó la capacidad de nodulación de los aislamientos en cada especie de planta, si las mismas eran color verde oscuro, vigorosas y los nódulos presentaron una coloración rosada al corte, se consideró que el rizobio inoculado podía formar nódulos eficientes en la planta huésped y en consecuencia definirse como fijador de N. Se determinó el número de nódulos y el peso de la parte aérea y radicular de las plantas por secado en estufa a 60 C ° hasta peso constante.

II.7.6. Ensayos en suelo no-estéril

Se analizó la capacidad de aislados rizobianos seleccionados para soportar el crecimiento de las plantas en macetas que contenían suelo no estéril.

El ensayo se llevó a cabo en los invernaderos del Campo Experimental de la FCA (UNL) (31° 26'S- 60° 56'O), Las semillas de *D. incanum* utilizadas fueron colectadas de una población de plantas de la localidad de Alejandra, provincia de Santa Fe (29° 55' S- 59°48'O) ingresadas al del Banco de germoplasma FCA-UNL bajo N° 00445. Las semillas fueron previamente escarificadas, desinfectadas y pre-germinadas antes del ensayo según se detalla en el punto II.7.1. El suelo empleado para el análisis del comportamiento simbiótico de cepas noduladoras de *D. incanum* seleccionadas fue Argiudol ácuico Serie Recreo, de textura Franco-limosa, de la localidad de Esperanza-Santa Fe (31° 23' S- 60° 54' O). Una muestra compuesta de suelo extraída de 20 cm de profundidad fue tratada como se especifica en la sección II.1.3. En la Tabla II.4 se presentan las características fisicoquímicas completas del mismo. Previo a la instalación del ensayo se determinó el número de rizobios nativos compatibles con *D. incanum* en el suelo.

Tabla II.4. Características fisicoquímicas del suelo utilizado en el análisis del comportamiento simbiótico de rizobios noduladores de *D. incanum* en condiciones no estériles (Laboratorios Molisol Totoras- Santa Fe- Argentina).

Análisis	Resultado	Referencia
Materia orgánica total Walkley y Black (%)	2,41	Medio
Carbono orgánico Walkley y Black (%)	1,40	Medio
Nitrógeno total (%)	0,12	Medio
pH en agua (relación 1:2,5) potenciometría	6,62	Neutro
Conductividad eléctrica (relación 1:2,5) (us/cm)	50	No salino
Azufre de Sulfatos ext. PO4 Turbidimetría (ppm)	11,20	Medio
Fósforo asimilable Bray I 1:7 (ppm)	18,20	Alto
Nitrógeno de Nitratos CTA (ppm)	14,20	Medio
Zinc DTPA EAA (ppm)	1,00	Medio
Cobre DTPA EAA (ppm)	1,20	Alto
Hierro DTPA EAA (ppm)	58,50	Alto
Manganeso DTPA EAA (ppm)	25,40	Alto
Capacidad de intercambio catiónico (meq/100 g)	17,20	Medio
Calcio intercambiable EAA (ppm)	1700	Medio
Magnesio intercambiable EAA (ppm)	241	Alto
Potasio intercambiable EAA (ppm)	555	Muy alto
Sodio intercambiable EAA (ppm)	45	Bajo
Boro asimilable azometino (ppm)	0,42	Bajo
SMP buffer pH	6,63	Neutro

II.7.6.1 Determinación del número de rizobios en las muestras de suelo

La determinación del número de rizobios capaces de nodular *D. incanum* se realizó por dilución de la muestra de suelo con el medio agua de peptona 0,1 % (p/v) estéril como diluyente, según el Método del Número Más Probable (NMP). Se prepararon tres series de diluciones 1:10. En Erlenmeyer conteniendo 90 ml de diluyente se incorporaron 10 g de suelo. La mezcla se agitó durante 20 minutos a 160 rpm en un agitador orbital con el objetivo de dispersar los agregados del suelo y las bacterias queden en suspensión. De esta manera quedó conformada la primera dilución y se repitió el proceso hasta lograr la dilución 6. En tubos de ensayo de 50 cm³ de capacidad que contenían solución de Jensen

agarizada en forma de pico de flauta esterilizada, se colocó una plántula de la leguminosa por tubo. Transcurridos 7 días, se inocularon las plántulas con 1 ml de cada dilución de suelo, adyacente a la raíz de cada plántula en el tubo. Se realizaron cuatro réplicas de cada dilución. Las plántulas permanecieron en condiciones controladas, luego de cuatro semanas fueron cosechadas y se contó el número de plantas noduladas. Con este valor y el número de repeticiones por dilución de suelo se estimó el número más probable de rizobios por gramo de suelo (NMP/g suelo) utilizando la tabla de NMP (Fisher & Yates, 1963) según lo descrito por Vincent (1970). Para expresar el resultado por gramo de suelo seco, se tomó una porción de la muestra y se determinó su humedad mediante secado en estufa de 60 °C hasta peso constante.

II.7.6.2. Diseño experimental ensayo con suelo no estéril

El experimento se llevó a cabo en macetas, con los siguientes tratamientos: I) plantas de control no inoculadas, II) plantas no inoculadas y fertilizadas con N (cinco aplicaciones de 48,4 mg de N como urea cada 10 días durante 6 semanas, dando como resultado aproximadamente 240 mg de N incorporado en cada maceta), y III) plantas procedentes de semillas que habían sido inoculadas por un procedimiento similar con 6 de los aislados locales seleccionados por su eficiencia simbiótica en condiciones hidropónicas, o con las cepas tipo *Rhizobium hainanense* CCBAU57015^T o *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU 10071^T. Para investigar la capacidad de cepas seleccionadas de rizobios para apoyar el crecimiento de la planta, se inocularon plantas de 14 días de edad con 10 ml de una suspensión de rizobios en medio CLM que contenía aproximadamente 10⁹ ufc/ml (ver sección II.7.2). Los experimentos se realizaron en macetas de tres litros de capacidad aproximadamente (6 repeticiones, 18 plantas cada tratamiento) que contenían una mezcla de suelo no estéril y arena estéril (3: 1 p/p). Las macetas fueron regadas cada tres días con el volumen de agua estéril necesario para mantener el suelo a capacidad de campo, y permanecieron en invernadero a 28 ° C – 30 °C durante el día y 18 °C-20 °C durante la noche, con un fotoperíodo de 16 h- 8 h (luz-oscuridad) durante 60 días hasta inicio de floración. Se cosecharon las plantas individualmente y se secaron en estufa de aire forado a 60 °C durante 96 hs aproximadamente para la estimación del peso seco de la parte aérea y radicular, y la masa nodular. Además, se contaron los nódulos radiculares de cada planta.

Para determinar el contenido de nitrógeno total (%), la parte aérea de las plantas fueron molidas y el material vegetal fue analizado mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1990)

empleando el método semiautomático con digestor y destilador PRO-NITRO II. La cantidad total de nitrógeno acumulado en la biomasa aérea se calculó mediante el porcentaje de N por el peso seco aéreo de la planta. El porcentaje de proteína bruta se halló a partir del contenido de nitrógeno total (%) por el factor 6,25.

Los datos de la eficiencia de la fijación de N₂ se obtuvieron a partir de del dato de nitrógeno acumulado en la biomasa aérea (Brockwell, *et al.* 1966) donde

$$ER = \frac{(NMS\ TI - NMS\ T)}{(NMS\ T+N - NMS\ T)} \times 100$$

Referencias:

- EF: Índice de eficiencia relativa (%)
- NMS TI: Nitrógeno de la materia seca de las plantas tratamiento inoculado (mg)
- NMS T: Nitrógeno de la materia seca tratamiento control (mg)
- N MS T+N: Nitrógeno de la materia seca tratamiento control con nitrógeno (mg)

II.7.6.3. Estudios anatómicos de los nódulos

Los estudios anatómicos se llevaron a cabo mediante la utilización de preparados histológicos permanentes, realizados en el Laboratorio de Anatomía Vegetal (Facultad de Ciencias Agrarias, (U.N.L).

Para la obtención de los preparados histológicos, las muestras de nódulos frescos fueron fijadas en FAA (mezcla de formol, alcohol 70%, ácido acético, en partes iguales) por 48 h, deshidratadas a través de una serie creciente de etanol, clarificadas con xilol, e incluidas en parafina (D'Ambrogio de Argüeso, 1986; Ruzin, 1999). Se realizaron cortes seriados de 15µm de espesor, mediante la utilización de un micrótopo de rotación. Las secciones obtenidas fueron teñidas utilizando una doble coloración de safranina-*fast green*, y finalmente fueron montadas con bálsamo de Canadá (Johansen, 1940).

Todos los preparados fueron observados bajo un microscopio Leica DM1000, y fotografiados con una cámara digital Canon EOS REBEL T2i adaptada al mismo.

II.8. Análisis estadístico de datos

Los cálculos estadísticos en todos los ensayos con plantas se realizaron con el paquete de software InfoStat (Di Renzo *et al.*, 2013).

El ensayo de estimación de la FBN de los rizobios en simbiosis con *D. incanum* en condiciones hidropónicas fue conducido como un diseño completamente aleatorizado.

Los datos mostrados en las tablas y figuras corresponden a la media de cada tratamiento. Los datos se sometieron al análisis de varianza (ANOVA) y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con un 5 % de probabilidad ($p < 0,05$). Las variables dependientes fueron altura de planta, longitud de raíz, peso seco de la parte aérea y raíz de la planta, y número y masa seca de los nódulos radiculares.

En el ensayo de compatibilidad simbiótica con otras leguminosas los datos obtenidos de número de nódulos y materia seca de las plantas se analizaron según ANOVA y las medias se compararon según el test de Tukey $p < 0,05$.

El experimento del comportamiento simbiótico de los rizobios en suelo no estéril fue conducido como un diseño completamente aleatorizado. Las variables dependientes número y peso seco de nódulos, materia seca aérea y radicular de las plantas y N total acumulado en la materia seca de las plantas, fueron analizadas utilizando el ANOVA y un test para la diferencia entre las medias de los tratamientos (cepas) utilizando Tukey $p < 0,05$. Se calcularon valores de correlación (Pearson) y regresión lineal simple para estimar las relaciones entre las variables materia seca de nódulos, materia seca aérea de plantas y nitrógeno de la materia seca aérea de plantas.

Se verificó la normalidad de los datos para cada variable.

Para caracterizar la diversidad fenotípica de la colección de rizobios y determinar los factores abióticos asociados a esa diversidad se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Se utilizó el paquete de software InfoStat (Di Renzo *et al.*, 2013) que reduce el espacio multivariante a solo tres variables (componentes) que permiten discriminar aquellas que más influyen en los resultados estadísticos. Se incluyeron el total de los aislamientos de la colección y todas las variables analizadas para cada uno de ellos (diferentes temperaturas, niveles de pH y concentración de NaCl).

Tesis Doctoral - Toniutti María Antonieta

CAPÍTULO III

**Poblaciones de
Desmodium incanum
seleccionadas como
material de estudio**

III.1. ANTECEDENTES GENERALES

Los variados ecosistemas que presenta el extenso territorio de Argentina la ubican entre los 17 países que tienen más diversidad biológica específica del mundo. Su riqueza en especies es menor que la de los ambientes tropicales; sin embargo, éstas presentan gran variabilidad genética porque muchas se han adaptado a condiciones tanto subtropicales como templadas, lo que constituye una situación particular en el mundo (Knudsen, 2000). Además, existen importantes áreas dominadas por pastizales naturales siendo un recurso forrajero muy diverso destinado principalmente para la alimentación del ganado. Muchas veces el potencial forrajero disminuye debido a un manejo inadecuado de los pastos nativos combinado con una intensa presión de pastoreo y extinción de muchas especies en el campo (Overbeck *et al.*, 2007). Además, millones de hectáreas de pastizales nativos han sido convertidos en otros usos agrícolas (Martin & Agüero, 2014). En este contexto existe una necesidad de preservación del forraje y *Desmodium incanum* aparece como una alternativa prometedora debido a su potencial de recuperación de áreas de pastizales nativos afectados por los cultivos y por su persistencia en los ciclos agrícolas (Medeiros *et al.*, 2006). Esta especie se encuentra frecuentemente en estas zonas y debido a la simbiosis entre estas plantas y las especies de rizobios son responsables del aumento del contenido de nitrógeno en el sistema suelo-planta a través de la FBN (Tarré *et al.*, 2001).

Como ya hemos mencionado en la introducción de este trabajo, *D. incanum* es una leguminosa nativa con reconocido potencial forrajero y adaptada a diferentes condiciones edafoclimáticas de nuestro país. Presenta una gran plasticidad para crecer en diferentes tipos de suelos, desde los más arenosos, bien drenados, hasta aquellos con mayor contenido de materiales finos y drenaje deficiente, formando parte del estrato herbáceo de la flora nativa en distintas provincias fitogeográficas de Argentina. Particularmente en la provincia de Corrientes, se realizaron numerosos estudios en pastizales nativos sobre fenología, evolución a distintas cargas animal y respuestas a la fertilización de leguminosas nativas de interés forrajero, entre las que se encuentra *D. incanum*. Algunas se incorporaron en los Jardines de Introducción y se multiplicaron por semilla e incluyeron en asociaciones con pastos cultivados. En esta provincia la actividad ganadera se realiza sobre pastizales nativos donde la especie *Andropogon lateralis* está presente en casi todas las regiones ganaderas constituyendo la gramínea que domina los pastizales y entre las leguminosas, la más común es *Desmodium incanum* (Sanpedro, *et al.*, 2004).

En nuestro estudio nos planteamos caracterizar los rizobios nativos que nodulan *D. incanum* en los distintos ambientes de Argentina, para ello nos propusimos realizar viajes de colecta de plantas, semillas y suelo rizosférico.

Antes de realizar la colecta fue necesario contar con información previa (precolecta) como son el rango de distribución geográfica y mapa de distribución de la especie en Argentina, características morfológicas de la planta, preferencias ecológicas, y la información taxonómica de la especie (ver Capítulo I.3.1 y I.3.2). También fue necesario disponer del estado de conservación de la especie *in situ*, en zonas protegidas, como *ex situ* en bancos de germoplasma. Recientemente, en la Facultad de Ciencias Agrarias, dependiente de la Universidad Nacional del Litoral, se creó un Programa de Documentación, Conservación y Valoración para el conocimiento y conservación de la flora nativa (PRODOCOVA) con el objetivo de coleccionar y conservar *ex situ* distintas accesiones de especies en un Banco de Germoplasma. Actualmente se conserva germoplasma de especies nativas valoradas como forrajeras, colectadas a lo largo del territorio argentino y disponible para su estudio, entre las que se encuentra *D. incanum*. En este sentido, estudios realizados sobre técnicas de cultivo *in vitro* de *D. incanum* confirmaron que este procedimiento de cultivo de tejidos vegetales es promisorio para la propagación y conservación de germoplasma de esta especie como alternativa de conservación *ex situ* de recursos filogenéticos (Maldaner *et al.*, 2014; Schwalbert, 2016).

Toda esta información permitió organizar los viajes de colecta de poblaciones de *D. incanum* en todo el rango de distribución de esta especie en Argentina. Como la colecta es una etapa crítica ya que se necesita una importante inversión económica, para realizarla nos planteamos hacerlo en forma interdisciplinaria cuyo objetivo fue priorizar cantidad de poblaciones en todo el rango de distribución de diferentes especies de interés para el grupo. En este contexto se organizaron viajes de colecta al Noreste y Noroeste del país.

El objetivo del presente capítulo fue coleccionar poblaciones de plantas de *Desmodium incanum* procedentes del centro y norte de la República Argentina.

En este capítulo se realizó una descripción de las características fitogeográficas, edáficas y climáticas más relevantes los sitios de origen de las poblaciones colectadas.

III.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.2.1. Poblaciones de *Desmodium incanum* seleccionadas

En total se colectaron 8 poblaciones, procedentes de distintos ambientes del norte y centro del país de acuerdo con la distribución que presenta la especie (Figura III.1). De cada población se colectaron al menos cinco plantas, herborizándose un ejemplar representativo de la misma que fue conservado en el Herbario “Arturo E. Ragonese” (SF) de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral. Para cada colecta se registraron las localidades de procedencia de las poblaciones, con las respectivas coordenadas geográficas que se detallan en la Tabla III.1. También se colectaron semillas de cada población en estudio para ser utilizadas en los ensayos con plantas. En aquellas poblaciones en que no se disponía de semillas se utilizaron aquellas colectadas de poblaciones de localidades cercanas. En la tabla II.1 (capítulo II de esta tesis) se detallan el código de identificación y lugar de procedencia de las semillas.

Tabla III.1 Poblaciones de *Desmodium incanum* seleccionadas. Provincias, localidades y georeferenciamiento.

P	Id	Provincia	Departame	Ubicación	GPS	
P1	6837	Entre Ríos	Uruguay	Ruta nacional 14, al norte de Concepción del	32° 20' 9,6"	58° 15' 38,6"
P3	6888	Misiones	Candelaria	Ruta nacional 12, entre Candelaria y Santa Ana	27° 26' 13,0"	55° 38' 32,0"
P4	6907	Formosa	Formosa	Ruta nacional 81, 20 km al oeste de la ruta nacional	26° 00' 30,4"	58° 24' 05,5"
P5	6926	Chaco	San Fernando	Ruta nacional 11, 18 km al sur de Resistencia	27° 32' 53,4"	59° 08' 16,3"
P6	6989	Tucumán	Famailla	Ruta provincial 306, cruzando el Río Salí,	26° 58' 21,4"	65° 13' 49,4"
P8	6935	Santa Fe	General Obligado	Ruta provincial 100 s, 1 km al oeste de la ruta	28° 18' 30,0"	59° 16' 29,3"
P9	7565	Tucumán	Yerba Buena	Horco Molle	26° 46' 49,7"	65° 19' 37,9"
P10	6897	Corrientes	Itatí	Ruta nacional 12, 86 km al este de Corrientes	27° 19' 31,4"	57° 58' 17,5"

Referencias:

P: Población. GPS: Sistema de Posicionamiento Global.

Id: Identificación correspondiente al número de catálogo de colección del Dr. Pensiero.

La adaptación a ambientes variados de la especie y su amplia distribución permitió caracterizar a cada población en función de las regiones fitogeográficas. Según Cabrera (1994) la mayor parte del territorio de Argentina pertenece, desde el punto de vista

fitogeográfico, a la región Neotropical. En este territorio está representada por 3 de los 5 Dominios que posee, ellos son el Amazónico, Chaqueño y Andino-Patagónico, aunque *Desmodium incanum* sólo está presente en los Dominios Amazónico y Chaqueño.

Las poblaciones colectadas y analizadas corresponden, según el esquema fitogeográfico de Cabrera (1994) a 2 dominios, 4 provincias y 5 distritos fitogeográficos (Tabla III.2).

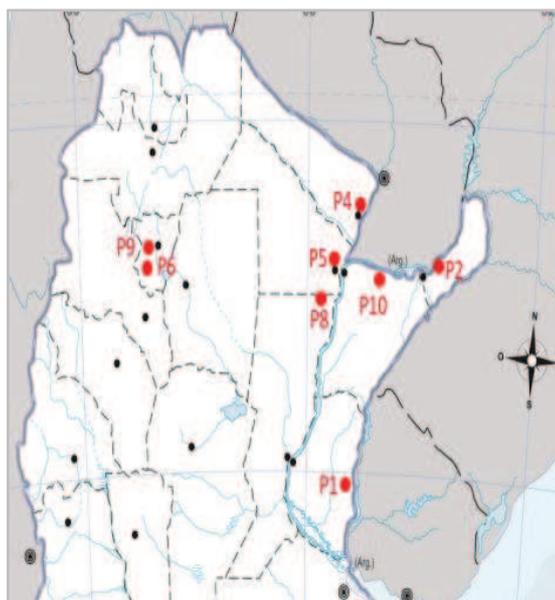


Figura III.1. Región de muestreo de *Desmodium incanum* DC. Se indica con círculos rojos los sitios de recolección de muestras.

Tabla III.2. Distritos fitogeográficos donde se encuentra *Desmodium incanum* D.C.

Población	Id	Caracterización Fitogeográfica		
		Dominio	Provincia	Distrito
P1	6837	Chaqueño	Espinal	Del Ñandubay
P3	6888	Amazónico	Paranaense	De los Campos
P4	6907	Chaqueño	Chaqueña	Chaqueño Oriental
P5	6926	Chaqueño	Chaqueña	Chaqueño Oriental
P6	6989	Amazónico	Yunga	Selvas de Transición
P8	6935	Chaqueño	Chaqueña	Chaqueño Oriental
P9	7565	Amazónico	Yunga	Selvas Montanas
P10	6897	Amazónico	Paranaense	De los Campos

Referencias:

Id: Identificación correspondiente al número de catálogo de colección del Dr. Pensiero.

Cada distrito fitogeográfico abarca una determinada región del país y está caracterizado por el tipo de suelo, clima y las comunidades vegetales que lo conforman.

III.2.2. Ubicación y caracterización fitogeográfica de las poblaciones de *Desmodium incanum* estudiadas

Población 1. Entre Ríos.

Se extiende por el sur de Corrientes, noroeste y centro de Entre Ríos y el centro de Santa Fe. Los suelos son arcillosos limosos de reacción casi neutra. El clima es cálido y húmedo con precipitaciones abundantes en primavera y verano. La comunidad climácica está compuesta por bosques de un solo estrato arbóreo que no supera los diez metros, un estrato arbustivo y otro herbáceo. Las especies dominantes son *Prosopis algarrobilla* (Ñandubay) y *Prosopis nigra* (Algarrobo negro), además es característica una palmera *Trithrinax campestris* (Caranday). El estrato arbustivo está integrado por *Castela tweediei*, *Cassia corimbosa*, entre otras especies. El estrato herbáceo es rico en gramíneas como varias especies de *Stipa*, *Setaria caespitosa*, etc. También umbelíferas, algunas cactáceas y enredaderas. Presenta comunidades serales como Palmares de Yatay frecuentes en Corrientes y Entre Ríos. Generalmente vegetan en suelos arenosos más o menos ácidos, a veces con subsuelos rocosos a poca profundidad. La comunidad vegetal es el palmar, especie *Butia yatay*, arbustos dispersos y el estrato herbáceo es muy rico, predominando las gramíneas. También hay ciperáceas, compuestas y numerosas leguminosas herbáceas que crecen entre los pastos entre las que se encuentra *Desmodium* sp.

Lugar de colecta: Ruta nacional 14, al norte de Concepción del Uruguay, en campo de suelo pedregoso junto a *Desmanthus paspalaceus* (Pensiero *et al.* 6840) y *Bromus auleticus* (Pensiero *et al.* 6842) (Tabla III.1, Fig. III.1).

Población 3. Misiones.

Esta población pertenece al Distrito de los Campos que se extiende por el suroeste de Misiones y nordeste de Corrientes. Los suelos son lateríticos. Las precipitaciones son ligeramente inferiores a los 2.000 mm anuales y con sequía invernal más marcada que el Distrito de las selvas de transición. Las comunidades vegetales presentan un carácter edáfico con un manto a poca profundidad. Este distrito se relaciona con la Provincia fitogeográfica del Cerrado en Brasil. La vegetación predominante es “campos” o sabanas de gramíneas de 1-1,5 m de altura. La comunidad subclimácica ocupa los campos altos y laderas lateríticas, predomina *Arístida jubata*, gramínea cespitosa acompañada por

Paspalum urvillieri, entre otras especies. La ganadería modifica esta comunidad, siendo invadida por muchas otras especies tendiendo a desaparecer *A. jubata*, y predominando *Paspalum notatum* y *Axonopus compressus*.

Lugar de colecta: Ruta nacional 12 entre Candelaria y Santa Ana, en banquina, junto a *Axonopus compressus* (Pensiero *et al.* 6887) (Tabla III.1, Fig. III.1).

Población 4. Formosa.

Ocupa aproximadamente la mitad oriental de Formosa y Chaco, parte norte de Santa Fe y el noroeste de Corrientes. El clima es más húmedo que los otros distritos de la Provincia aumentando la precipitación de oeste a este. La vegetación está constituida por bosques xerófilos mezclados con palmares y sabanas. Puede encontrarse en las comunidades serales de palmar de Caranday con Algarrobo. Esta comunidad vegeta en campos bajos ligeramente alcalinos en la zona este del distrito, la habitan árboles xerófilos donde sobresalen las palmeras. Bajo los árboles existe un estrato arbustivo y un estrato herbáceo ralo. Predomina *Prosopis alba* (Algarrobo blanco) y *Copernicia australis* (Caranday). Entre los arbustos más comunes se encuentra *Acacia bonariensis* (Ñapinday) y en el estrato herbáceo *Bromelia serra*, entre otros.

Lugar de colecta: Ruta nacional 81, camino a Pirané. 20 km al oeste de la ruta nacional 11, camino a Pirané, en banquina, con pelo de agua, junto a *Eleocharis elegans* (Pensiero *et al.* 6906) (Tabla III.1, Fig. III.1).

Población 5. Chaco.

Esta población se presenta en una fitogeografía del Distrito Chaqueño Oriental. La comunidad climácica del distrito es la asociación de quebracho colorado y quebracho blanco creciendo en suelos altos y maduros. Las especies más características, aunque no siempre las más abundantes debido a la explotación selectiva son *Schinopsis balansae* (quebracho colorado) y *Aspidosperma quebracho-blanco* (quebracho blanco). Existen otras especies arbóreas como *Caesalpinea paraguariensis* (Guayacán), Espina corona, Mistol, etc, También numerosos arbustos, especialmente cuando existe ganadería extensiva y forman matorrales impenetrables y un estrato herbáceo donde se destacan las bromeliáceas, gramíneas y ciperáceas.

Lugar de colecta: Ruta nacional 11, 18 km al sur de Resistencia, en banquina (Tabla III.1, Fig. III.1)

Población 6. Tucumán.

La población se encuentra en el Distrito de Selvas de Transición que ocupan llanuras al pié de las montañas y cerros bajos entre los 350-500m snm. Este distrito forma el borde oriental de la provincia de las Yungas. La precipitación suele ser menor que en otros distritos con 700 a 1000 mm anuales. La vegetación está formada por varios estratos, árboles como *Phyllostylon rhamnoides* (palo amarillo) entre muchas otras especies; arbustos como *Pogonopus tubulosus* (quina), hierbas, lianas y epífitas. Este distrito se halla muy alterado por la acción del hombre que va destruyendo paulatinamente la vegetación prístina y suplantándola por cultivos como *Saccharum officinarum* (caña de azúcar) entre otros cultivos.

Lugar de colecta: Ruta provincial 306, cruzando el Río Salí, camino a Lules, en borde del río (Tabla III.1, Fig. III.1).

Población 8. Santa Fe.

Distrito Chaqueño Oriental. La comunidad climática, al igual que toda la Provincia Chaqueña la ganadería y la explotación forestal han modificado la composición de las comunidades vegetales por la tala de árboles o la explotación agrícola. La comunidad climática la conforman *Schinopsis balansae* (quebracho colorado) y *Aspidosperma quebracho-blanco* (quebracho blanco) creciendo en suelos altos y maduros. Otras especies arbóreas son el guayacán (*Caesalpinia paraguariensis*), espina de corona (*Gleditsia amorphoides*), algarrobo blanco (*Prosopis alba*), algarrobo negro (*Prosopis nigra*), etc. También están presente arbustos que son muy abundantes en campos con ganadería extensiva como el vinal (*Prosopis ruscifolia*), garabato negro (*Acacia praecox*) gramíneas como *Leptochloa virgata*, *Melica argyrea* entre otras, y bromeliáceas.

Lugar de colecta: Ruta provincial 100, 1 km de la ruta nacional 11, camino a Villa Guillermina, en banquina, junto a *Desmanthus paspalaceus* (Pensiero *et al.* 6932) y *Themeda quadrivalvis* (Pensiero *et al.* 6934) (Tabla III.1, Fig. III.1).

Población 9. Tucumán.

Esta población se encuentra en el Distrito de Selvas Montanas. Ocupa las laderas orientales de las primeras cadenas de montañas del noroeste de Argentina entre los 550 y 1600 m de altura. Constituye una selva muy densa y casi impenetrable de vegetación cubierta por las nubes durante el verano y principios del otoño. La vegetación presenta varios estratos, el estrato superior especies como *Phoebe porphyria* (laurel),

Blepharocalyx gigantea (horco-molle), etc. Un segundo estrato arbóreo lo forman especies como *Allophyllus edulis* (chal-chal) entre otros. Los arbustos forman un estrato de 2-4 m de altura como *Chasquea lorentziana*. Luego se encuentran las grandes hierbas y una gran variedad de especies herbáceas menores y las que crecen al ras del suelo constituido por fanerógamas rastreras. También abundan las lianas y plantas epífitas.

Lugar de colecta: Horco Molle, en banquina (Tabla III.1, Fig. III.1).

Población 10. Corrientes.

Distrito de los Campos. Se extiende por el sudoeste de Misiones y noreste de Corrientes. La comunidad subclimática es la sabana de *Andropogon lateralis* que vegeta en los bajos de las laderas donde aflora el subsuelo detrítico, forma sabanas en la que predomina *Andropogon lateralis*, otras especies frecuentes son *Axonopus compressus*, *Paspalum notatum*, *Desmodium incanum*, entre otras. La ganadería altera por completo la comunidad y, cuando el campo está muy degradado desaparece *A. lateralis* y se asocian *Axonopus compressus* y *Paspalum notatum*.

Lugar de colecta: Ruta nacional 12, 86 km al este de Corrientes, en banquina (Tabla III.1, Fig. III.1).

III.2.3. Características edafoclimáticas de los lugares de colecta de las poblaciones de *Desmodium incanum*.

Para caracterizar los sitios de colectas de las poblaciones analizadas, se utilizó la información disponible en la base de datos de GeoINTA (<http://geointa.inta.gov.ar>), sistema que permite el acceso en tiempo real a información de suelo, cobertura y perfiles de suelos, y cursos de agua localizados a través de mapas interactivos en distintas capas de datos.

En la Tabla III.3 se muestran las características edafológicas de los sitios de colecta de cada población. En los suelos de Argentina el orden más abundante es el de los Molisoles, en los que tiene lugar la agricultura de cultivos comerciales y la producción intensiva de carne y leche, principalmente en los suelos de la región pampeana. Los Alfisoles localizados en áreas húmedas, subtropicales del noreste del país están en el cuarto lugar en términos de área ocupada, luego de los Entisoles y Aridisoles.

En los sitios de colecta los suelos son variados tienen un espesor entre 25-120 cm con una textura desde arenosa-franca a arcillo-limosa. Algunos suelos presentan como limitante

la susceptibilidad a erosión debido a su ubicación en el relieve y la pendiente del terreno. Otras poblaciones presentan suelos de texturas más finas y relieve plano limitando el drenaje del agua en el perfil. En la población P1 de Entre Ríos los suelos están desarrollados sobre albardones de los arroyos originados de sedimentos fluviales, bien provistos de materia orgánica, poseen mediana fertilidad y la producción es la ganadería extensiva. Esta misma actividad productiva se presenta en la población de Misiones (P3) en bosques nativos, con suelos someros de débil desarrollo genético y presencia de basalto a los 33cm. Los suelos de las poblaciones de Formosa (P4) y Chaco (P5) se presentan en áreas algo elevadas, integradas al paisaje de cañada o sectores mal drenados con horizontes nátricos de alto contenido de arcilla y sodio, y donde se desarrolla la ganadería de cría extensiva. Las poblaciones de Tucumán P6 y P9 presentan suelos profundos, de relieve colinado plano en P6 y ondulado en P9, donde la biota fue modificada por la agricultura. En la población P8 de Santa Fe los suelos son muy productivos que integran complejos por los microrelieves, de alta fertilidad natural, profundos y sin limitaciones naturales. Por último en la población de Corrientes (P10) los suelos se presentan en planos extendidos con un horizonte superficial albico (E) sobre un B argílico fuertemente estructurado. La vegetación fue modificada y las actividades que se desarrollan son agricultura, pasturas cultivadas, forestales, etc (Panigatti, 2010).

Tabla III.3. Características edafológicas de los suelos en los lugares de colecta de las poblaciones de *Desmodium incanum*. Información obtenida de la base de datos de GeoINTA (<http://geointa.inta.gov.ar>).

Características Edafológicas	POBLACIONES							
	P1	P3	P4	P5	P6	P8	P9	P10
Tipo unidad cartográfica	Asociación	Asociación	Asociación	Asociación	Asociación	Asociación	Asociación	Complejo
Orden Suelo Principal	Molisoles	Molisoles	Alfisoles	Alfisoles	Molisoles	Molisoles	Molisoles	Alfisoles
Subgrupo Suelo Principal	Hapludoles fluvéntico	Hapludoles lítico	Natracualfes albico	Natrudalfes típico	Hapludoles entico	Argiudoles acuico	Hapludoles típico	Albacualfes típico
Textura Superficial	Areno franca	Franco areno gravilla	Franco limosa	Franco arcillo limos	Franco arenosa	Franco limosa	Franca	Franca
Textura Subsuperficial	Franco arcillo areno	No determinada	Franco arcillo limos	Franco arcillo limos	Franco areno gravill	Arcillo limosa	Franco arcillosa	Franco arcillo arenoso
Drenaje	Imperfecto	Bien drenado	Pobre	Imperfecto	Moderado	Imperfecto	Bien drenado	Imperfecto drenado
Alcalinidad	No sódico	No sódico	Muy fuerte	Poca	No sódico	No sódico	No sódico	No salino
Posición relieve	Pie de Loma	Loma	Bajo	Media Loma	Sector medio y distal de cono	Lomas altas	Sector medio e inferior de conos	Plano tendido
Limitante Principal	Text. Hor. Subsup. ^a	Prof. efectiva somera ^b	Suscep inund. o aneg. ^c	Alcalino menos 50cm	Drenaje deficiente	Drenaje deficiente	Suscep. eros. hídrica ^d	Drenaje deficiente
Orden Suelo Secundario	Inceptisoles	Roca	Alfisoles	Alfisoles	Molisoles	Molisoles	Molisoles	Alfisoles
Cota snm (m)	14	131	68	54	378	51	710	67

Referencias:

(a) Textura Horizonte Subsuperficial.

(b) Profundidad efectiva somera.

(c) Susceptibilidad a inundación o anegamiento.

(d) Susceptibilidad a erosión hídrica.

Es importante remarcar que *Desmodium incanum* DC se encontró en distintos tipos de suelos los cuales fueron caracterizados químicamente (Tabla III.4) y utilizados para la captura de rizobios noduladores de esta especie.

Tabla III.4 Características químicas de los suelos de origen de las poblaciones de *Desmodium incanum* provenientes de distintas regiones ecológicas de Argentina.

Población	MO %	Nt %	P ppm	S ppm	pH	CE dS/m
P1	3,21	0,223	8	10	7,3	0,229
P3	2,28	0,084	7	10	5,8	0,066
P4	2,68	0,099	8	9	6,4	0,132
P5	2,63	0,131	17	8	6,9	0,217
P6	3,24	0,143	14	12	6,6	0,105
P8	4,90	0,227	22	9	6,2	ND
P9	9,4	0,508	75	ND	6,0	1,4
P10	3,4	0,148	7	ND	5,1	0,9

Referencias: MO% Materia orgánica (Carbono) (Walkey and Black, 1934). Nt Nitrógeno total (Kjeldhal, AOAC,1990) P Fósforo disponible (Bray and Kurtz, 1945). pH (potenciometría MAG, 1982). CE Conductividad eléctrica (conductimetría, MAG, 1982). ND: no determinado

El contenido de materia orgánica está directamente relacionado con el suelo y el clima de cada ambiente, el fósforo disponible presentó valores muy bajos en los suelos de las poblaciones P1, P3, P4 y P10 y los valores de pH fueron variables, cercanos a la neutralidad y con un nivel de acidez moderado en la muestra de la población P3 y más severo en P10. La conductividad eléctrica hallada fue inferior a 2dS/m indicando que los suelos de las poblaciones en estudio no son salinos.

En relación a las características climáticas de los lugares de colecta podemos mencionar que el clima en la provincia de Tucumán donde se colectaron las plantas de las poblaciones P6 y P9, es subtropical serrano debido al relieve en la región de las yungas, y presenta una gran variedad de microclimas. Las lluvias superan los 1.200 mm anuales y la temperatura media anual es de 19 °C a 22°C. En las provincias de Misiones y Corrientes el clima es subtropical sin estación seca y con abundantes precipitaciones llegando a 2.000 mm.año⁻¹ en el caso de la provincia de Misiones. El clima subtropical sin estación seca y con menores precipitaciones corresponde a las provincias de Formosa, Chaco y norte de Santa Fe. Finalmente, donde se encuentra la población P1 (Entre Ríos)

de clima templado, la temperatura media anual es 18,1 °C y las lluvias oscilan entre 900-1.000 mm.año⁻¹.

En el marco de la diversidad de distritos fitogeográficos se escogieron lugares para la recolección de los ejemplares que representan esos diferentes ambientes naturales en los que se encontraron poblaciones silvestres de *Desmodium incanum*. En cada sitio se recolectaron semillas, plantas y suelos. Estas muestras fueron luego utilizadas para establecer la colección de rizobios como se detalla en el capítulo siguiente.

La región relevada abarca aproximadamente 1076 km de longitud y 703 km de ancho. Cada lugar de recolección representa a un ecosistema específico el cual se halla descrito en la Tabla III.1 y III.2 junto con sus coordenadas geográficas.

El análisis de los parámetros fisicoquímicos de los suelos de los diferentes ambientes geográficos mostró variabilidad entre ellos, lo cual hace suponer diversidad en las poblaciones de rizobios que los habitan. Estudios realizados por Lima *et al.* (2009) sobre comunidades nodulantes de leguminosas en suelos tropicales con diferentes usos y su relación con atributos físicos y químicos del suelo, mostraron que la capacidad de intercambio, pH y arcilla fueron los que más influenciaron, y observaron mayor diversidad y nodulación en suelos agrícolas y agroforestales, sugiriendo una alta resiliencia de las comunidades rizobianas a los cambios en una región.

La fertilidad y productividad de los suelos es mantenida por la materia orgánica y actúa directamente como fuente de nutrientes para las plantas e indirectamente en las propiedades físicas y químicas del suelo (Badar *et al.*, 2015). La textura influye en la descomposición de la materia orgánica e indica que la tasa de descomposición y mineralización neta depende de la accesibilidad de la flora microbiana a los sustratos orgánicos (Hassink, 1992) Principalmente las partículas de arcillas ejercen una acción protectora contra la degradación de la materia orgánica a través de la formación de complejos arcillo-húmicos. Los suelos de textura fina, con mayor porcentaje de arcilla, a menudo contienen cantidades más altas de materia orgánica que los suelos arenosos (Mtambanengwe *et al.*, 2004). Los suelos de origen de cada población presentaron diferentes texturas, los molisoles de textura más fina están bien provistos de materia orgánica, con un contenido de nitrógeno orgánico total deficiente en aquellos suelos con valores inferiores al 0,2%. Presentaron diferente composición química (Tabla III.4) y los

valores de pH de las muestras estuvieron en el rango 5,1-7,3 sin embargo, el pH de la mayoría de los suelos se encontró en el rango de pH ligeramente ácido, con lo cual no se esperaría una diferencia poblacional importante debido a esta característica de los suelos e indicarían condiciones favorables para la supervivencia de los rizobios, con una ligera acidez del suelo P3 y mayor en el suelo P10. Sin embargo Brockwell, *et al.* (1991) demostró que el pH puede limitar la presencia de los microorganismos en los suelos y llegar a ser una barrera para la diversidad. Palmer *et al.* (2000) describieron algunos parámetros específicos de los suelos que pueden influenciar la diversidad rizobiana presente. Entre ellos se destacó por un lado el pH y la concentración de los iones Mg^{+2} y Ca^{+2} que influenciaron el funcionamiento celular y por el otro el porcentaje de arcilla que afectó la sobrevivencia de las bacterias en el suelo.

En relación al contenido de fósforo y azufre fue bajo en algunos suelos (<10ppm) lo que podría limitar la nodulación y el proceso simbiótico. Varios autores plantean que las leguminosas restringen la nodulación cuando existe un inadecuado suministro de nutrimentos, especialmente fósforo, limitando el crecimiento de las plantas (Oliveira *et al.*, 1998; Taiwo *et al.* 1999). La salinidad de los suelos (determinada por la conductividad eléctrica) se encontró en rangos bajos no siendo un parámetro limitante que afecte la sobrevivencia y proliferación de los rizobios en el suelo (Singleton *et al.*, 1982).

La comparación de los distintos parámetros analizados de cada suelo muestra la variabilidad de los mismos, lo cual podría correlacionar con la diversidad en las poblaciones de rizobios que los habitan como consecuencia de una adaptación particular a ellos.

La caracterización de los suelos donde se encontró *Desmodium incanum* permitió evidenciar que existen poblaciones presentes en suelos desde arenosos, francos hasta arcillo-limosos. Su amplia distribución geográfica en ambientes de diferentes características edáficas muestra su plasticidad y hace de esta especie una forrajera promisoría para zonas subtropicales del país.

Para dar continuidad al estudio realizado, en el próximo capítulo brindaremos información detallada sobre la obtención de la colección de rizobios noduladores de *Desmodium incanum* que se utilizará en el curso de este trabajo de Tesis para llevar a cabo la caracterización fenotípica (Capítulo IV) y genotípica (Capítulo V) de los mismos, así como el análisis de su capacidad simbiótica (Capítulo VI).

Tesis Doctoral - Toniutti María Antonieta

CAPÍTULO IV

**Aislamiento y análisis de
las características
fenotípicas de rizobios
asociados
simbióticamente a
Desmodium incanum
presentes en suelos de
Argentina**

IV1. ANTECEDENTES GENERALES

Desmodium incanum, y las leguminosas forrajeras nativas en general, presentan un gran potencial productivo para ganado en pastoreo, ya que aportan excelentes fuentes de proteína y minerales. Cuando se introduce una leguminosa o se quiere mejorar la productividad de una pastura natural es importante caracterizar la población de rizobios nativos debido a que tienen buena adaptación al ambiente y son la base para la selección y el mejoramiento de cepas a ser usadas como inoculantes. Un primer paso importante hacia el mejoramiento de la asociación rizobio-*Desmodium* en los suelos locales es sin duda el relevamiento y caracterización de las poblaciones existentes de rizobios naturalizados. De ese modo puede por un lado evaluarse el tipo de germoplasma presente en los suelos y, eventualmente abordar la selección en una etapa posterior de aquellas cepas que resulten más eficientes en su simbiosis con *Desmodium*. En este sentido, no debe descartarse la posibilidad que sobre las poblaciones de rizobios de los suelos locales haya existido una selección positiva en favor de aquellas variantes genéticas más tolerantes y adaptadas en su simbiosis a las condiciones operantes en cada ecosistema. Por ejemplo, la búsqueda, selección e inoculación de cepas de *S. meliloti* más tolerantes a la acidez, ha mostrado ser una estrategia útil para el establecimiento de pasturas de alfalfa en suelos francamente ácidos (Howieson & Ewing 1986).

Las leguminosas presentan diferentes respuestas ante la presencia de distintas cepas de rizobios lo cual puede variar entre géneros, especies e incluso entre cultivares (Date, 1977). Como ya lo mencionamos en la introducción de este trabajo, este autor señala que *Desmodium* es un género de leguminosas que puede ser nodulado por un amplio rango de cepas de rizobios, aunque esta nodulación es a menudo inefectiva. Lamentablemente, las características simbióticas y la diversidad biológica de los rizobios asociados a plantas nativas han sido poco explorada en nuestro país, a pesar de la función agroeconómica y ecológica que presentan en ecosistemas naturales diversos. En este contexto, existe poca información en relación a la nodulación y fijación de nitrógeno de las diversas especies de *Desmodium* en asociación con rizobios nativos.

Es un hecho bien documentado en la literatura que la interacción simbiótica puede verse afectada dependiendo de las condiciones de suelo y clima donde este proceso se desarrolle (Tang *et al.*, 1992). Uno de los aspectos más relevantes del cultivo de leguminosas es la preservación de la fertilidad nitrogenada de los suelos mediante una

simbiosis eficiente con rizobios fijadores de nitrógeno. Para ello se requiere no solo que la planta y el microorganismo sean compatibles sino también que el ambiente sea el apropiado para asegurar la supervivencia de los rizobios y para un eficiente intercambio de señales que precede a la infección. Numerosos factores ambientales pueden afectar la nodulación, fijación de nitrógeno en las leguminosas y la sobrevivencia de los rizobios en el suelo. Probablemente las condiciones ambientales limitantes más relevantes son las temperaturas extremas, estrés por pH, alta salinidad, así como también la disponibilidad de agua, deficiencia de fósforo y otros minerales (Zahran *et al.*, 1999; Streeeter 2003; Jones *et al.*, 2007, Lira *et al.*, 2015). Los bajos niveles de fósforo en el suelo son un obstáculo para el crecimiento y desarrollo de varias especies de leguminosas (Okalevo *et al.*, 2009) ya que los nódulos son los sumideros más importantes de fósforo en comparación con raíces, brotes y hojas de la planta (Ogola *et al.*, 2012). Asimismo, altos niveles de nitrógeno disponible en el suelo pueden suprimir la nodulación. Dentro de estos factores abióticos, las altas temperaturas tienen efecto sobre la estructura del nódulo, función e infección del pelo radicular. El rango de temperatura óptima para los rizobios ha sido descrito entre 25 °C y 31 °C en medios de cultivo, pero rizobios aislados de ambientes de sabanas secos y calientes son capaces de crecer a 40 °C (Zahran, 1999).

Asimismo, la acidez del suelo condiciona a las plantas, las bacterias y el proceso simbiótico. El crecimiento, la supervivencia de los rizobios y su competitividad en la nodulación están muy influenciadas por el pH del suelo (Brockwell *et al.*, 1991). El microsimbionte es usualmente el más sensible al pH, dicha tolerancia puede variar entre cepas dentro de una misma especie, siendo algunos géneros y especies de rizobios más tolerantes a la acidez que otras (Hungria & Vargas, 2000). Varios autores han demostrado que el pH citoplasmático de cepas tolerantes a la acidez se ve menos afectado por la acidez externa y reportaron altos niveles de potasio citoplasmático, diferencias en la composición de lipopolisacáridos y en la exclusión y extrusión de protones en las células bajo estrés ácido (Graham *et al.*, 1994). El pH óptimo para el crecimiento de los rizobios oscila entre 6,0 y 7,0 (Jordan, 1984). Las especies del género *Bradyrhizobium* son generalmente más tolerantes a la acidez que las especies del género *Rhizobium* aunque pocos rizobios son capaces de tolerar y crecer a pH inferiores a 5,0 tales como *R. tropici*, *R. favelukesii* y *R. loti* que son altamente acido- tolerantes (Graham *et al.*, 1994, Torres Tejerizo *et al.*, 2016).

Por otro lado etapas tempranas de la interacción simbiótica leguminosa-rhizobium son más sensibles al estrés osmótico que los mismos rizobios (Zahran, 1991). Estos

microorganismos sometidos a estrés salino pueden producir cambios en su morfología celular y modificar el patrón de polisacáridos extracelulares (EPS) (Vanderlinde *et al.*, 2010). Muchos microorganismos, entre ellos los rizobios, utilizan mecanismos de adaptación osmótica bajo condiciones de estrés salino, como la acumulación de osmolitos la cual ha sido informada en algunas especies (Yadav *et al.*, 2015).

A fin de seleccionar y disponer de cepas competitivas y efectivas en la FBN es importante contar con una amplia variedad de aislamientos obtenidos de diferentes ambientes que nos permitan evaluar sus características con el objetivo final de seleccionar las más promisorias. Por otro lado las poblaciones de rizobios podrían ser muy influenciadas por la procedencia de la planta utilizada para la captura. Liu y colaboradores (2005) sugirieron que para analizar los rizobios nativos de diferentes regiones geográficas es importante hacerlo junto con sus plantas huésped con la finalidad de caracterizar mejor las interacciones entre los rizobios, las leguminosas y los factores geográficos.

Desde un punto de vista formal, para que los rizobios tengan éxito luego de su inoculación en suelos con condiciones adversas, deben ser capaces de mantener sus funciones celulares, sobrevivir/crecer y colonizar en las condiciones desfavorables presentes en el complejo ambiente del suelo y la rizósfera. En general la tolerancia a estreses abióticos resulta de la combinación de una serie muy diversa de características bacterianas. Además, debemos considerar la capacidad que deben tener los rizobios para desempeñar funciones simbióticas y asociarse con la planta huésped, el otro nicho que pueden ocupar en el suelo. Por lo tanto los rizobios, además de ser tolerantes como condición indispensable (mínima), deberán ser activos simbióticamente frente a la planta en las condiciones adversas a las que están sometidos.

El objetivo del presente capítulo fue establecer una colección de rizobios noduladores de *D. incanum* recuperados de suelos con diferentes características edafoclimáticas del centro y norte de la República Argentina.

En este Capítulo se exponen los resultados del aislamiento de rizobios noduladores de *D. incanum* recuperados de localidades del centro y norte de la República Argentina con el propósito de obtener una colección de germoplasma local adaptado a diferentes condiciones agroecológicas del país. Además, se analizan sus características fenotípicas y tolerancia a estreses abióticos en condiciones de laboratorio.

IV.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.2.1. Establecimiento de una colección de rizobios noduladores de *Desmodium incanum* recuperados de suelos argentinos

En total se colectaron cinco plantas con suelo rizosférico de cada población en estudio procedentes de los diferentes ambientes del centro y norte del país (capítulo anterior, Figura III.1).

La nodulación de las plantas fue variable en relación a los suelos de origen de las poblaciones de *D. incanum*, en general entre 5 y 25 nódulos por planta, siendo poca (escasa) en las poblaciones de Entre Ríos (P1), Misiones (P3), Chaco (P5), Santa Fe (P8) y Corrientes (P10) según las categorías de evaluación de la nodulación de plantas individuales de leguminosas forrajeras tropicales (CIAT, 1988). En las poblaciones de Formosa (P4) y Famaillá en Tucumán (P6) la nodulación fue mediana según el mismo sistema de evaluación. En este trabajo mayoritariamente encontramos nódulos que presentaron una coloración grisácea y se hallaban localizados en raíces secundarias, encontrándose también plantas sin nódulos. Estudios realizados por López Sanchez *et al.* (2000) encontraron que la nodulación en *Desmodium scorpiurus* fue escasa en suelos afectados por salinidad. Por otro lado Ngwu (2005) halló que en plantas de *Desmodium ramississimon* el tipo de suelo condicionó la magnitud de la nodulación.

Estudios realizados por Bosman y colaboradores (1990) en leguminosas de pasturas nativas de México, mostraron que plantas de *D. triflorum* y *D. incanum* nodularon profusamente, con más de 100 nódulos por planta, de 1 a 2 mm de diámetro y más del 70 % de color blanco, verde o gris oscuro. Por otro lado, Tang y colaboradores (1990) observaron una escasa nodulación (aproximadamente 12 nódulos por planta) por la acción de cepas nativas noduladoras de *D. ovalifolium* presentes en suelos pardos sin carbonatos de la Estación de Pastos de Camagüey, Cuba. Estos valores resultaron similares a lo encontrado en algunas poblaciones en nuestro estudio. Vasey y colaboradores (1997) observaron en *D. discolor* y *D. intortum* una nodulación abundante, nódulos de tamaño pequeño y forma esférica típica, en un ensayo bajo condiciones controladas donde se evaluó la nodulación potencial de 13 especies de leguminosas arbustivas y arbóreas en Brasil. Recientemente, estudios realizados por Bécquer y colaboradores (2016) en ecosistemas áridos de Cuba, encontraron en plantas de *D. incanum* y *D. triflorum* una

caracterización de la nodulación similar a los hallados en nuestro trabajo en relación al tamaño, abundancia y localización de los nódulos en las plantas.

Alternativamente, con la finalidad de recolectar un mayor número de aislamientos se realizaron ensayos de nodulación en condiciones controladas de laboratorio empleando las muestras de suelo rizosférico de cada población y plantas de *D. incanum* (plantas trampas) a fin de recuperar de los nódulos rizobios capaces de nodular esta leguminosa (Tabla IV.1).

Tabla IV.1. Evaluación de caracteres morfológicos y nodulación de plantas de *Desmodium incanum* cultivadas con sus respectivos suelos de origen en condiciones controladas de laboratorio.

P	Planta trampa Id	Caracteres morfológicos de la planta		Nodulación (número de nódulos/planta)		
		Altura (cm)	Longitud raíz (cm)	RP	RS	Total
P1	6850	14,40 ±2,6	9,67 ±2,07	12 ±8	27 ±16	39 ±22
P3	6897	13,78 ±5,78	7,33 ±1,12	6 ±4	5 ±7	11 ±11
P4	6907	11,45 ±2,84	9,09 ±0,97	5 ±3	8 ±4	13 ±6
P5	6926	9,80 ±2,28	8,20 ±1,10	7 ±3	11 ±11	18 ±14
P6	6989	16,00 ±5,31	7,28 ±1,33	11 ±6	32 ±17	43 ±22
P8	6935	19,47 ±4,12	12,72 ±1,32	8 ±3	52 ±10	60 ±9
P9	6992	15,75 ±1,44	8,00 ±0,63	4 ±0,5	11 ±4	15 ±4,5
P10	6897	14,00 ±2,35	9,50 ±1,05	4 ±2	13 ±8	17 ±8

Referencias:

P: Población, Id: Identificación correspondiente al número de catálogo de colección del Dr. Pensiero (UNL). Condiciones del ensayo: duración: 70 días, Fotoperíodo 16/8 (luz/oscuridad), Temperatura 28°C. Altura de planta y longitud de raíz (cm). RP: Raíz principal RS: Raíz secundaria. Número de repeticiones (n):10.

En estas condiciones la nodulación también fue variable debido, posiblemente, a diferentes características edáficas, contenidos de materia orgánica y/o fósforo en los suelos de origen. Además, los ecotipos de las poblaciones de *D. incanum* en nuestro estudio presentaron distinta capacidad de nodulación. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Crosa y colaboradores (1999) en ecotipos de *D. incanum* nativos de Uruguay, dónde los nódulos presentaron una forma esférica y coloración externa mayoritariamente grisácea, o blanca. En nuestro trabajo ambas estrategias estuvieron

dirigidas a la obtención de rizobios potencialmente adaptados a las condiciones agroecológicas de las diferentes poblaciones estudiadas.

Las cepas aisladas fueron sometidas a diversas pruebas a fin de descartar la presencia de posibles contaminantes y confirmar su capacidad de nodular la planta hospedadora. La colección fue establecida aplicando diferentes criterios (Figura II.2 Cap. II). El primero fue basado en el aspecto que presentaron las colonias en el medio LMA. Las colonias fueron de color blanco, rosa o naranja y además presentaron una mucosidad variable, que podía ser laxa o por el contrario bien consistente. Además, se observó la coloración de Gram negativa y escaso o nulo crecimiento en medio de cultivo PGA. El segundo criterio fue investigar la presencia de genes de la enzima nitrogenasa, esenciales para la fijación de nitrógeno atmosférico, amplificando una región interna del gen *nifH* (Laguerre *et al.*, 2001) muy conservado en todos los organismos que poseen esta enzima, y la presencia del gen *nodC* que interviene en la síntesis del esqueleto carbonado de los factores Nod (Perret *et al.*, 2000). A modo ilustrativo se muestran dichas amplificaciones realizadas empleando ADN molde de los aislamientos de la población 5 y los cebadores que se detallan en la Figura IV.1 y IV.2 El tercer criterio consistió en inocular la leguminosa hospedante de donde se aisló originalmente el microbio y confirmar la presencia de nódulos (Figura IV.3).

Como resultado de este trabajo hemos construido una colección de 143 aislamientos de rizobios noduladores de *D. incanum* la cual fue almacenada y criopreservada (en stocks glicerol a -20°C). Sus características más relevantes (ubicación del suelo, origen de la cepa, características de nodulación, etc) han sido almacenadas para su consulta en una base de datos. Los aislamientos obtenidos en cada población se detallan en la Tabla IV.2.

Los números asignados a los aislamientos hacen referencia al código establecido para cada aislado en el laboratorio de Biología aplicada y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNL.

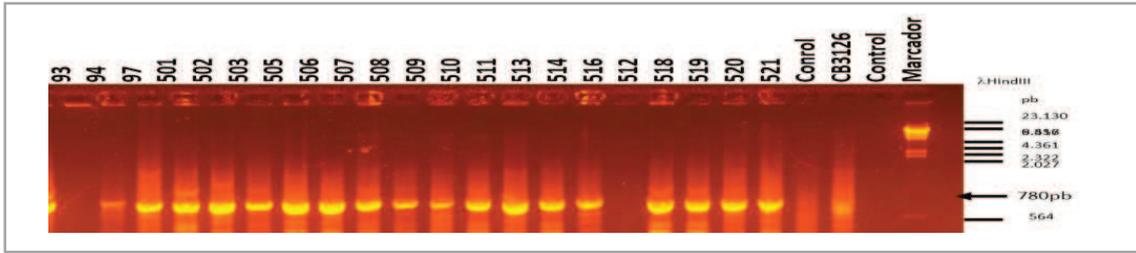


Figura IV.1 Amplificación de una región interna del gen *nifH* por PCR. La amplificación fue realizada empleando ADN molde de los aislamientos de la población 5 (P5) y los cebadores *nifHF* y *nifHR*. CB3126: *Ensifer teranga* CB3126. Las calles control corresponden a la reacción negativa sin ADN molde. La última calle (marcador) corresponde a ADN del fago lambda digerido con *HindIII*.

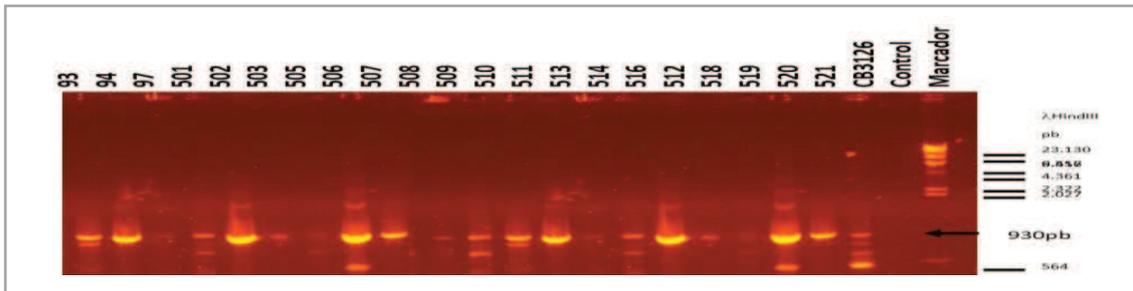


Figura IV.2. Amplificación de una región interna del gen *nodC* por PCR. La amplificación fue realizada empleando ADN molde de los aislamientos de la población 5 (P5) y los cebadores *nodCF* y *noCI*. CB3126: *Ensifer teranga* CB3126. El control corresponde a la reacción negativa sin ADN molde. La última calle corresponde a ADN del fago lambda digerido con *HindIII*.



Figura IV.3. Establecimiento de una colección de rizobios noduladores de *D. incanum* (DI). El tercer criterio consistió en inocular la leguminosa hospedante de donde se aisló originalmente el microbio y confirmar la presencia de nódulos. Se muestra un ejemplar de la población 5.

Tabla IV.2. Colección de aislamientos de rizobios provenientes de poblaciones de *Desmodium incanum* de Argentina.

Región NEA					Región NOA		
Provincias – Departamentos							
Entre Ríos Uruguay (P1)	Misiones Candelaria (P3)	Formosa Formosa (P4)	Chaco San Fernando (P5)	Corrientes Iratí (P10)	Santa Fe Gral. Obligado (P8)	Tucumán Famaillá (P6)	Tucumán Yerba Buena (P9)
AISLAMIENTOS							
n=7	n=18	n=15	n=23	n=22	n=23	n=20	n=15
P1 01	P3 93	P4 60	P5 94	P10 74	P8 800	P6 69	P9 118
P1 02	P3 119	P4 63	P5 97	P10 85	P8 801	P6 70	P9 903
P1 75	P3 300	P4 401	P5 500	P10 101	P8 802	P6 601	P9 904
P1 77	P3 301	P4 402	P5 501	P10 102	P8 803	P6 602	P9 905
P1 79	P3 302	P4 403	P5 502	P10 103	P8 804	P6 604	P9 906
P1 81	P3 303	P4 405	P5 503	P10 104	P8 805	P6 605	P9 907
P1 82	P3 305	P4 406	P5 505	P10 105	P8 806	P6 606	P9 908
	P3 306	P4 413	P5 506	P10 106	P8 807	P6 608	P9 910
	P3 307	P4 415	P5 507	P10 110	P8 808	P6 609	P9 911
	P3 308	P4 416	P5 508	P10 111	P8809	P6 610	P9 913
	P3 309	P4 417	P5 509	P10 113	P8 810	P6 611	P9 914
	P3 310	P4 418	P5 510	P10 114	P8 811	P6 612	P9 915
	P3 314	P4419	P5 511	P10 115	P8 812	P6 614	P9 917
	P3 315	P4 421	P5 513	P10 116	P8 814	P6 615	P9 918
	P3 316	P4 423	P5 514	P10 117	P8 815	P6 617	P9 919
	P3 317		P5 515	P10 120	P8 816	P6 618	
	P3 318		P5 516	P10 121	P8 820	P6 619	
	P3 319		P5 517	P10 122	P8 821	P6 620	
			P5 518	P10 123	P8 822	P6 621	
			P5 519	P10 129	P8 823	P6 622	
			P5 520	P10 130	P8 825		
			P5 521	P10 131	P8 826		
			P5 522		P8 828		

Referencias:

n: número de aislamientos. P: Población

IV.2.2. Caracterización morfológica y fenotípica de la colección de rizobios noduladores de *Desmodium incanum*

La caracterización de los rizobios se basa en caracteres fenotípicos y genotípicos. De este modo, de acuerdo a Jordan (Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, 1984), los rizobios pueden ser descritos de acuerdo a su crecimiento en medios de cultivo sólidos o líquidos. El tamaño, color, textura de sus colonias así como también la capacidad de modificar el pH del medio, son características estables que pueden utilizarse para la caracterización fenotípica de los rizobios.

Para describir los aislamientos de rizobios noduladores de *D. incanum* realizamos una evaluación de distintos aspectos fenotípicos y fisiológicos, a fin de obtener una primera aproximación de la diversidad de la colección. Mediante la tinción diferencial de Gram, se observó al microscopio óptico la morfología celular. Los aislamientos de la colección presentaron forma de bacilos Gram negativos, pequeños, no esporulados, que correspondió a la descrita para las bacterias que nodulan leguminosas en el Phylum B12 Proteobacteria (Garrity & Holt, 2001). Teniendo en cuenta las características macroscópicas y microscópicas la mayoría de los rizobios aislados podrían corresponder al género *Bradyrhizobium* por ser bacilos Gram negativos pequeños de crecimiento lento. La mayoría de las colonias observadas presentó tamaños de aprox. 1 mm (a los 10 días) y formas circulares, convexas o puntiformes y con bordes regulares. Un escaso número de aislamientos podrían pertenecer al género *Rhizobium* cuyas características son: bacilos Gram negativos que forman colonias de color crema o blancuzca, de forma circular, con bordes regulares, de 2 a 4 mm, abundante goma y poseen un crecimiento rápido. En la Figura IV.4 se observan colonias representativas de la colección según su tamaño.

El medio de cultivo LMA con rojo congo es uno de los más utilizados porque permite diferenciar a los rizobios en base a la baja o nula capacidad de absorber el colorante. Dentro de esta característica encontramos distintos grados de coloración, blancas, rosadas, opacas, translúcidas y en algunos casos más naranjas. La Tabla IV.3 nos muestra la distribución del tipo de texturas y coloración de nuestra colección. Si bien es clara la diversidad, la mayoría de las cepas de las poblaciones de Formosa (P4), Santa Fe (P8) y Tucumán (P9) se caracterizaron por presentar escasa consistencia mucilaginosa que indica escasa producción de exopolisacáridos (EPS), mientras que las otras 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.

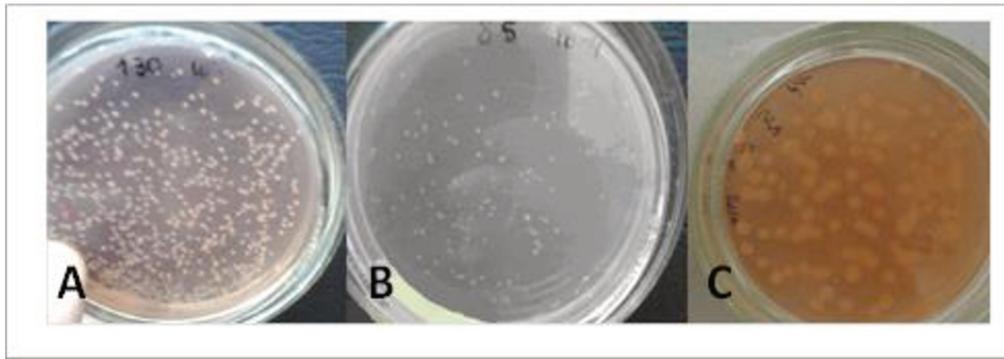


Figura IV.4. Morfología macroscópica de colonias representativas de la colección de rizobios noduladores de *Desmodium incanum*. Crecimiento en medio LMA a 28°C. Observada a los 10 días de la siembra. A: colonias de crecimiento lento (P10 130). B: colonias de crecimiento muy lento (P10 85). C: colonias de crecimiento rápido (P10 117).

Los rizobios además pueden ser clasificados en tres tipos de acuerdo a la modificación del pH del medio de cultivo: ciertas cepas alcalinizan el medio, otras lo acidifican mientras que algunas no generan cambios en el pH (Date, 1982). Estas variaciones de pH se generan por la utilización diferencial de azúcares que conllevan a que las cepas secreten ácidos orgánicos o compuestos nitrogenados en forma de cationes. Para poner en manifiesto la capacidad de las cepas de la colección para modificar el pH del medio incorporamos al caldo CLM el indicador azul de bromotimol (ver sección 2.2 del Capítulo II). Estas modificaciones del pH del medio se relacionan con la velocidad de crecimiento, las bacterias del género *Rhizobium* acidifican el medio mientras que los *Bradryrhizobium* en general lo alcalinizan. Mediante estas observaciones hemos dividido a los aislamientos de crecimiento lento en dos grupos, en uno de ellos la aparición de las colonias se evidenciaba a los 5-6 días (aislamientos de crecimiento lento) y en el otro a los 7-10 días (los de crecimiento muy lento). Cabe destacar que dentro de este grupo hubo una gran cantidad de aislamientos que no modificaron el color del medio mientras que en los otros casos el medio viró hacia el azul. Por otro lado fueron considerados como posibles *Rhizobium* aquellos aislamientos en que las colonias fueron visibles a los 2-3 días y el medio viró al amarillo (Tabla IV.3).

Tabla IV.3. Características morfológicas macroscópicas de los rizobios noduladores de *Desmodium incanum* aislados en este trabajo de tesis.

Población	Aspecto de las colonias en LMA con rojo congo			CLM+AB		
	Blancas- rosadas poco gomosas, translúcidas	Blancas- Rosadas gomosas	Blancas- rosadas muy gomosas	Azul	Verde	Amarillo
P1	0	62	38	16	55	29
P3	33	67	0	78	22	0
P4	80	7	13	14	73	13
P5	30	57	13	74	26	0
P6	40	50	10	25	73	0
P8	82	18	0	53	47	0
P9	71	29	0	36	64	0
P10	10	80	10	29	48	23

Referencias:

Los valores numéricos indican los porcentajes de aislamientos por población. CLM+AB: producción de acidez o alcalinidad en medio Caldo Levadura Manitol (CLM) y Azul de Bromotimol (AB).

Tabla IV.4. Características morfológicas macroscópicas de las cepas de referencia utilizadas.

Cepas de referencia	Aspecto de las colonias en medio LMA con rojo congo			CLM+AB	
	Blancas- rosadas poco gomosas translúcidas	Blancas- rosadas gomosas	Blancas- rosadas muy gomosas	Azul	Amarillo
<i>Rhizobium hainanense</i> CCBAU57015 ^T	-	-	+	-	+
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T	-	+	-	+	-
<i>Bradyrhizobium elkani</i> USDA 76 ^T	+	-	-	+	-
<i>Bradyrhizobium</i> <i>liaoningense</i> U 3622 ^T	+	-	-	+	-

Referencias:

Cepas de referencia analizadas. (-) no corresponde, (+) corresponde. CLM+AB: producción de acidez ó alcalinidad en medio Caldo Levadura Manitol (CLM) con azul de bromotimol.

En paralelo y como cepas de referencia se evaluó el fenotipo de cepas tipo de *B. yuanmingense*, *B. elkani*, *B. liaoningense* y *R. hainanense* (ver Tabla IV.4). Estas cepas fueron cedidas por Gu y colaboradores (2007), quienes han encontrado estos géneros y especies entre los microsimbiontes aislados de varias especies de *Desmodium* que crecen en regiones templadas y subtropicales en China.

IV.2.3. Caracterización de la tolerancia a factores abióticos de la colección de rizobios noduladores de *Desmodium incanum*

Con el propósito de investigar el efecto de factores abióticos de estrés y el grado de diversidad entre los aislamientos de cada uno de los grupos de rizobios definidos, hemos realizado una caracterización fenotípica de los mismos empleando ensayos y metodologías convencionales para el análisis de rizobios. Si bien el suelo puede ofrecer micro-ambientes dentro de los cuales las condiciones del entorno que las bacterias perciben pueden ser muy distintas a las que corresponden a la fase líquida, toda cepa que resulte más tolerante a distintos estreses abióticos en condiciones de laboratorio será seguramente más tolerante en condiciones reales de suelo. En particular, con el fin de caracterizar a los rizobios locales en relación a su habilidad para tolerar diferentes condiciones de estrés, se cultivaron las bacterias en medio LMA con rojo Congo los cuales fueron acondicionados para las diferentes pruebas.

Se evaluó la habilidad de los aislamientos para crecer bajo distintas condiciones de temperatura (28 °C, 35 °C, 40 °C y 45 °C), capacidad para crecer bajo distintos niveles de pH (4.0, 5.0, 6.8, 8.0, 9.0 y 10.0) y diferentes concentraciones de NaCl (0,5; 1; 2 y 3 %). En la Tabla IV.5 se presenta el análisis del crecimiento de los aislamientos frente a diferentes factores abióticos para las cepas de referencia utilizadas y en la Tabla IV.6 se observan los resultados obtenidos para cada población en estudio bajo diferentes condiciones de estreses abióticos.

La tolerancia al estrés abiótico de la colección de los aislamientos de *D. incanum* se expresó a través del análisis de Componentes Principales (ACP), la Figura IV.6 muestra que los aislamientos se distribuyen en las cuatro regiones del espacio bidimensional del componente 1 y 2, estos dos componentes representan el 53 % de la variación fenotípica observada, influenciados principalmente por el pH y la concentración de NaCl.

La contribución de cada variable sobre las tres primeras componentes y la proporción de la variación explicada en cada eje se muestran en la tabla IV.8. Los componentes 2 y 3

que representan en conjunto el 26 % de la variación fenotípica, se encontró que eran fuertemente influenciados por pH extremos y temperaturas elevadas (Fig. IV.7)

Tabla IV.5. Evaluación de la tolerancia a factores abióticos de las cepas de referencia utilizadas en este estudio.

Condición	Temperatura (°C)			pH						NaCl (% P/V)			
	28	35	40	4	5	6,8	8	9	10	0,0 1	0,5	1	2
<i>Rhizobium hainanense</i> CCBAU57015 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Bradyrhizobium elkani</i> USDA 76 ^T	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i> 3622 ^T	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-

Referencias:

Cepas de referencia analizadas, (-) sin desarrollo, (+) crecimiento normal. Las columnas coloreadas muestran las condiciones óptimas de crecimiento para los rizobios.

Tabla IV.6. Evaluación de la tolerancia a factores abióticos de los aislamientos de *D. incanum* provenientes de distintas poblaciones del centro-norte de Argentina.

P	Temperatura (°C)					pH					NaCl (% P/V)				
	28	35	40	4	5	6,8	8	9	10	0,01	0,5	1	2	3	
P1	100	100	0	0	71	100	100	57	0	100	43	0	0	0	
P3	100	95	50	0	100	100	100	83	22	100	22	17	0	0	
P4	100	87	47	0	100	100	100	27	20	100	13	7	0	0	
P5	100	91	13	0	100	100	91	30	17	100	17	13	9	0	
P6	100	100	70	0	100	100	85	50	25	100	25	5	0	0	
P8	100	100	4	9	100	100	83	9	4	100	13	4	0	0	
P9	100	100	53	0	100	100	60	27	7	100	27	0	0	0	
P10	100	100	23	64	100	100	82	41	0	100	45	32	18	0	

Referencias:

P: Población. Los valores numéricos indican los porcentajes de aislamientos por población capaces de crecer en cada condición ensayada. Las columnas coloreadas muestran las condiciones óptimas de crecimiento para los rizobios.

Tabla IV.7. Evaluación del crecimiento de rizobios noduladores de *D. incanum*, provenientes de distintas poblaciones del centro-norte de Argentina, bajo las condiciones detalladas y en medio YEM agarizado.

Población	ID	Temperatura				pH						NaCl (% P/V)				
		28°	35°	40°	45°	4	5	6,8	8	9	10	0,01	0,5	1	2	3
P1	1	3	3	0	0	0	2	3	2	0	0	3	1	0	0	0
	2	3	3	2	0	0	3	3	2	2	1	3	2	1	1	0
	75	3	3	0	0	0	3	3	2	1	0	3	0	0	0	0
	77	3	3	0	0	0	3	3	3	1	0	3	1	0	0	0
	79	3	3	1	0	0	1	3	2	2	1	3	2	1	1	0
	81	3	3	0	0	0	2	3	3	2	1	3	2	1	0	0
	82	3	3	0	0	0	0	3	3	3	0	3	1	0	0	0
	93	3	3	0	0	0	3	3	2	1	0	3	0	0	0	0
P3	119	3	1	0	0	0	2	3	3	3	2	3	1	0	0	0
	300	3	3	0	0	0	3	3	3	1	1	3	0	0	0	0
	301	3	3	0	0	0	3	3	2	2	2	3	2	1	0	0
	302	3	3	2	0	0	3	3	3	2	0	3	2	2	1	0
	303	3	3	3	1	0	2	3	2	2	0	3	0	0	0	0
	305	3	3	3	1	0	3	3	3	3	1	3	2	2	1	0
	306	3	2	2	0	0	3	3	2	2	2	3	0	0	0	0
	307	3	3	1	0	0	2	3	3	2	0	3	0	0	0	0
	308	3	3	3	1	0	3	3	3	2	0	3	0	0	0	0
	309	3	3	2	0	0	3	3	3	2	0	3	1	0	0	0
	310	3	3	2	0	0	2	3	2	2	0	3	0	0	0	0
	314	3	3	0	0	0	3	3	2	1	1	3	0	0	0	0
	315	3	3	0	0	0	3	3	3	2	2	3	0	0	0	0
	316	3	3	1	0	0	2	3	3	3	1	3	3	2	1	0
	317	3	3	0	0	0	2	3	3	2	0	3	0	0	0	0
	318	3	3	2	0	0	2	3	3	2	0	3	0	0	0	0
	319	3	3	3	1	0	2	3	3	3	0	3	1	0	0	0
	P4	60	3	3	3	1	0	3	3	3	3	2	3	2	2	1
63		3	2	0	0	0	3	3	3	2	0	3	2	0	0	0
401		3	3	2	0	0	3	3	2	1	0	3	0	0	0	0
402		3	3	1	0	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
403		3	1	0	0	0	3	3	3	1	0	3	0	0	0	0
405		3	3	1	0	0	3	3	3	1	0	3	0	0	0	0
406		3	3	0	0	0	2	3	3	2	2	3	0	0	0	0
413		3	3	2	0	0	3	3	3	3	1	3	1	1	0	0
415		3	1	0	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0
416		3	3	3	1	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
417		3	3	3	1	0	2	3	2	1	0	3	0	0	0	0
418		3	3	3	1	0	2	3	2	2	2	3	0	0	0	0
419		3	3	3	1	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0
421		3	2	1	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0
423		3	2	1	0	0	3	3	3	1	0	3	0	0	0	0

Continuación Tabla IV.7

Población	ID	Temperatura (°C)				pH						NaCl (% P/V)				
		28°	35°	40°	45°	4	5	6,8	8	9	10	0,0 1	0,5	1	2	3
P5	94	3	3	0	0	0	3	3	3	2	2	3	2	2	2	1
	97	3	2	2	0	0	2	3	3	2	2	3	3	2	2	0
	500	3	3	0	0	0	2	3	3	1	0	3	1	0	0	0
	501	3	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	1	0	0	0
	502	3	3	0	0	0	3	3	3	1	0	3	0	0	0	0
	503	3	3	0	0	0	3	3	1	0	0	3	0	0	0	0
	505	3	3	1	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0
	506	3	3	0	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0
	507	3	3	0	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0
	508	3	3	1	0	0	3	3	3	1	0	3	0	0	0	0
	509	3	3	1	0	1	3	3	3	1	0	3	0	0	0	0
	510	3	3	1	0	0	2	3	3	3	3	3	2	2	0	0
	511	3	3	1	0	0	2	3	3	1	0	3	0	0	0	0
	513	3	1	0	0	0	2	3	3	2	1	3	0	0	0	0
	514	3	3	2	0	0	2	3	3	1	0	3	0	0	0	0
	515	3	3	0	0	0	3	3	1	1	1	3	1	0	0	0
	516	3	3	0	0	0	2	3	3	0	0	3	0	0	0	0
	517	3	3	0	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0
	518	3	2	0	0	0	3	3	3	1	0	3	1	0	0	0
	519	3	3	2	0	1	2	3	2	2	0	3	0	0	0	0
520	3	3	0	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0	
521	3	3	2	0	0	2	3	3	0	0	3	0	0	0	0	
522	3	2	0	0	0	2	3	3	3	0	3	2	0	0	0	
P6	69	3	3	3	1	0	3	3	3	3	3	3	1	0	0	
	70	3	3	2	1	0	3	3	3	3	2	3	2	1	1	0
	601	3	3	0	0	0	3	3	3	3	0	3	0	0	0	0
	602	3	2	1	1	1	3	3	1	1	0	3	1	0	0	0
	604	3	3	3	1	0	2	3	1	1	0	3	1	0	0	0
	605	3	2	0	0	0	2	3	3	3	3	3	0	0	0	0
	606	3	3	2	0	0	3	3	3	2	0	3	0	0	0	0
	608	3	3	2	0	0	3	3	3	3	0	3	0	0	0	0
	609	3	3	0	0	0	2	3	0	0	0	3	0	0	0	0
	610	3	3	2	0	0	3	3	2	1	0	3	0	0	0	0
	611	3	3	0	0	0	3	3	2	0	0	3	2	1	0	0
	612	3	3	3	1	0	2	3	2	0	0	3	0	0	0	0
	614	3	3	3	1	0	2	3	2	1	1	3	0	0	0	0
	615	3	3	2	0	0	3	3	2	1	1	3	1	0	0	0
	617	3	3	2	0	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
	618	3	3	3	1	0	3	3	3	3	1	3	3	3	3	0
	619	3	3	2	0	1	2	3	2	0	0	3	0	0	0	0
	620	3	3	3	1	1	3	3	2	2	0	3	3	1	0	0
	621	3	3	3	1	0	3	3	3	2	2	3	0	0	0	0
	622	3	2	1	0	0	2	3	2	2	2	3	1	1	0	0

Continuación Tabla IV. 7

Población	ID	Temperatura (°C)				pH						NaCl (% P/V)				
		28°	35°	40°	45°	4	5	6,8	8	9	10	0,01	0,5	1	2	3
P8	800	3	3	0	0	3	3	3	3	1	0	3	1	0	0	0
	801	3	3	0	0	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
	802	3	3	0	0	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
	803	3	3	0	0	0	2	3	0	0	0	3	0	0	0	0
	804	3	3	0	0	0	3	3	0	0	0	3	0	0	0	0
	805	3	3	0	0	0	3	3	3	3	3	3	2	2	0	0
	806	3	3	0	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0
	807	3	3	3	1	3	3	3	3	2	1	3	2	1	0	0
	808	3	3	0	0	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
	809	3	3	0	0	1	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0
	810	3	3	1	0	1	2	3	3	1	0	3	2	1	0	0
	811	3	3	0	0	0	2	3	2	0	0	3	0	0	0	0
	812	3	3	0	0	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
	814	3	3	0	0	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
	815	3	3	0	0	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
	816	3	3	0	0	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
	820	3	3	0	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0
	821	3	3	0	0	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
	822	3	3	0	0	0	2	3	1	0	0	3	0	0	0	0
823	3	3	0	0	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0	
825	3	3	0	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0	
826	3	3	0	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0	
828	3	3	0	0	0	2	3	0	0	0	3	0	0	0	0	
P9	118	3	3	2	0	1	3	3	1	1	0	3	0	0	0	0
	903	3	2	2	0	1	3	3	3	2	0	3	2	0	0	0
	904	3	3	2	0	1	3	3	1	1	0	3	0	0	0	0
	905	3	3	2	0	1	3	3	1	1	0	3	0	0	0	0
	906	3	3	2	0	1	3	3	1	1	0	3	0	0	0	0
	907	3	3	1	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0
	908	3	3	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	1	0	0
	910	3	2	2	0	0	2	3	3	0	0	3	1	0	0	0
	911	3	3	1	0	1	3	3	3	2	0	3	0	0	0	0
	913	3	3	0	0	0	3	3	1	0	0	3	0	0	0	0
	914	3	3	2	0	0	3	3	3	2	0	3	1	0	0	0
	915	3	3	2	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0
	917	3	3	0	0	0	3	3	3	0	0	3	2	0	0	0
	918	3	3	1	0	0	3	3	2	0	0	3	2	0	0	0
	919	3	3	1	0	0	3	3	1	1	0	3	0	0	0	0

Continuación Tabla IV. 7

Población	ID	Temperatura (°C)				pH					NaCl (% P/V)					
		28°	35°	40°	45°	4	5	6,8	8	9	10	0,01	0,5	1	2	3
P10	74	3	3	2	0	1	3	3	3	3	1	3	3	3	1	0
	85	3	3	0	0	1	3	3	2	1	0	3	2	1	0	0
	101	3	3	1	0	0	2	3	3	1	0	3	3	2	2	0
	102	3	3	0	0	0	3	3	2	2	0	3	1	1	0	0
	103	3	3	0	0	0	3	3	3	0	0	3	1	0	0	0
	104	3	2	0	0	3	3	3	3	2	0	3	2	2	1	0
	105	3	3	2	0	3	3	3	2	1	0	3	1	1	1	0
	106	3	2	0	0	3	3	3	1	0	0	3	1	0	0	0
	110	3	2	0	0	3	3	3	2	0	0	3	1	0	0	0
	111	3	3	0	0	0	3	3	2	1	0	3	1	0	0	0
	113	3	2	2	0	0	3	3	2	1	0	3	2	0	0	0
	114	3	2	0	0	3	3	3	3	2	0	3	1	1	1	0
	115	3	2	2	0	3	3	3	3	3	1	3	3	2	2	1
	116	3	3	0	0	3	3	3	3	3	1	3	3	2	2	0
	117	3	2	1	0	3	3	3	3	3	1	3	3	3	2	0
	120	3	2	0	0	0	3	3	1	1	0	3	1	0	0	0
	121	3	2	0	0	3	3	3	3	1	0	3	1	0	0	0
122	3	3	1	0	3	3	3	1	1	0	3	1	0	0	0	
123	3	3	0	0	3	3	3	1	1	0	3	2	2	2	0	
129	3	2	0	0	3	3	3	3	1	0	3	1	0	0	0	
130	3	2	2	0	3	3	3	3	2	1	3	1	0	0	0	
131	3	2	0	0	3	3	3	3	3	1	3	2	1	1	0	
CR	1	3	2	0	0	0	2	3	3	0	0	3	0	0	0	0
	2	3	3	0	0	0	2	3	3	1	0	3	2	0	0	0
	3	3	3	0	0	0	2	3	1	0	0	3	1	0	0	0
	4	3	2	0	0	1	3	3	3	2	2	3	3	2	1	0

Referencias:

P: Población. .ID: identificación del aislamiento. Los valores numéricos indican el grado de crecimiento de los aislamientos bajo la condición investigada en una escala 3 a 0 (3 = crecimiento completo, 0 = ausencia de crecimiento). CR: Cepas de referencia, los números corresponden a 1) *B. yuanmingense* CCBAU 10071^T; 2) *B. elkani* USDA 76^T, 3) *B. liaoningense* 3622^T, y 4) *R. hainanense* CCBAU57015^T.

La mayoría de las poblaciones mostró un bajo porcentaje de aislamientos tolerantes a altas concentraciones salinas y ningún aislamiento de la colección fue capaz de crecer en presencia de 3 % p/v NaCl. Graham (1992) indicó que los microsimbiontes tolerantes a alta concentración salina representan un porcentaje pequeño de la mayoría de las colecciones de rizobios. Por otro lado, los rizobios noduladores de *D. imcanum* presentaron una gran capacidad de adaptación al crecimiento en medio nutritivo con niveles de pH extremos y una alta capacidad de tolerar temperaturas medias y altas.

Con el fin de analizar con detalle la diversidad fenotípica de los rizobios noduladores de *D. incanum* y determinar los factores asociados a esa diversidad, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) incluyendo los 143 aislamientos de la colección y todas las variables analizadas (como ya hemos mencionado se utilizó una escala numérica desde grado 0 a grado 3). El objetivo del análisis fue obtener un número reducido de combinaciones lineales de los estreses abióticos (variables analizadas) que expresaran la mayor variabilidad y diversidad biológica posible.

Tabla IV.8. Contribución de cada variable y proporción de la variación total explicada para los tres primeros ejes del PCA. Los valores resaltados en negrita indican alta contribución al componente.

VARIABLE	CP1	CP2	CP3
35 °C	0,08	-0,12	0,74
40 °C	0,14	0,28	0,72
pH 4	0,15	-0,45	0,02
pH 5	0,00	0,00	0,00
pH 8	0,12	0,46	-0,14
pH 9	0,42	0,38	0,06
pH 10	0,28	0,44	-0,17
0,5% P/V NaCl	0,47	-0,13	-0,09
1% P/V NaCl	0,51	-0,22	-0,08
2% P/V NaCl	0,45	-0,28	-0,06
3% P/V NaCl	0,00	0,00	0,00
% de variación	28	14,9	11,1

En las Figuras IV.5 y IV.6 se presenta la separación de los aislamientos noduladores de *D. imcanum* mediante un análisis de componentes principales de sus diferentes características de crecimiento frente a estreses abióticos.

El PCA realizado a partir de los resultados detallados en la Tabla IV.7 puso en evidencia que estos tres componentes explican un 65 % de la variación fenotípica total observada.

La distribución de los rizobios en el espacio de los componentes 1 y 2 (Figura IV.5), representa más del 52 % de la variación total que existe, y permitió separar a los diferentes aislamientos en regiones donde se manifiestan las tolerancias a los factores estudiados: izquierda arriba tolerancia a la acidez y a altas concentraciones salinas, izquierda centro viraje del medio a la alcalinidad y derecha arriba tolerancia a la alcalinidad y a altas temperaturas.

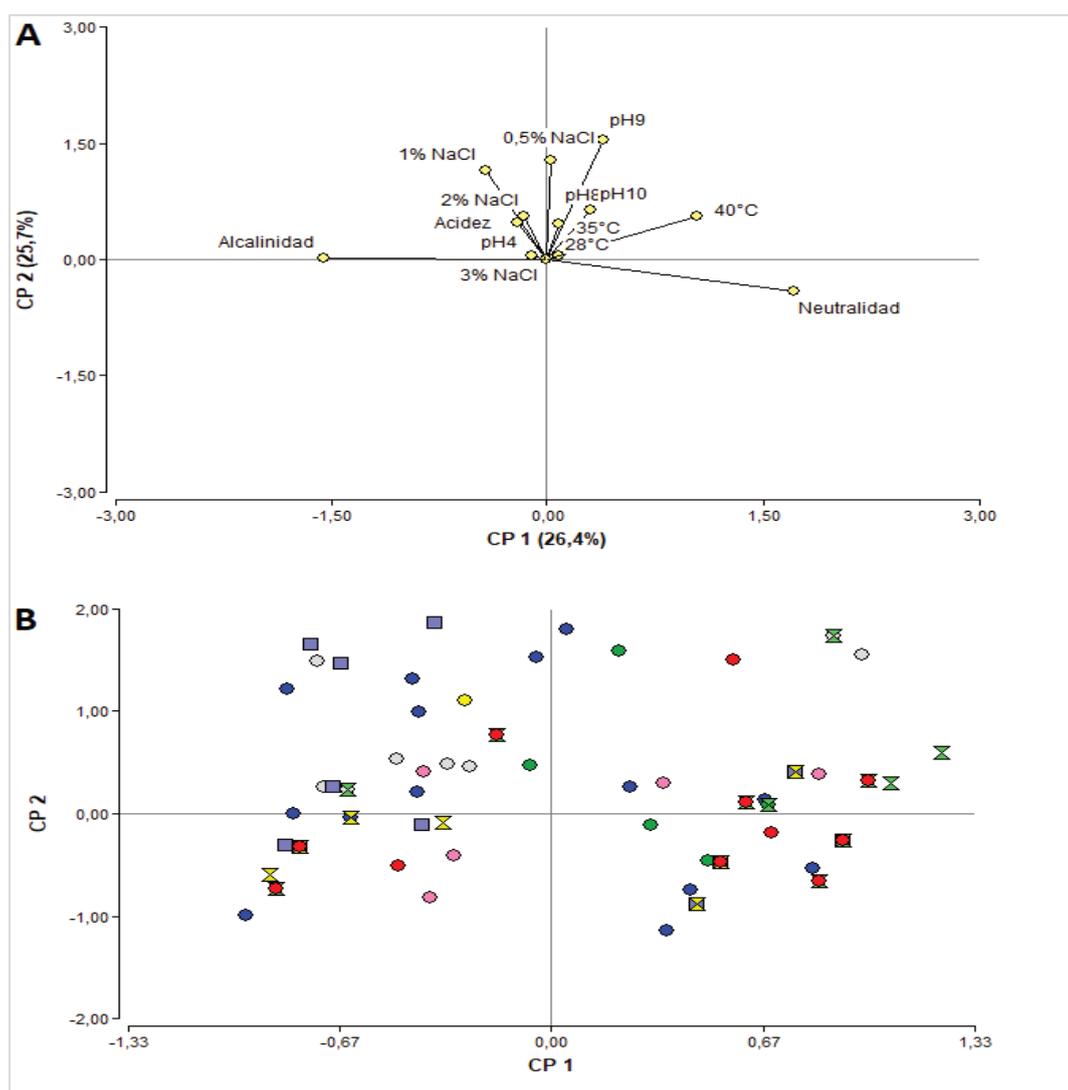


Figura IV.5. Análisis de Componentes Principales 1 y 2. **A)** Gráfico vectorial de correlación obtenido a entre las variables a estreses abióticos analizadas (se muestran en la Tabla IV.7) y los componentes principales (CP) de variación 1 y 2. Los valores porcentuales en el rótulo de cada eje del Componente 1 y 2 indican la proporción de la variación total. **B)** Se observan los aislamientos de la colección. Cepas de referencias: círculo amarillo, P1: círculo rosado, P3: círculo gris, P4: círculo verde, P5: cuadrado celeste, P6: reloj verde, P8: reloj amarillo, P9: círculo rojo, P10: círculo azul.

En un análisis similar, en la Figura IV.6 se muestra la distribución de los rizobios en el espacio de los componentes 2 y 3, que representó más del 38 % de la variación total que existe y permitió separar a los diferentes aislamientos en regiones donde se manifiestan las tolerancias a los factores estudiados: izquierda abajo sin alteración del pH del medio, derecha abajo viraje del pH del medio a la acidez, tolerancia a altas concentraciones salinas y pH ácido, derecha arriba tolerancia a la alcalinidad y altas temperaturas.

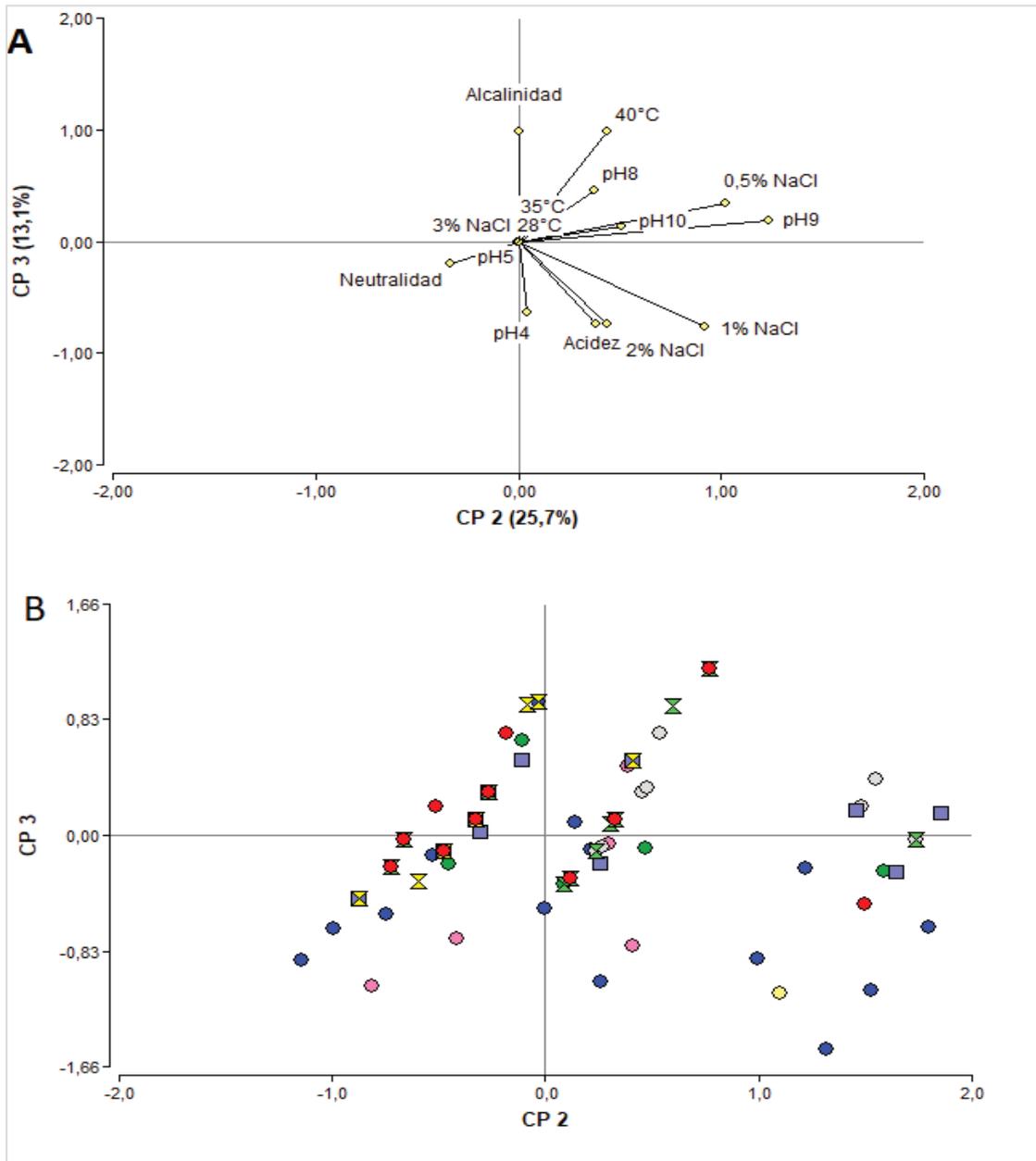


Figura IV.6. Gráfico biplot a partir del Análisis de Componentes Principales 2 y 3 (PCA). **A)** Los valores porcentuales en el rótulo de cada eje del Componente 2 y 3 indican la proporción de la variación total. **B)** Se observan los aislamientos de la colección. Cepas de referencias: círculo amarillo, P1: círculo rosado, P3: círculo gris, P4: círculo verde, P5: cuadrado celeste, P6: reloj verde, P8: reloj amarillo, P9: círculo rojo, P10: círculo azul.

Los resultados obtenidos indican que la colección de rizobios noduladores de *D. incanum*, incluye aislamientos con diferentes grados de tolerancia a estrés abióticos, los cuales constituirán un conjunto de candidatos a ser evaluados en sus propiedades simbióticas.

Hemos establecido una colección de aislamientos de *D. incanum*, de los cuales el 93% presentaron crecimiento lento y muy lento. Estas colonias exhibieron características morfológicas típicas de la familia *Bradyrhizobiaceae*, Gram negativas y con escaso o nulo crecimiento en PGA (Vincent, 1970; Somesagarán & Hoben, 1994). Presentaron producción ácido-álcali característica del género *Bradyrhizobium* (Graham *et al.*, 1994). Particularmente las poblaciones P3 (Misiones), P5 (Chaco) y P8 (Santa Fe) fueron las que mostraron mayor cantidad de aislamientos con producción marcada de alcalinidad. Todas las poblaciones presentaron cepas donde no hubo cambio del color del caldo, destacándose las poblaciones P4, P6 y P9 entre 64 % y 73 % de las cepas en esta categoría (Mpeperekí *et al.*, 1997). Los restantes aislamientos locales fueron clasificados de crecimiento rápido con características fenotípicas del género *Rhizobium* (Tabla IV.3). Representaron el 7% de la colección y correspondieron a la población P1 (Entre Ríos) las cepas P1 75, P1 77 y P1 79, en la población P4 (Formosa) P4 60 y P4 63 y en P10 (Corrientes) los aislamientos P10 74, P10 101, P10 115, P10 116 y P10 117. Similares resultados fueron encontrados en especies de *Desmodium* que crecen en América del Norte (Parker 1999, 2002, 2003). En este sentido, estudios realizados por Gu y colaboradores (2007) sobre la diversidad de rizobios que nodulan especies de *Desmodium* en China, hallaron que más del 70 % de los aislamientos fueron de crecimiento lento e identificados como *Bradyrhizobium* y solo un pequeño grupo de crecimiento moderado y rápido). Asimismo, estudios realizados por Bècquer, *et al.* (2016) en leguminosas forrajeras de ecosistemas ganaderos de Cuba, encontraron rizobios aislados de *D. incanum* con características morfológicas y aspecto de sus colonias similares a las encontradas en nuestro estudio, así como también la tolerancia a diferentes factores abióticos estresantes (Bècquer, *et al.*, 2017).

Tanto en el suelo como en su interacción con la planta, los rizobios pueden estar sometidos a una amplia variedad de estreses ambientales. Entendemos por estrés cualquier situación ambiental que resulte en daño de componentes de la célula aún en

ausencia de respuestas celulares, o alternativamente, como cualquier situación que estimule la expresión de genes previamente vinculados con la exposición a condiciones ambientales específicas. En particular, el estrés a que se somete a las bacterias en su ambiente podría determinar un profundo cambio en la regulación de sus actividades metabólicas. Las bacterias generarán durante su adaptación a condiciones adversas un cambio fisiológico determinado pudiendo derivar en la inducción o represión de alguno(s) de sus componente(s) el/los cual/es podría/n estar directamente relacionados a la adaptación a tal ambiente desfavorable.

La capacidad de los microorganismos de crecer en diferentes condiciones puede variar ampliamente, incluso entre cepas de una misma especie, sin embargo puede haber características que son típicas de la especie, incluso en condiciones extremas. En los rizobios se han observado diferencias entre cepas de un mismo género en cuanto a diferentes condiciones ambientales extremas. En la Tabla IV.6 observamos una alta variación en el nivel de tolerancia al estrés de los aislamientos de rizobios obtenidos de las distintas poblaciones de plantas de *D. incanum* provenientes del centro y norte de Argentina. Todos los aislamientos crecieron en las condiciones de 28 °C, pH 7 y 0,01 % p/v NaCl y mostraron un crecimiento abundante a temperaturas de 35 °C al igual que las cepas de referencia utilizadas en este estudio (Tabla IV.5). El rango superior de tolerancia de temperatura que limita el crecimiento de los rizobios oscila entre 32 °C y 47 °C y varía entre especies y cepas (Pankhurst & Gibson, 1973, Hungría & Vargas, 2000). En nuestro estudio, en las regiones del extremo NE y NO del país correspondiente a la población P3 de la provincia de Misiones, P6 y P9 de Tucumán y P4 de Formosa ubicadas entre 60 y de 700 m snm y en suelos de textura franco arenosa a franco limosa, observamos que, entre el 47% y más del 50 % de los aislamientos toleraron temperaturas de 40 °C. Sólo un 23 % de los aislamientos provenientes de las poblaciones de Corrientes y 17% de Chaco, y las cepas P8 807 y P1 02 de Santa Fe y Entre Ríos respectivamente toleraron dicha temperatura. El hecho que las cepas presenten este comportamiento podría atribuirse a la temperatura de las zonas donde fueron aisladas (Cuadrado *et al.*, 2009). En suelos de Zimbabwe con temperaturas entre 40 °C y 60 °C, se han aislado cepas nativas de crecimiento rápido con un rango de temperatura óptima de 32-36 °C y de crecimiento lento cuyo rango fue 28-32 °C, presentando, las primeras, mayor porcentaje de aislamientos tolerantes a temperaturas superiores a 40 °C (Mpeperekí *et al.*, 1996). Estos resultados indicarían que ciertos rizobios poseen la capacidad de adaptación a suelos con altas temperaturas. Otros autores (Gaur 1993; Cuadrado *et al.*, (2009) informaron las

mismas temperaturas de crecimiento de rizobios que en nuestro estudio. Similares resultados reportaron Alí y colaboradores (2009) estudiando diversas leguminosas que crecen en regiones secas de la India donde los rizobios presentaron moderado crecimiento a 45 °C. Chibeba y colaboradores (2017) hallaron que cepas aisladas de nódulos de soja (en Mosambique) eran tolerantes a altas temperaturas (35 °C - 45 °C), pH extremos y salinidad. Otros trabajos previos también describieron este comportamiento (Montañez *et al.*, 1995; Harwani, 2006). Sin embargo, ensayos realizados con rizobios noduladores de *Desmodium triflorum* en Taiwán mostraron que cepas nativas de crecimiento rápido y 37° C de temperatura óptima no eran capaces de crecer a 40 °C (Hung *et al.*, 2005). Por otro lado, si bien muchos factores influyen en la competitividad, establecimiento y eficiencia de las cepas, la selección *in vitro* de rizobios tolerantes a altas temperaturas no es siempre considerado un enfoque promisorio para aplicaciones de campo (Hungria & Vargas, 2000). A pesar de ello, el estudio de estas características podría ser útil para futuras mejoras de inoculantes.

Como ya hemos mencionado, la viabilidad de los rizobios está condicionada por el pH de suelo. Hamdí (1985) clasifica a los bradyrizobios entre los menos tolerantes a la alcalinidad mientras que otros autores (Fernandez & Novo, 1988) reportaron cepas de *Bradyrhizobium* sensibles a pH iguales o superiores a ocho. Por otro lado, la ausencia de crecimiento a niveles bajos de pH puede obedecer al hecho que en esas condiciones los rizobios disminuyen notablemente su metabolismo, logrando adaptarse (Bécquer *et al.*, 2000).

En nuestro trabajo los estudios *in vitro* de tolerancia a la acidez han sido realizados mediante crecimiento de los rizobios en medios sólidos variando el pH. Los aislamientos obtenidos de las poblaciones de *D. incanum* crecieron entre valores de pH 5,0 y pH 8,0 (Tabla IV.6), este comportamiento de tolerancia a la acidez fue similar al previamente descrito por Ali y colaboradores (2009) en rizobios aislados de *Leucaena leucocephala*, *Tephrosia purpurea* y *Crotalaria medicaginea* provenientes de distintas regiones de India, y por Shetta y colaboradores (2011) en especies de *Acacia* y *Leucaena*. Sin embargo en estudios realizados por Xu y colaboradores (2016) en cuatro especies de *Desmodium* hallaron cepas que crecieron en un rango de pH 5,0 a 12,0. El efecto inhibitorio del crecimiento al elevar el pH fue claramente visible, y la respuesta al crecimiento de los aislamientos disminuyó al someterlos a valores muy alcalinos. Si bien los bradyrizobios son más tolerantes a las condiciones de acidez, solo el 11 % de las cepas de la colección pudieron crecer a pH 4,0 siendo en su mayoría de crecimiento lento. Las mismas

correspondieron al 8 % de los aislamientos de la población P8 de Santa Fe (Gral. Obligado) y 64 % de la población P10 Corrientes (Itatí). En esta última población, la habilidad de los rizobios para tolerar esos valores de pH podría deberse a su adaptación a las condiciones de acidez del suelo de origen (donde el pH medido fue cercano a 5,0). Valores similares de tolerancia a la acidez mostraron aislamientos de crecimiento rápido provenientes de diversas regiones de Venezuela (Marquina *et al.*, 2011). Nuestros datos mostraron que todas las poblaciones presentaron cepas tolerantes hasta pH 10,0, con excepción de la población P8 de Santa Fe (Gral. obligado) donde los aislamientos resultaron menos tolerantes a estas condiciones extremas. Rangos más amplios de tolerancia fueron encontrados en aislamientos provenientes del cultivo de soja en Egipto (Youseif *et al.*, 2014) donde todos los rizobios crecieron en un rango de pH 5,0-11,0.

La tolerancia a altas concentraciones de NaCl es un fenotipo muy complejo que implica no sólo la capacidad de las bacterias para tolerar el estrés, sino también la rapidez de respuesta y adaptación a los cambios ambientales. Los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* varían en su habilidad para crecer en condiciones de estrés salino, siendo *Rhizobium* más tolerantes a una elevada salinidad (Youseif *et al.*, 2014). Esta tolerancia depende del valor del pH, temperatura, fuentes de carbono y la presencia de solutos osmoprotectores. El efecto perjudicial de las sales sobre el crecimiento de ambos géneros se puede atribuir a una toxicidad directa como a través de un estrés osmótico (Thrall *et al.*, 2008). Nuestros resultados mostraron que los aislamientos de crecimiento lento fueron los más sensibles a aumentos de concentraciones salinas, y un escaso porcentaje mostró tolerancia frente a 1 % p/v NaCl (Tabla IV.6) mientras que las cepas de referencia de crecimiento lento utilizadas solo crecieron a 0,01 % p/v NaCl (Tabla IV.5). Similares resultados encontraron Granada y colaboradores (2014) en cepas de rizobios aisladas de *D. incanum*. Sólo los aislamientos P3 302, P5 94, P5 97 y P6 618 toleraron concentraciones del 2 % p/v de NaCl al igual que los rizobios de crecimiento rápido y la cepa de refererencia *R. hainanense*. Otros estudios encontraron que las cepas nativas de crecimiento rápido fueron más tolerantes a la salinidad (Abderl -Salam, 2010; Youseif *et al.*, 2014).

A partir del conocimiento disponible desde el punto de vista molecular respecto de la asociación simbiótica, es muy posible que la tolerancia a algún o a diversos factores abióticos aún en condiciones de suelos, sólo mejore la persistencia de las cepas inoculadas

pero no guarde relación directa con la capacidad simbiótica de la bacteria. En este sentido, la tolerancia en suelo es una condición necesaria pero no suficiente.

En este capítulo nos propusimos caracterizar fenotípicamente los rizobios nativos que nodulan *D. incanum* en Argentina. Al evaluar aspectos microbiológicos básicos observamos que la mayoría de los rizobios que nodulan esta especie son de crecimiento lento, este comportamiento fue independiente de los sitios de muestreo. También pudimos evidenciar un alto grado de heterogeneidad de las cepas en relación a la tolerancia a distintas condiciones de estrés frecuentemente presentes en los sitios del centro y norte de nuestro país donde habita *D. incanum*. Evidenciamos un número importante de cepas tolerantes a temperaturas elevadas (40 °C) y pH extremos (pH 4,0- pH 10,0) mientras que la mayoría de los aislamientos fue poco tolerante a las concentraciones salinas más altas ensayadas.

Como resultado de los ensayos descritos en este capítulo se ha construido una vasta colección de rizobios noduladores de *D. incanum* (con el propósito de obtener germoplasma local), que en su mayoría fue recuperada de suelos de origen en condiciones de crecimiento controlado. El establecimiento de esta colección de rizobios ha construido la base para avanzar en el análisis de sus características de tolerancia a factores abióticos de estrés en condiciones de laboratorio. De acuerdo con lo expuesto precedentemente, el análisis de la biodiversidad de los rizobios presentes en suelos argentinos permitirá avanzar en el conocimiento de las complejas relaciones ecológicas y agronómicas entre ambos simbioses y seleccionar cepas adaptadas de diversos tipos de estrés ambiental, contribuyendo a optimizar la eficiencia simbiótica de la asociación entre rizobios y *D. incanum*. Para avanzar con los objetivos propuestos, seleccionamos aislamientos correspondientes a cuatro poblaciones representativas de la colección para continuar con los estudios de caracterización genética y simbiótica (ver Capítulo V y VI).

Tesis Doctoral - Toniutti María Antonieta

CAPÍTULO V

**Diversidad genotípica y
análisis filogenético de
rizobios simbiosomas de
Desmodium incanum
presentes en suelos de
Argentina**

V.1. ANTECEDENTES GENERALES

Como hemos mencionado en la Introducción de esta tesis, los rizobios noduladores de plantas leguminosas fijadores de nitrógeno, son miembros genética y fisiológicamente diversos de las clases alfa- y beta-proteobacterias. Las poblaciones de estos microsimbiontes presentan, en muchas ocasiones, un alto nivel de diversidad genética proporcionando evidencia de intercambio genético en las poblaciones (Eardly *et al.*, 1990; Demezas *et al.*, 1991; Demezas *et al.*, 1995; Eardly *et al.*, 1995). 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 (Dykhuisen & Green, 1991). El clima del lugar del aislamiento geográfico, el tipo de suelo y el genotipo de la planta hospedadora (Miranda-Sánchez *et al.*, 2016) son parámetros importantes en el estudio de la evolución de un organismo (Demezas *et al.*, 1995).

Trabajos realizados en otros países indican que las poblaciones nativas aisladas de suelos con presencia de diversas especies de *Desmodium* poseen un alto polimorfismo (Granada *et al.*, 2014, Gu *et al.*, 2007, Han *et al.*, 2008, Crossa *et al.*, 1999). Por lo tanto, es probable que nuestras poblaciones autóctonas también sean diversas, aunque no se puede descartar que exista algún genotipo predominante.

Si bien, el potencial productivo de *Desmodium* spp. es reconocido y se la considera como una forrajera alternativa para regiones húmedas y subhúmedas (Marques & Paim, 1993), son aún escasos los estudios sobre la diversidad genética de los rizobios que se asocian con estas leguminosas.

Los rizobios son taxonómicamente muy diversos y se necesitan métodos de clasificación eficientes para identificar sus genotipos. La diversidad genética se refiere a la variación (polimorfismo) de los genes dentro de la especie. Esto abarca poblaciones diferenciadas de la misma especie o la variación genética dentro de una población. Las técnicas moleculares han contribuido al desarrollo de métodos simples y rápidos para la caracterización de la diversidad microbiana, incluyendo aquellas que distinguen géneros, especies e incluso cepas (Giongo *et al.*, 2008). En este sentido, la biología molecular ha aportado diversas herramientas, en particular se han utilizado varios marcadores moleculares para realizar estudios sobre la diversidad de organismos presentes en una población, inferir sobre relaciones filogenéticas e identificar a un microorganismo.

Actualmente, para evaluar la diversidad de poblaciones bacterianas, existen múltiples métodos, entre ellos podemos mencionar: la huella digital (*fingerprint*, De Bruijn *et al.*, 1992), la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, Thomas-Oates *et al.*, 2003), el análisis de fragmentos de restricción con polimorfismo de longitud, (RFLP, Li *et al.*, 2011) y la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE, Webster *et al.*, 2013). Más recientemente se ha empleado el secuenciamento genómico masivo de aislamientos seleccionados.

En particular la técnica REP-PCR (que empleamos en este trabajo) fue desarrollada para clasificar las bacterias en base a sus patrones de huella digital. Se fundamenta en el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores de ADN que poseen secuencias conservadas y repetidas en genomas de bacterias (Versalovic *et al.*, 1991; De Bruijn *et al.*, 1992). Estas son REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) y BOX (*Enterobacterial Repetitive Sequences*) (Versalovic *et al.*, 1994). Esta técnica es simple y altamente reproducible, es una herramienta muy usada para el análisis de la genética y taxonomía bacteriana que permite llegar a diferenciar a nivel de cepas (Versalovic *et al.*, 1991; de Bruijn, 1992), distinguir cepas estrechamente relacionadas, o deducir relaciones filogenéticas entre cepas bacterianas. Las secuencias repetidas REP, ERIC y BOX, son altamente conservadas en los genomas de rizobios. En particular, la técnica de huella digital ha sido ampliamente utilizada para caracterizar la diversidad de poblaciones alóctonas de bacterias noduladoras de leguminosas (Laguerre *et al.*, 1994, Rademaker *et al.*, 2000, Thomas-Oates *et al.*, 2003, Grange & Hungria, 2004, Loureiro *et al.*, 2007, Estrella *et al.*, 2009, Angelini *et al.*, 2011, Fornasero *et al.*, 2014, entre otros). Esto se debe a que la huella digital de ADN es un método muy sencillo que analiza la existencia de secuencias repetitivas dentro del genoma (Versalovic *et al.*, 1994). Esta técnica la utilizaremos para estudiar la diversidad genotípica de los rizobios aislados de *D. incanum*. Las técnicas anteriormente mencionadas pueden ser utilizadas tanto de forma individual (Chen *et al.*, 2000), como en conjunto (Batista *et al.*, 2007, Hungria *et al.*, 2006) dependiendo del objetivo y nivel de información que se desea obtener.

Por otra parte, al presente se cuenta con otras técnicas que están orientadas a la asignación taxonómica de los aislamientos. Las mismas permiten la identificación de género y especie de las bacterias basadas en aproximaciones de biología molecular, entre ellas, el análisis de secuencias de genes altamente conservados. Los candidatos para este análisis genético en bacterias incluyen los genes universales que codifican el ARN

ribosómico (ARNr) 5S, 16S (también llamada la subunidad pequeña), y el 23S y los espacios entre estos genes. El gen más comúnmente utilizado con fines taxonómicos para las bacterias es el gen ARNr 16S, ya que parece comportarse como un cronómetro molecular, como se señala en la revisión de Gutell y colaboradores (Gutell *et al.* 1984). La secuencia del gen ARNr 16S (de aproximadamente 1.550 pb de longitud) se compone de dos regiones variables y conservadas. El gen ARNr 16S es lo adecuadamente grande, con suficientes polimorfismos interespecíficos para proporcionar mediciones distintivas y estadísticamente válidas cuando se emplea la secuencia de la región variable para taxonomía comparativa. Las alteraciones en las secuencias presentan cambios aleatorios, y su transmisión es principalmente vertical, ya que no está sujeto a transferencia genética horizontal entre microorganismos. Asimismo, la secuencia del gen ARNr 16S se ha determinado para un gran número de cepas, las cuales se han depositado en GenBank, el mayor banco de datos de secuencias de nucleótidos (cuenta con más de 115.000 secuencias del gen ARNr 16S). Esto implica que hay muchas secuencias previamente depositadas contra la cual comparar la secuencia de una cepa desconocida.

En general, la comparación de las secuencias del gen ARNr 16S permite la diferenciación entre los organismos a nivel de género en todos los filos principales de bacterias, además de la clasificación de las cepas en múltiples niveles, incluyendo a nivel de especies y subespecies. Las excepciones ocasionales a la utilidad de la secuenciación del gen ARNr 16S por lo general se refieren a ciertas especies que tienen las mismas o muy similares secuencias. Así, el gen ARNr 16S, proporciona un reloj evolutivo de referencia y es el marcador genético universal más ampliamente utilizado para la identificación, clasificación y reconstrucción de la filogenia bacteriana. Sin embargo para la identificación de diferentes rizobios como en el género *Bradyrhizobium* el gen ARNr 16S presenta un alto grado de conservación entre las especies y la similitud de secuencias es relativamente alta (Willems *et al.*, 2001) lo que limita la separación de las especies (Lloret & Martínez Romero, 2005).

Si bien la identificación de los rizobios se basa principalmente en la secuenciación de genes ARNr 16S, ciertos genes *housekeeping* (que están implicados en funciones celulares fundamentales, tales como *recA*, *dnaK*, *glnA*, *glnII*) son también frecuentemente utilizados para diferenciar especies estrechamente relacionadas incluyendo aquellas del género *Bradyrhizobium* (Rivas *et al.*, 2009).

Durante los últimos años han surgido métodos alternativos para la identificación de los rizobios (y bacterias en general). En particular MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted*

Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) ha sido sugerido como un método rápido y fiable para la identificación bacteriana basándose en los perfiles característicos de proteínas para cada microorganismo (Sánchez-Juanes *et al.*, 2013). El sistema MALDI-TOF es una herramienta basada en la espectrometría de masas que permite obtener la identificación de microorganismos en forma rápida mediante el método de la huella peptídica. El espectro de masas obtenido o huella peptídica es único para cada microorganismo, y es comparado con las huellas de microorganismos de referencia presentes en una base de datos a través de un software específico (MALDI Biotiper 2.0).

El MALDI-TOF MS emplea el cálculo de tiempo de migración (tiempo de vuelo) de cada fragmento de una molécula a través de un trayecto predeterminado previa desorción/ionización láser de la molécula en una matriz determinada. Este espectrómetro tiene la capacidad de medir macromoléculas de hasta 100.000 Da, dentro de las cuales se ubican los péptidos y proteínas que forman parte de bacterias. Dado que un microorganismo analizado en el MALDI-TOF MS generará siempre el mismo espectro de masas, los fabricantes de los sistemas MALDI-TOF MS han diseñado archivos con los espectros de masas de la fragmentación de péptidos y proteínas que presentan los distintos microorganismos para una misma emisión del láser y una misma distancia de migración. La identificación se realiza a través de la comparación (correlación) del resultado de una bacteria con todos los espectros de masas que contiene el archivo de datos proporcionado por el fabricante, y de acuerdo a puntos de corte definidos para estas correlaciones. Estos archivos, junto con el software necesario para su manejo permitieron finalmente el uso de esta herramienta en el campo de la microbiología. Esta tecnología ha sido aplicada principalmente a la identificación de bacterias de interés clínico por lo que la mayoría de las especies disponibles en la base de datos son de interés en dicha área. En los últimos años se ha comenzado a utilizar esta herramienta en estudios de identificación de rizobios con el objetivo de construir una base de datos que incluya las cepas tipo de las especies actualmente aceptadas dentro de la familia Rhizobiaceae (Ferreira *et al.*, 2011). En particular, esta técnica ha permitido identificar cepas de especies filogenéticamente muy relacionadas del género *Bradyrhizobium* (Sánchez-Juanes *et al.*, 2013) y ha sido validada para la identificación de cepas de rizobios previamente identificados por el análisis de secuencias de genes. Se ha estimado que hasta un 99% de las cepas se identificaron correctamente cuando se compara con la secuenciación del gen ARNr 16S (Ferreira *et al.*, 2011, Jia *et al.*, 2015).

En el presente capítulo presentaremos el uso de técnicas de *fingerprint* de ADN, MALDI TOF y análisis de secuencias de los genes ARNr 16S y *nodC*, con el propósito de caracterizar la diversidad y la posición taxonómica de varios de los aislamientos noduladores de *D. incanum* que hemos presentado en los capítulos precedentes. En particular hemos elegido a las poblaciones P5, P8, P9 y P10 como poblaciones representativas de los distintos sitios de origen de los rizobios noduladores de *D. incanum* recolectados.

El objetivo de este capítulo fue caracterizar genóticamente los rizobios noduladores de *D. incanum*.

En primer lugar se describe la diversidad genética de los aislamientos seleccionados noduladores de *D. incanum* a través de la metodología *fingerprinting* de ADN total por métodos de PCR. Posteriormente se presentan las relaciones filogenéticas de los aislamientos mediante el análisis de secuencias correspondientes al ARNr 16S, el gen *nodC* y análisis del espectro de masas de células enteras obtenido mediante MALDI TOF MS.

V.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.2.1. Caracterización genotípica de los rizobios noduladores de *D. incanum*

Para comenzar el estudio de los rizobios nativos noduladores de *D. incanum* nos preguntamos en primer lugar si los rizobios que eran capaces de formar y ocupar nódulos bajo las condiciones de cada lugar de muestreo, serían genotípicamente distintos de los rizobios noduladores de *D. incanum* de otros sitios y otros países. Este aspecto reviste importancia ecológica porque podría ocurrir que existan adaptaciones específicas para realizar el proceso de infección/nodulación bajo condiciones ambientales particulares, lo que podría otorgar ventajas a las cepas autóctonas en su competitividad para nodular.

A partir de la colección previamente establecida y con el fin de avanzar en el estudio de la diversidad genética de los aislamientos simbiotes a través de técnicas de “huella digital”, seleccionamos cuatro poblaciones recuperadas de suelos de diferentes Distritos Fitogeográficos ubicados en las provincias de Chaco, Santa Fe, Tucumán y Corrientes, en las que los lugares de muestreo presentaron características físico-químicas diversas.

El estudio de la biodiversidad genética de la colección de aislamientos mediante la metodología *fingerprinting* de DNA lo realizamos empleando secuencias conservadas de bacterias (BOXA1R y MBOREP) (de Bruijn 1992; Judd *et al.*, 1993, Versalovic *et al.*, 1991, Versalovic *et al.*, 1994). Dicha técnica se empleó para analizar la biodiversidad genética de los aislamientos dentro y entre poblaciones. Se utilizaron las cepas *E. meliloti* LPU63 y/o *E. teranga* CB 3126, como cepas de control interno en cada uno de los geles de agarosa.

En este trabajo de tesis se obtuvieron 96 perfiles genómicos de la colección de aislamientos simbiotes de *D. incanum*. En la Figura V.1 se muestran los patrones de amplificación de ADN de los aislamientos de cada población seleccionada empleando ambos cebadores. Cada perfil obtenido con ambas técnicas presentó múltiples bandas de amplificación y permitió poner en evidencia las diferencias moleculares entre aislamientos. El perfil genómico de cada aislamiento produjo entre 3 y 12 bandas de distintas intensidades. Los dos cebadores utilizados permitieron establecer diferencias genéticas entre los aislamientos. No obstante las bandas de amplificación fueron más nítidas cuando se empleó el cebador BOXA1R.

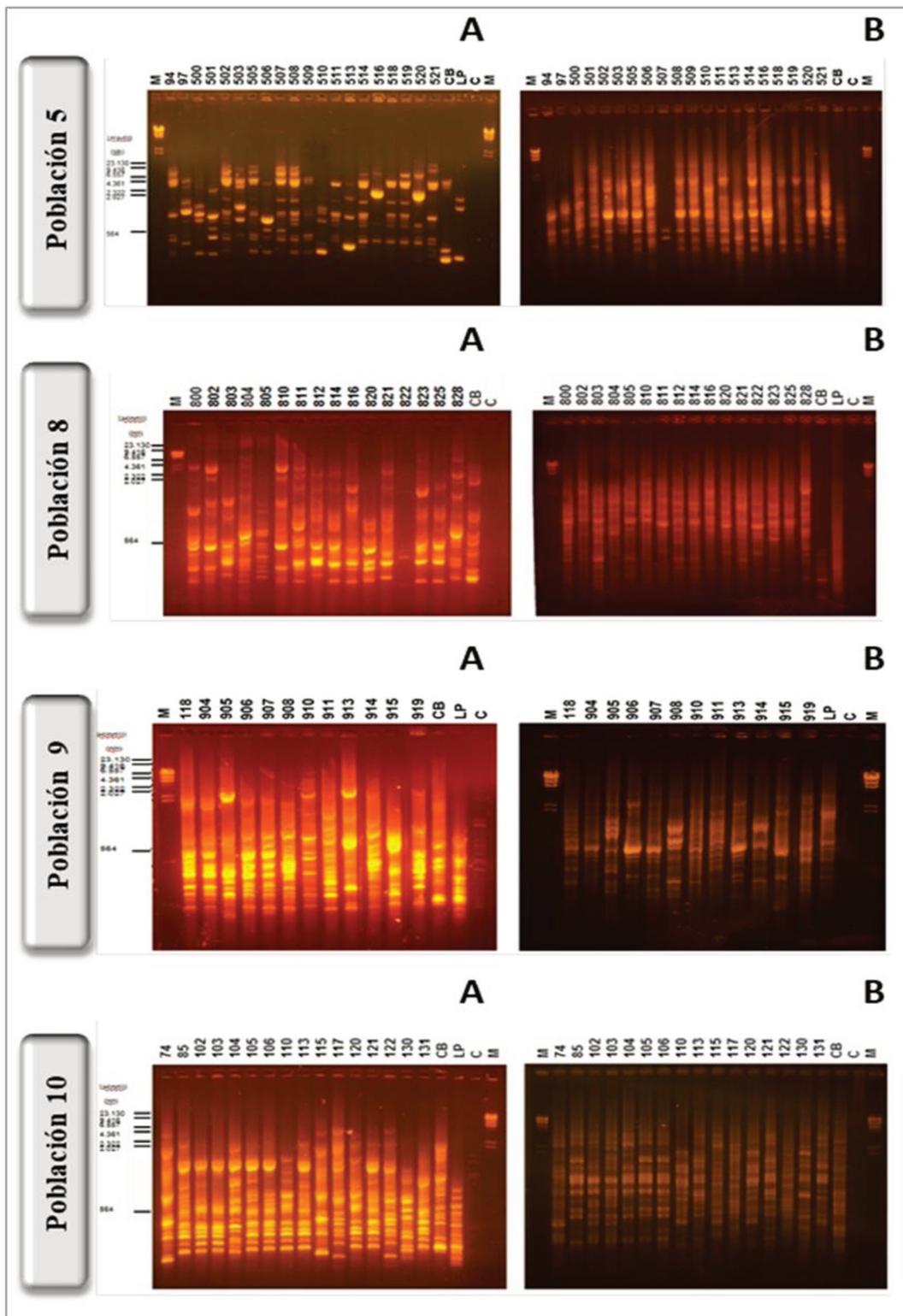


Figura V. 1. Perfiles de amplificación de ADN genómicos de los aislamientos noduladores *de Desmodium incanum*. Fingerprints BOXA1 (A) y MBOREP (B) de las poblaciones de *Desmodium incanum* P5 (Chaco), P8 (Santa Fe), P9 (Tucumán) y P10 (Corrientes). Se muestran además los patrones de amplificación correspondiente a las cepas *E. meliloti* LPU63 (LP), *E. terangae* CB 3126 (CB). La primera y/o última calle del gel corresponde al patrón del peso molecular de ADN del fago λ digerido con *HindIII* (M). C; representa el control negativo sin ADN molde.

Por esta razón se eligió analizar los perfiles de amplificación con BOXA1R para indagar la biodiversidad genética entre los aislamientos que componen cada población.

Los patrones de bandas de huellas digitales BOXA1-PCR fueron analizados mediante los paquetes informáticos empleando el coeficiente de similitud de Dice (Dice, 1945) y el método UPGMA. En la Figura V.2 se presentan los cladogramas obtenidos para nuestra colección de aislamientos, según el sitio de procedencia. Se observa una significativa diversidad, que puede agruparse en clados de mayor o menor tamaño de acuerdo al porcentaje de similitud que se escoja para trazar la línea de corte. Si bien estas divisiones y subdivisiones son en cierto modo arbitrarias, en todos los casos se tomaron líneas de corte con porcentajes de similitud inferiores a la similitud necesaria para considerar que dos aislamientos pertenecen a la misma cepa (Kaschuk *et al.*, 2006, Loureiro *et al.*, 2007). En la P5 (Chaco) se distinguen 11 perfiles diferentes con una similitud igual o mayor al 70%, en la P8 (Santa Fe) se evidencia 10 perfiles y la diversidad fue mayor siendo el 62,5%. En las poblaciones P9 (Tucumán) y P10 (Corrientes) se observaron 4 y 5 perfiles diferentes y hubo una menor diversidad entre los aislamientos siendo 33% y 31% respectivamente.

En general, se observó que los perfiles de amplificación generados con los cebadores BOXA1R y MBOREP mostraron polimorfismo genético para cada una de las cuatro poblaciones de simbiontes de *D. incanum* provenientes de centro y norte de Argentina, con variaciones en el grado de diversidad que dependen del sitio particular de origen de los mismos. De acuerdo con datos de la literatura (Del Papa *et al.*, 1999; Paffetti *et al.*, 1996 entre otros) y a nuestros resultados los diversos tipos de suelo se correlacionan con la diversidad génica.

En este sentido, diversos autores sostienen que el tipo de suelo constituye un factor determinante sobre la diversidad genética de poblaciones. Por ejemplo se ha demostrado que la fertilización puede disminuir los índices de diversidad rizobiana. Asimismo, el carbono orgánico, el contenido de fósforo disponible y el pH han sido descritos como los principales parámetros del suelo que afectan la variabilidad génica de *Bradyrhizobium japonicum* (Yan *et al.*, 2014). Estos resultados revelaron que diferentes usos del suelo y manejo de cultivos no sólo podían alterar la diversidad y abundancia de rizobios noduladores de soja, sino también cambiar las interacciones entre rizobios y plantas leguminosas o no leguminosas.

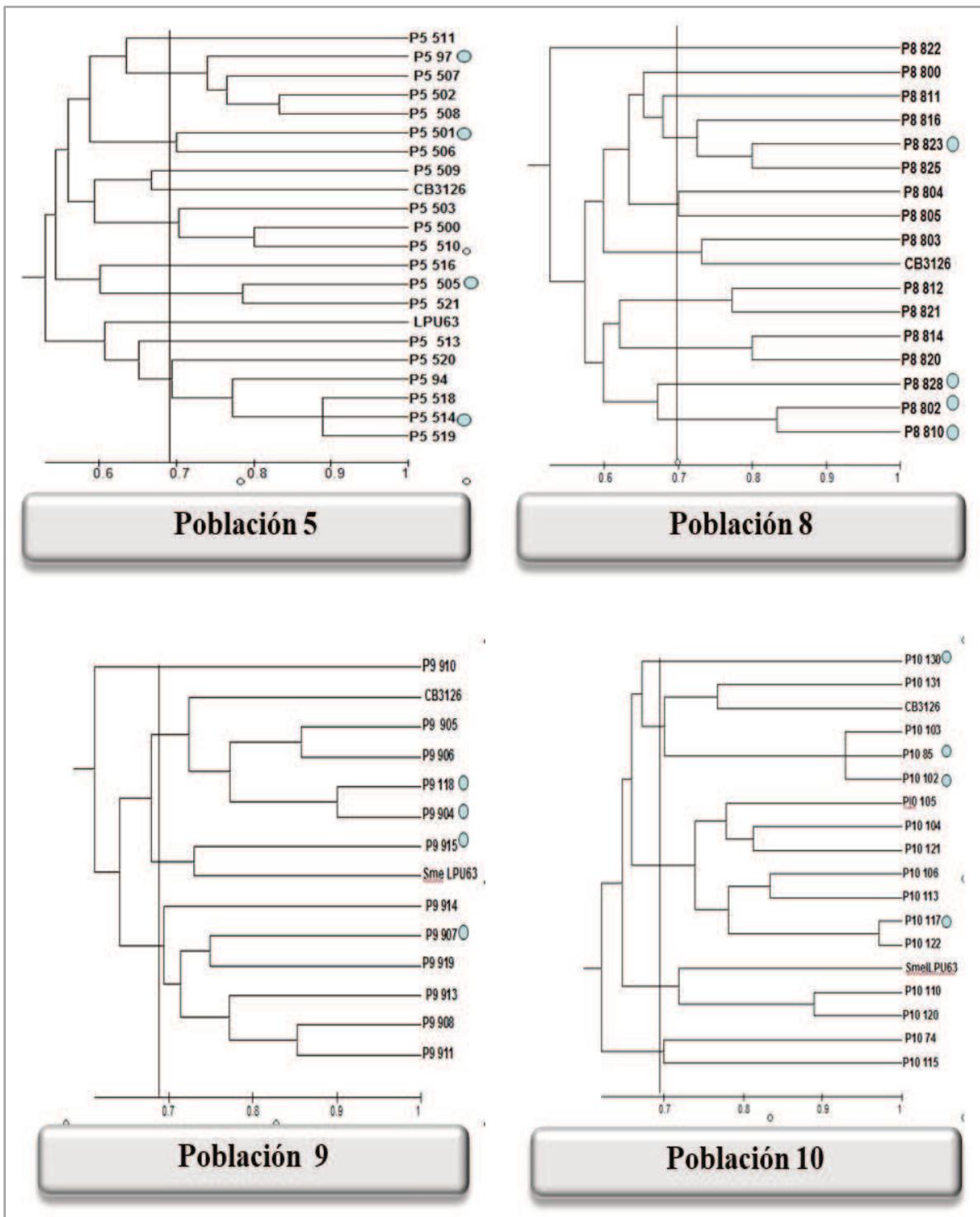


Figura V.2. Dendrogramas obtenidos a partir del análisis de los perfiles BOXAR1-PCR utilizando el coeficiente de similitud de Dice y el agrupamiento UPGMA. Aislamientos provenientes de P5 (Chaco), P8 (Santa Fe), P9 (Tucumán) y P10 (Corrientes). SmeLPU63 corresponde a *E. meliloti* LPU63y CB corresponde a *E. terangae* CB 3126. **Nota:** Los círculos indican los aislamientos seleccionados de acuerdo a sus características fenotípicas y genotípicas en cada población (véase la sección siguiente).

En este sentido, el suelo de Corrientes donde se recuperó la población 10 (que mostró una menor diversidad) presentó pH ácido (pH=5,1) y un bajo contenido de fósforo disponible.

En concordancia con los análisis fenotípicos y de tolerancia a diversos estreses abióticos (Capítulo IV), el análisis del germoplasma colectado mostró una marcada diversidad entre los aislamientos analizados en este trabajo. Los estudios que hemos presentado muestran variaciones en el grado de diversidad entre los simbiontes de *Desmodium incanum* que dependen del sitio particular de origen de los mismos (Figura V.3).

La diversidad genética observada resulta de especial interés en relación a la posibilidad de indagar dentro de la misma diferentes características simbióticas y de adaptabilidad a ambientes específicos. En este contexto, se proyecta la importancia del estudio de la biodiversidad de los rizobios noduladores de *Desmodium incanum*, no sólo por su función como microsimbiontes de leguminosas con potencial forrajero, sino también como un factor biótico sustancial para el establecimiento con fines productivos de especies de *Desmodium* en nuestros suelos.

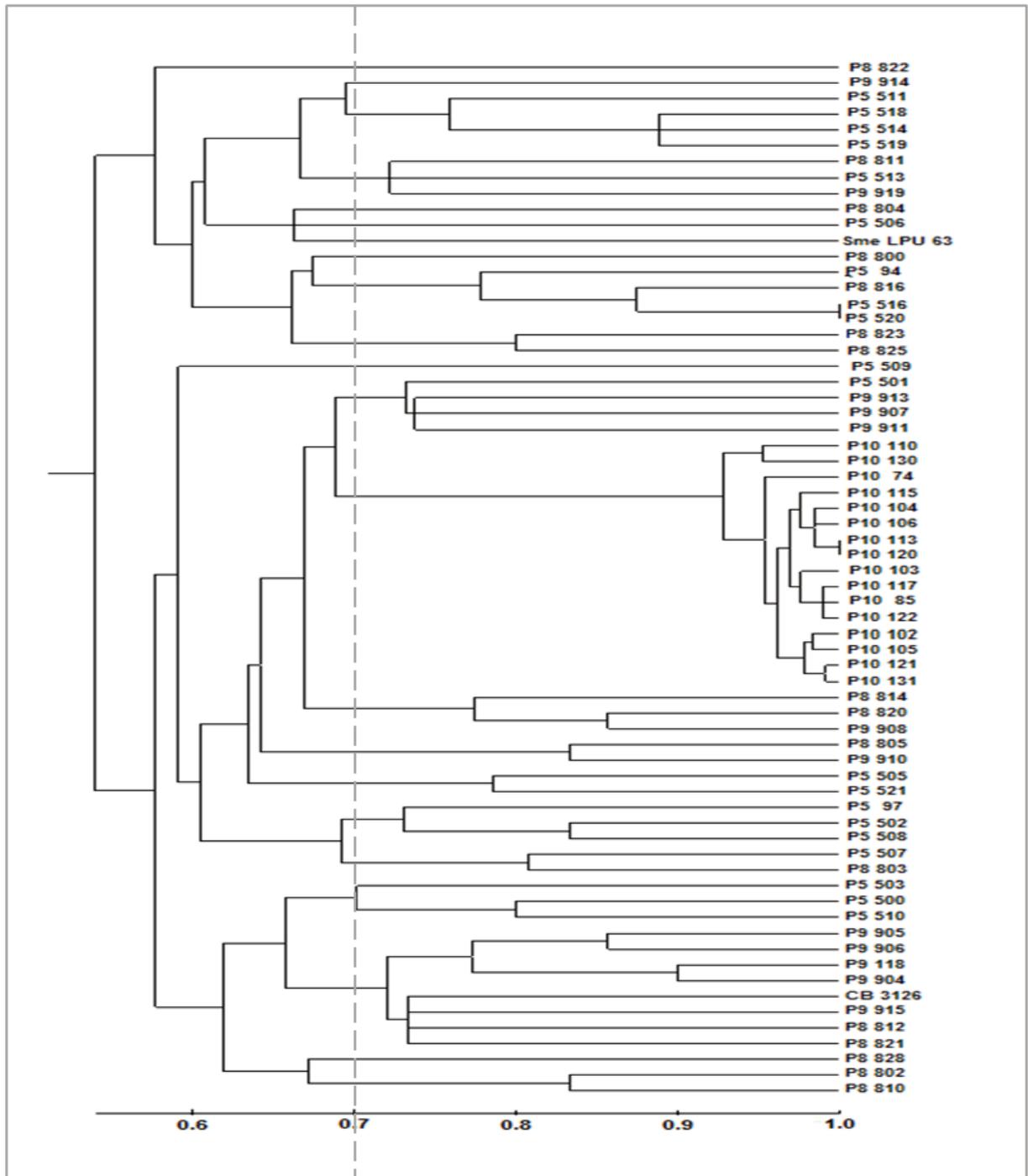


Figura V.3. UPGMA-dendrogramas (Coeficiente de similitud de Dice) derivados de las huellas dactilares BOXA1R-PCR de los aislamientos noduladores de *D. incanum* en Argentina. Los datos se obtuvieron a través de los patrones de huella dactilar BOXA1R-PCR de aislamientos de cuatro poblaciones de *D. incanum*. SmeLPU63: *Ensinfer meliloti* LPU63; CB3126: *Ensinfer terangae* CB3126.

V.2.2. Selección de aislamientos para avanzar en el estudio de sus relaciones filogenéticas.

Dado el elevado número total de aislamientos se decidió escoger un grupo acotado de ellos para avanzar en la asignación taxonómica y caracterización de dichos aislamientos. Para ello se emplearon los siguientes criterios:

- a) Diversidad genotípica, asociada con la pertenencia a diferentes clados en los dendrogramas obtenidos a partir del análisis de los perfiles BOXAR1-PCR utilizando el coeficiente de similitud de Dice y el agrupamiento UPGMA.
- b) Tolerancia a alguno/s de los factores abióticos ensayados en el Capítulo anterior (diversidad fenotípica).

En particular se seleccionaron cuatro aislamientos de cada población para avanzar tanto en su caracterización taxonómica como en el análisis de sus propiedades simbióticas. Los mismos se señalan en la figura V.2 por medio de un círculo. De esta manera los siguientes aislamientos: P5 97, P5 501, P5 505 y P5 514 (Población 5, Chaco), P8 802, P8 810, P8 823 y P8 828 (Población 8, Santa Fe), P9 118, P9 904, P9 907 y P9 915 (Población 9, Tucumán), P10 85, P10 102, P10 117 y P10 130 (Población 10, Corrientes) fueron seleccionados. En la tabla V.1 se presenta un resumen de las características fenotípicas de los aislamientos seleccionados (las cuales han sido discutidas en el capítulo precedente) y además se indica el tipo de perfil de amplificación BOXAR1-PCR que presentaron. Si bien los aislamientos P8 802 y P8 810, así como P9 118 y P9 904, y P10 85 y P10 102 presentan semejanzas en los perfiles BOXAR1-PCR superiores al 80%, difieren en su tolerancia a alguno de los factores abióticos evaluados. Estos resultados se analizaron para elegir aquellos aislamientos que por sus características pudieran resultar de potencial utilidad biotecnológica.

Tabla V.1. Resumen de las características del crecimiento de los aislamientos seleccionados de la colección de rizobios noduladores de *D. incanum* bajo diferentes condiciones de estreses abióticos en medio LMA (Capítulo IV) y tipo de perfil genotípico observado.

P	ID	Crecimiento a la temperatura indicada (°C)				Tolerancia al pH indicado						Crecimiento a la concentración NaCl indicada (% P/V)					Tipo ^b BOXAIR
		28°	35°	40°	45°	4	5	6,8	8	9	10	0,01	0,5	1%	2%	3%	
5	P5 97	3	2	2	0	0	2	3	3	2	2	3	3	2	2	0	A
	P5 501	3	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	1	0	0	0	B
	P5 505	3	3	1	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0	C
	P5 514	3	3	2	0	0	2	3	3	1	0	3	0	0	0	0	D
8	P8 802	3	3	0	0	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0	E
	P8 810	3	3	1	0	1	2	3	3	1	0	3	2	1	0	0	E
	P8 823	3	3	0	0	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0	F
	P8 828	3	3	0	0	0	2	3	0	0	0	3	0	0	0	0	G
9	P9 118	3	3	2	0	1	3	3	1	1	0	3	0	0	0	0	H
	P9 904	3	3	2	0	1	3	3	1	1	0	3	0	0	0	0	H
	P9 907	3	3	1	0	0	3	3	0	0	0	3	0	0	0	0	I
	P9 915	3	3	2	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0	J
10	P10 85	3	3	0	0	1	3	3	2	1	0	3	2	1	0	0	K
	P10 102	3	3	0	0	0	3	3	2	2	0	3	1	1	0	0	K
	P10 117	3	2	1	0	0	3	3	3	3	1	3	3	3	2	0	L
	P10 130	3	2	2	0	0	3	3	3	3	2	1	3	1	0	0	M

Referencias:

P: Población. ID: identificación del aislamiento. Los valores numéricos indican el grado de crecimiento de los aislamientos bajo la condición investigada en una escala 3 a 0 (3 = crecimiento completo, 0 = ausencia de crecimiento). b: Tipos de perfiles BOXAIR *fingerprints*.

V.2.3. Relaciones filogenéticas de los aislamientos seleccionados mediante el análisis de secuencias correspondientes al ARNr 16S, el gen *nodC* y análisis del espectro de masas de células enteras obtenido mediante MALDI TOF MS.

V.2.3.1. Identificación taxonómica de rizobios noduladores de *D. incanum* mediante amplificación y secuenciamiento de un fragmento interno del gen ARNr 16S.

En todos los aislamientos noduladores de *D. incanum* previamente seleccionados se llevó a cabo en una primera instancia la amplificación del gen ARNr 16S usando los cebadores bacterianos universales rD1 y fD1 (Weissburg *et al.*, 1991) que se unen a regiones bacterianas conservadas del gen ARNr 16S. En todos los aislamientos analizados se observaron los fragmentos de amplificación (aproximadamente 1440 pb) pero además se observó un gran número de productos de amplificación inespecíficos. En consecuencia se ensayó la PCR variando las condiciones, particularmente se ensayaron diversas temperaturas de *annealing* y concentraciones salinas, pero el resultado no mejoró sustancialmente. Finalmente se decidió cambiar los cebadores y se amplificó el ARNr16S usando el set de cebadores bacterianos universales 27f y 1385r (Weidner *et al.*, 1996) que también se unen a regiones conservadas de este gen y generan un producto de aproximadamente 1350pb.

Con el fin de evaluar las especies bacterianas de los aislamientos representativos seleccionados de cada población, se purificaron y secuenciaron los productos de PCR obtenidos utilizando los cebadores 27f y 1385r. Las lecturas obtenidas con ambos primers fueron solapadas y corregidas manualmente. Luego la búsqueda de similitud a nivel de ADN se realizó con el programa BLAST (por sus siglas en inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*). El análisis de las secuencias se realizó contra la base de datos EzBiocloud 16SrDNA (que sólo contiene las secuencias curadas de cepas tipo, <http://www.ezbiocloud.net/>). En taxonomía bacteriana, cuando se da nombre a una nueva especie, una cepa concreta se designa como cepa tipo. Las cepas tipo se conservan en colecciones de cultivos y son importantes con fines de nomenclatura, ya que el nombre específico va ligado a ella.

Los resultados del análisis de dichas secuencias se detallan en la Tabla V.2. Los mismos muestran una estrecha homología entre las secuencias obtenidas y aquellas presentes en la base de datos. La Figura V.4 muestra un árbol filogenético obtenido, donde los aislamientos noduladores de *D. incanum* seleccionados se incluyen en un clado que

incluye varios rizobios del género *Bradyrhizobium* (con un porcentaje de similitud en las secuencias del gen 16S rRNA igual o superior al 95%). Los mismos están estrechamente relacionados con *B. yuanmingense*, *B. elkanii*, *B. denitrificans*, *B. tropiciagri*, *B. jicamae*, *B. kavangense* y *B. guangxiense*. Dentro de este grupo de aislamientos noduladores de *D. incanum*, el aislamiento P10 117 fue el único que se encontró relacionado al género *Rhizobium*. Todas las secuencias obtenidas fueron depositadas en Genbank bajo los números de acceso que se indican en la Figura V.4.

El análisis del germoplasma colectado mostró, en concordancia con los análisis fenotípicos y de tolerancia a distintas condiciones de estreses abióticos (ver Tablas IV.6 y IV.7) una marcada diversidad entre los aislamientos recuperados de los suelos analizados de la Argentina.

Tabla V.2 Análisis de las secuencias del gen ARNr 16S de los aislamientos seleccionados. El análisis de las secuencias se realizó contra la base de datos EzBiocloud 16SrDNA.

ID	Cepa tipo	Número de acceso del mejor hit	%
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P10 130	<i>B. yuanmingense</i> CGMCC 1.3531 ^T	jgi.1041384	100
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P9 118	<i>B. yuanmingense</i> CGMCC 1.3531 ^T	jgi.1041384	100
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P9 904	<i>B. yuanmingense</i> CGMCC 1.3531 ^T	jgi.1041384	100
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P5 505	<i>B. yuanmingense</i> CGMCC 1.3531 ^T	jgi.1041384	99.91
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P5 514	<i>B. yuanmingense</i> CGMCC 1.3531 ^T	jgi.1041384	99.8
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P9 907	<i>B. yuanmingense</i> CGMCC 1.3531 ^T	jgi.1041384	99.78
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P9 915	<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T	X66025	98.62
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P5 97	<i>B. tropiciagri</i> SEMIA 6148 ^T	LFLZ01000084	100
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P8 810	<i>B. tropiciagri</i> SEMIA 6148 ^T	LFLZ01000084	100
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P8 802	<i>B. tropiciagri</i> SEMIA 6148 ^T	LFLZ01000084	100
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P5 501	<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	LLXZ01000092	99.91
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P10 85	<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	LLXZ01000092	99.29
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P10 102	<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	LLXZ01000092	100
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P8 828	<i>B. kavangense</i> 14-3 ^T	KP899562	99.65
<i>Bradyrhizobium</i> sp. P8 823	<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T	KC508877	100
<i>Rhizobium</i> sp. P10 117	<i>R. tropici</i> CIAT 899 ^T	CP004015	100

Referencias:

*ID: identificación del aislamiento *%: de identidad

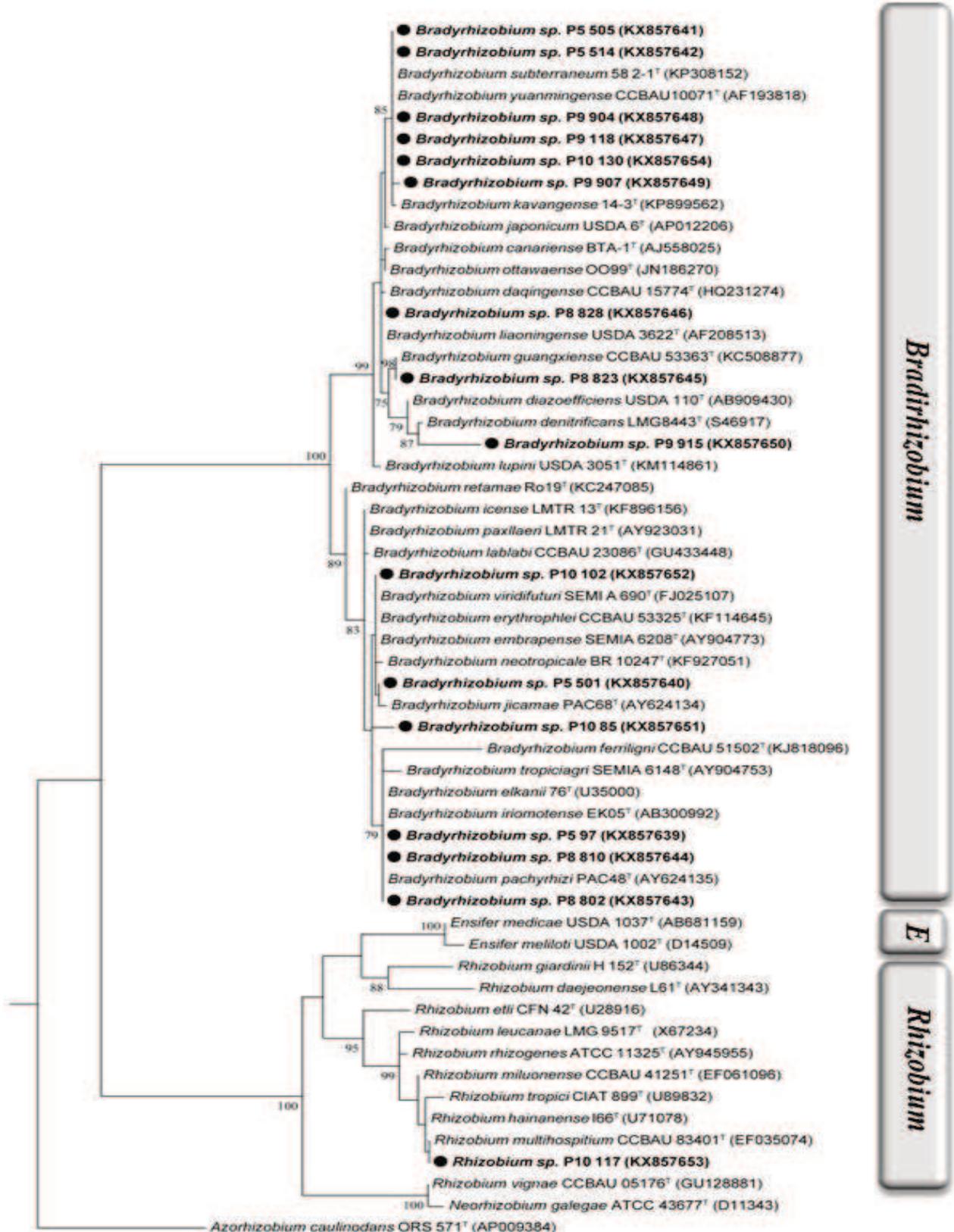


Figura V. 4. Vease la leyenda en la página siguiente.

Figura V. 4. Relaciones filogenéticas entre las regiones ADNr 16S de diferentes rizobios incluyendo los simbiontes seleccionados de *D. incanum* presentes en suelos de Argentina. Las secuencias de ADNr fueron analizadas con el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2015). La filogenia fue reconstruida a partir de fragmentos de ADNr amplificados con los primers 27f y 1385r (Weidner *et al.*, 1996). Las secuencias de ADN de las cepas de referencia tipo (T) fueron obtenidas de GenBank (sus números de acceso se indican entre paréntesis). La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de *Maximum Likelihood* en base a parámetros del modelo Tamura 3. Se muestra el árbol con la más alta probabilidad. El árbol consenso corresponde a una inferencia realizada con un test bootstrap de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando los algoritmos *Neighbor-Join* y BioNJ y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Los círculos indican aislamientos caracterizadas en este trabajo. E: *Ensifer*. (Vease la Figura V.4 en la página anterior).

V.2.3.2. Identificación de los rizobios mediante la técnica MALDI TOF MS

Como mencionamos en la introducción a este capítulo la técnica MALDI TOF MS ha generado un gran interés en los microbiólogos para la identificación rápida y clasificación de los microorganismos para su aplicación en investigaciones microbiológicas en general y en rizobiología en particular. Representa una plataforma rápida y confiable para la identificación y estudios ecológicos de las especies de la familia *Rhizobiaceae* (Ferreira *et al.*, 2011). Mientras que ciertos autores han considerado la resolución taxonómica de MALDI TOF MS comparable o superior al análisis de la secuencia del gen ARNr 16S (Welker & Moore, 2011), otros grupos han informado que la utilización de MALDI TOF MS y del Biotyper les permitió identificar correctamente cepas de bacilos gram-negativos a nivel de género y especie con una tasa de éxito entre el 93% y 82% (Saffert *et al.*, 2011).

En particular, los resultados del análisis del gen ARNr 16S no permitieron una buena resolución a nivel de especie en varios casos debido al alto grado de conservación que existe en algunas especies como en las del género *Bradyrhizobium* (Lloret & Martínez Romero, 2005) y/o a la diversidad de los aislamientos noduladores de *D. incanum* colectados en relación a las cepas tipo analizadas. Con la finalidad de mejorar la asignación taxonómica realizada a través de la secuenciación del gen ARNr 16S para los aislamientos seleccionados en nuestro estudio, decidimos emplear la identificación por MALDI TOF MS para avanzar en la discriminación de especies. Previo a realizar el análisis de los aislamientos, la base de datos fue ampliada mediante la inclusión de las siguientes cepas de referencia: *B. deitricans* DSM 1113^T DM, *B. betae* DSM 17288^T DSM, *B. betae* PL7461, *B. jicamae* PAC68^T, *B. elkani* USDA 76^T, *B. yuanmingense*

CCBAU0071^T, *B. japonicum* SEMIA 5079, *B. japonicum* USDA 6^T, *B. japonicum* E 109 y *B. diazoefficiens* USDA 110^T.

Las especies de *Bradyrhizobium* se caracterizan por presentar espectros de masas con picos agrupados en la región de 3200 a 3900 Da (Sánchez-Juanes *et al.*, 2013). En todas las especies de *Bradyrhizobium* esta región presenta múltiples picos que se corresponden con diferentes masas y en consecuencia sirven de diagnóstico para analizar cada especie de este género. En la Figura V.5 observamos los espectros de masas de algunas de las cepas de referencia que incluimos en la base de datos.

A continuación mostramos los espectros de masas de los aislamientos seleccionados de cada población en los cuales cada especie rizobiana está representada en un color diferente (Figura V.6). Los aislamientos P5 505, P5 514, P8 828, P9 118, P9 904, P9 907 y P10 130 presentaron un espectro similar a *B. yuanmingense*. Los aislamientos P5 97, P5 501, P8 802, P8 810, P10 85 y P10 102 mostraron espectros similares a los generados por *B. elkani*.

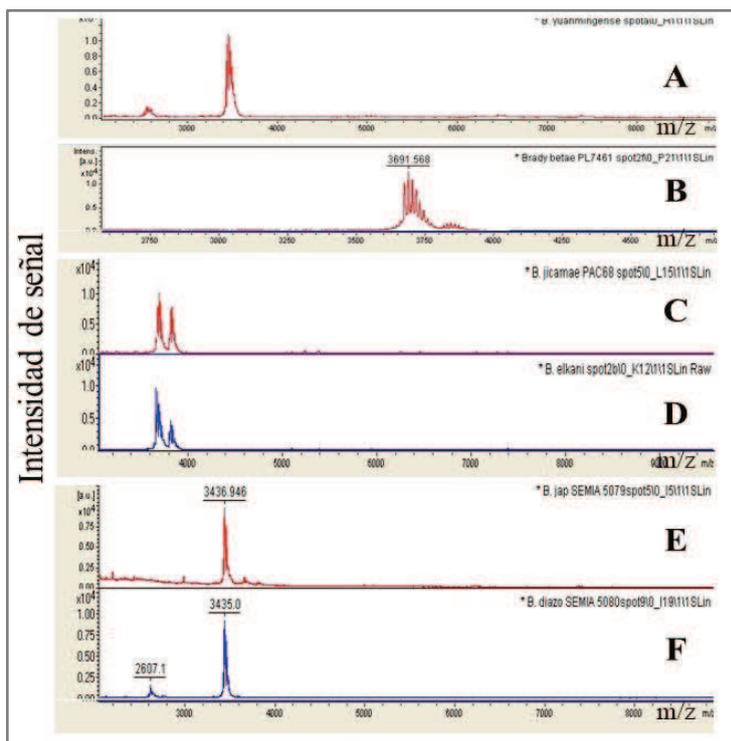


Figura V.5. Espectros de masas de las células enteras obtenidos mediante MALDI TOF MS. A modo de ejemplo se muestran algunos resultados obtenidos a fin de agrandar la base de datos mediante la inclusión de las siguientes cepas de referencia: **A)** *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU0071, **B)** *Bradyrhizobium betae* PL7461, **C)** *Bradyrhizobium jicamae* PAC68, **D)** *Bradyrhizobium elkani* USDA76T, **E)** *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079, **F)** *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110.

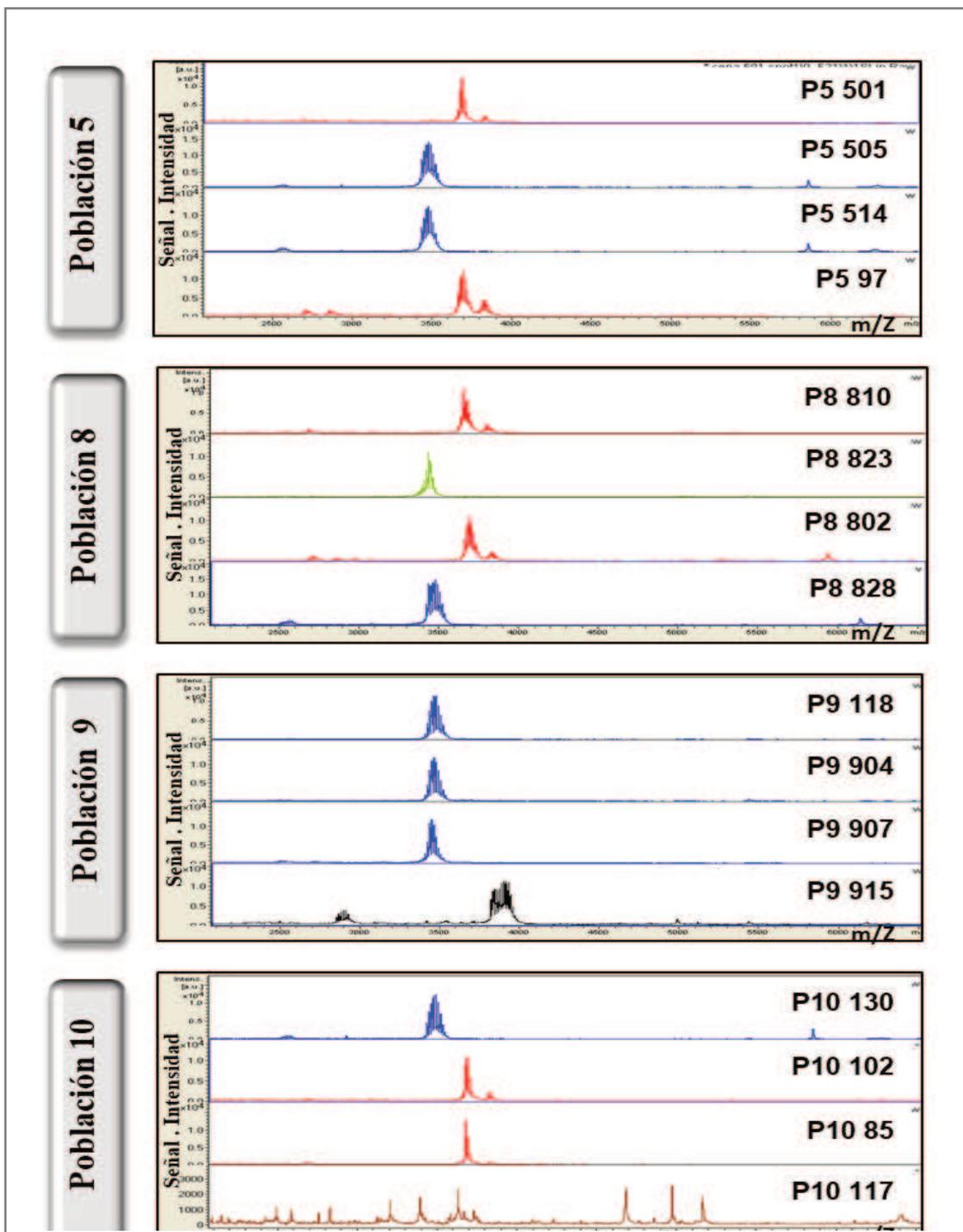


Figura V.6 Espectro de masas de las células enteras obtenido mediante MALDI TOF MS. Se muestra el análisis de los aislamientos seleccionados de cada población de *D. incanum*. (Se indica: *B. elkanii* en rojo, *B. yuanminense* en azul, *B. japonicum* en verde, *B. denitrificans* en negro y *R. tropici* en marrón).

Tabla V.3. Identificación de las cepas seleccionadas de la colección de rizobios noduladores de *D. incanum* mediante MALDI TOF MS.

ID	Organismo (mejor <i>hit</i>)	Puntuación*
Población 5		
P5 97	<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	2.266
P5 501	<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	2.088
P5 505	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU0071 ^T	2.350
P5 514	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU0071 ^T	2.342
Población 8		
P8 802	<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	2.254
P8 810	<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	2.363
P8 823	<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	2.276
P8 828	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU0071 ^T	2.238
Población 9		
P9 118	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU0071 ^T	2.221
P9 904	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU0071 ^T	2.345
P9 907	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU0071 ^T	2.213
P9 915	<i>B. dinitrificans</i> DSM 1113 ^T (#)	1.582 (#)
Población 10		
P10 85	<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	2.164
P10 102	<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	2.070
P10 117	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 ^T	2.150
P10 130	<i>B. yuanmingense</i> CCBAU0071 ^T	2.252

Referencias:

ID: identificación del aislamiento.

*Significado del valor de puntuación (score):

2,3-3,000: Muy probable identificación a nivel de especie

2,0-2,299: Segura identificación de género, probable identificación de especie

1,7-1,999: Probable identificación de género

0,0-1,699: Identificación no confiable (#)

Finalmente el aislamiento P8 823 generó un espectro de masas que se corresponde con el de *B. japonicum* y el aislamiento P9 915 con el de *B. denitrificans*. A pesar de que el aislamiento P9 915 no pudo ser identificado con una puntuación alta, presentó el espectro típico de masas de las células enteras obtenido con bacterias del género *Bradyrhizobium*.

Estos resultados mostraron que los aislamientos seleccionados de las poblaciones de *Desmodium incanum* provenientes del norte y centro de Argentina se relacionan principalmente con especies de *Bradyrhizobium* (estrechamente relacionados con *B. elkanii*, *B. dinitrificans*, *B. japonicum* y *B. yuanmingense*) con la excepción del aislamiento P10 117 de la Población 10 que se asoció al género *Rhizobium*., con *R. tropici*, *R. rhizogenes*, *R. hainanense*, *R. multihospitium* y *R. lusitanum* como las especies más cercana relacionadas (Figura V.4). Se observó identificación errónea a nivel de especie en algunos casos en el análisis MALDI TOF. Resulta evidente que la expansión de la base de datos con la inclusión de otros rizobios y bradyrizobios, podría sin duda mejorar las puntuaciones de los aislamientos estudiados. Por lo tanto, deben realizarse más investigaciones que impliquen un enfoque polifásico con el fin de arrojar luz sobre la identificación de estas cepas.

Asimismo, se puede observar una alta correlación entre los resultados obtenidos mediante MALDI TOF MS (Tabla V.3) y el análisis *in silico* (Blastn) de las secuencias del gen ARNr 16S (Tabla V.2), que en todos los casos (8 de 16 aislamientos) donde la especie rizobiana estaba ingresada en la base de datos del analizador de los espectros de masas, los resultados obtenidos con ambas aproximaciones experimentales fueron coincidentes.

V.2.3.3. Amplificación y secuenciamiento de un fragmento interno del gen *nodC*

Si bien está establecido que las filogenias basadas en los genes cromosómicos estables como los ARNr son necesarios para establecer la taxonomía de los rizobios, incluir la caracterización y clasificación de los genes simbióticos para la descripción de nuevos rizobios nos proporciona un marco complementario básico para comprender la simbiosis rizobio-leguminosa (Laguerre *et al.*, 2001). En general la filogenia basada en estos genes está más relacionadas con el sitio de origen de los aislamientos que con su filogenia cromosomal aportando evidencias sobre el proceso de transferencia horizontal de genes. En este sentido, con el fin de completar la caracterización genética de los aislamientos

seleccionados se realizó un análisis del gen *nodC* de algunos aislamientos seleccionados en base a sus propiedades fenotípicas (Capítulo IV) y simbióticas (Capítulo VI).

Lo resultados del análisis de secuencias del gen *nodC* se resumen en la Tabla V.4.

Tabla V.4 Porcentaje de identidad de las secuencias *nodC* de los aislamientos simbios de *D. incanum* seleccionados.

ID	<i>nodC</i> del organismo más cercano	%	Número de acceso del mejor hit
P5 514	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	83%	NZ_AXAU01000032.1
P8 810	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	95%	JQ889856.1
P9 118	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	81%	NZ_AXAU01000032.1
P9 915	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	82%	NZ_KB900701.1
P10 85	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	82%	NZ_KB900701.1
P10 130	ND	ND	ND

Referencias:

ID: Isolate number

?: Identity %

ND: no determinado

El análisis de secuencias de BLASTn mostró una alta similitud entre el gen *nodC* de los aislamientos P5 514, P8 810, P9 118, P9 915 y P10 85 y el gen *nodC* de *B. elkanii*. Sin embargo, la Figura V.7 muestra que el gen *nodC* de las cepas P9 915 y P10 85 se agrupó dentro de un clado *nodC* que incluyó el ortólogo de cepas de *B. tropiciagri* aisladas de nódulos de raíz de *Neonotonia wightii*, y que son capaces de fijar nitrógeno en soja (Delamuta *et al.*, 2015). Asimismo, el gen *nodC* del aislamiento P8 810 se agrupó dentro del clado *nodC* de la cepa *B. neotropicale* aislada de nódulos radiculares de *Centrolobium paraense* que crece en suelos de la región del amazonia en Brasil (Zilli, *et al.* 2014). Por el contrario, los fragmentos *nodC* de P5 514 y P9 118 resultaron muy similares y no se agruparon con ninguna de las variantes *nodC* descritas en bradyrizobios. Desafortunadamente, ninguno de los pares de cebadores reportados por Laguerre *et al.* (2001) permitió la amplificación del fragmento *nodC* presente en *Rhizobium* sp. P10 117 y *Bradyrhizobium* sp P10 130, lo que sugiere que estos aislamientos portan variantes alélicas *nodC* diferentes de los rizobios y bradyrizobios caracterizados a pesar de su probada capacidad de nodular *D. incanum* en nuestras condiciones experimentales. Esto

nos sugiere que dichos aislamientos contienen posiblemente una variante alélica *nodC* diferente de las presentes en los simbioses caracterizados en este trabajo.

Si bien, es necesario avanzar a futuro en el análisis de secuencias *nodC* de más aislamientos, los resultados obtenidos (ver relaciones filogenéticas, Figura V. 7) muestran que las plantas de *D. incanum* fueron noduladas por diversos rizobios (distintos géneros y especies), que portan genes *nodC* filogenéticamente diversos. Además, la falta de congruencia filogenética de carácter cualitativo pone en evidencia que el patrón de evolución del gen ARNr 16S (Figura V. 4) tiene un componente principal de herencia del tipo vertical que acompaña su especiación en modelos evolutivos y en contraste sugiere que el gen *nodC* puede haber evolucionado con procesos de transferencia horizontal de genes.

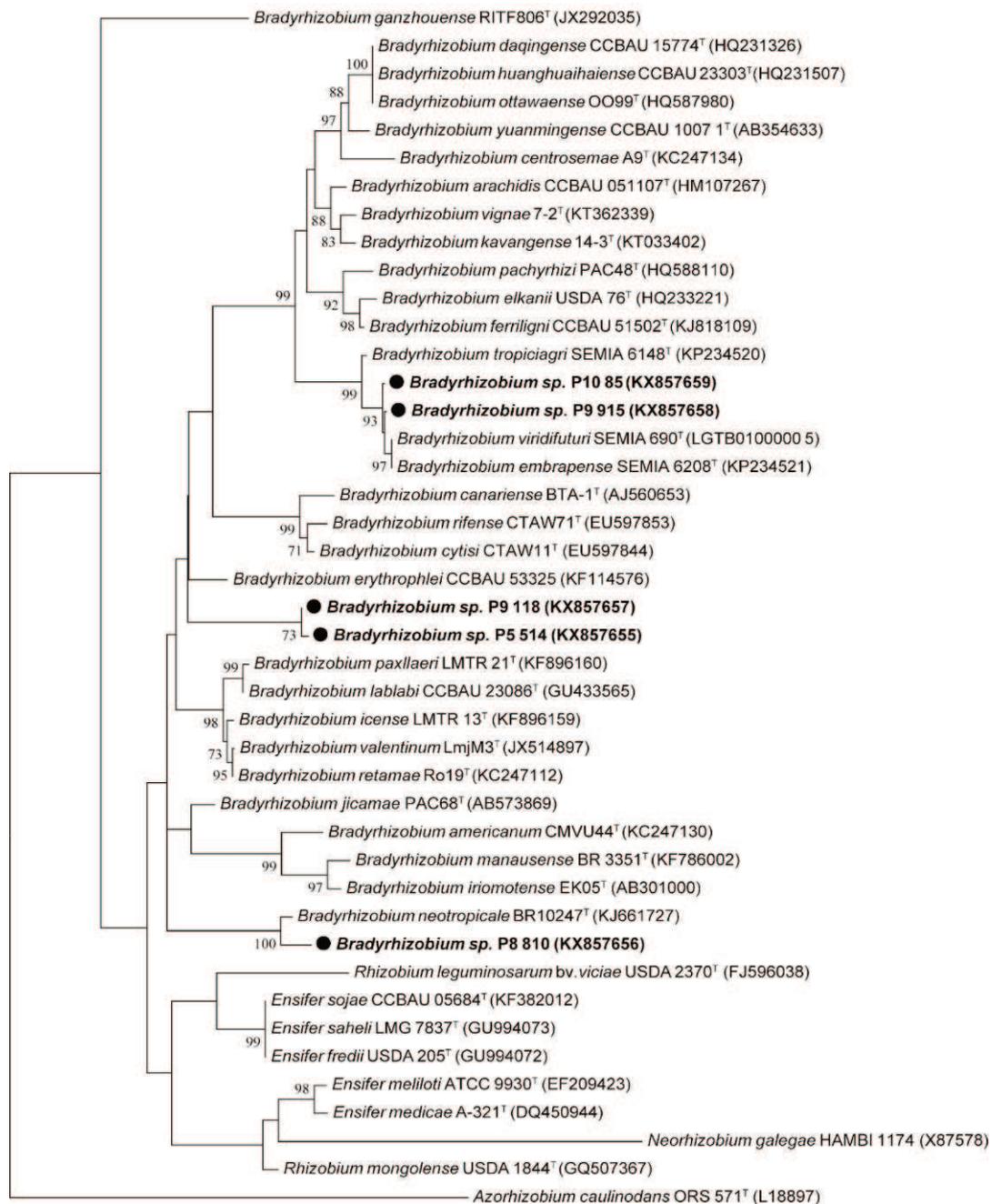


Figura V.7: Relaciones filogenéticas entre fragmentos de los genes *nodC* de diferentes rizobios incluyendo los simbioses de *D. incanum* presentes en suelos de Argentina. Las secuencias *nodC* fueron analizadas con el programa MEGA 7 (la historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima probabilidad, método *Maximum Likelihood* basado en el modelo de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993). La filogenia fue reconstruida a partir de fragmentos *nodC* amplificados según Laguerre *et al.* (2001). Se muestra el árbol con la más alta probabilidad. El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados agrupados se muestran junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron de forma automática mediante la aplicación de los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por parejas calculada utilizando el método de Maximum Composite Likelihood (MCL), y luego se seleccionó la topología con un valor de probabilidad log superior. Se utilizó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias de tipo evolutivas entre sitios. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medidas en número de sustituciones por sitio. Las secuencias de ADN de referencia fueron obtenidas de GenBank Los círculos indican aislamientos caracterizados en este trabajo.

En el presente Capítulo se analizaron las características genotípicas de los rizobios noduladores de *D. incanum* recuperados de diferentes sitios del centro y norte del país. Los estudios que hemos presentado muestran una marcada diversidad en los simbioses locales de plantas de *D. incanum*, con variaciones en el grado de diversidad que dependen del sitio particular de origen de los mismos. Estudios realizados por Parker *et al.* (2015) en América del Norte y trabajos previos (Parker 2012; Parker & Rousteau 2014) en otros lugares informaron que los *Bradyrhizobium* simbioses de especies de *Desmodium* mostraron alta diversidad genética. 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. En la literatura, ya ha sido reportado que la diversidad de rizobios puede determinar la capacidad de ciertas especies de leguminosas de habitar un determinado ecosistema (Béna *et al.*, 2005; Bailly *et al.* 2006). En este contexto, se reafirma la importancia del estudio de la biodiversidad de los rizobios noduladores de *D. incanum*, no sólo por su rol como microsimbioses de leguminosas con potencial forrajero, sino también como un factor biótico potencialmente importante para el establecimiento de especies de *Desmodium* en nuestros suelos.

Parker (1999) en estudios pioneros reportó el aislamiento de bacterias de nódulos radiculares de *Apios americana* y *Desmodium glutinosum*, dos leguminosas herbáceas comunes en el este de América del Norte y mediante el análisis filogenético de las secuencias de ARNr 23S y 16S indicó que ambas albergaban genotipos bacterianos similares a *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110. Sin embargo estas bacterias estaban estrechamente relacionadas con *B. elkanii* tanto en términos de los alelos de genes simbióticos como en el comportamiento frente a la planta. Luego, un estudio realizado por Gu y colaboradores (2007) avanzaron en la caracterización de rizobios recuperados de los nódulos de nueve especies de *Desmodium* nativas (entre las cuales no se encontraba *D. incanum*) crecidas en regiones templadas y subtropicales de China. Estos autores compararon la secuencia del gen ARNr 16S, y encontraron que en la mayoría de los casos estaban altamente relacionados con la especie *Bradyrhizobium*, en particular con *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium japonicum* y *Bradyrhizobium yuanmingense*, aunque también encontraron algunas cepas asociadas a *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*. Estos autores no estudiaron las secuencias de genes *nod* en dicha colección de rizobios noduladores de *Desmodium*.

Posteriormente, Hassen *et al.* (2014) informaron que los simbiontes microbianos asociados a los nódulos de *Desmodium uncinatum* y *Desmodium nicaraguense* se encuentran principalmente dentro del linaje *Bradyrhizobium elkani*. Estas observaciones resultaron coincidentes con los resultados obtenidos al analizar secuencias de ARNr 16S de cepas aisladas de *Desmodium uncinatum* de tres lugares geográficos diferentes incluyendo Australia, Zimbabwe y Colombia, donde se encontró que todas las cepas estaban estrechamente relacionadas a *Bradyrhizobium elkani* (Menna *et al.*, 2006). Granada *et al.* (2014) estudiaron la diversidad fenotípica y genética de aislamientos de *Desmodium incanum* y *Lotus* spp. recolectados en Brasil. En particular, estos autores analizaron la producción de compuestos indólicos y sideróforos, así como en la tolerancia a la salinidad de siete aislamientos nativos obtenidos de *D. incanum*. Posteriormente Xu y sus colaboradores (2016) analizaron treinta y cuatro cepas de rizobios obtenidas a partir de nódulos de las raíces de cuatro especies silvestres de *Desmodium* encontradas en Panxi, Sichuan (China) (*D. incanum*, no se encontró dentro de las 4 especies silvestres estudiadas). Si bien estos autores reportaron la presencia de aislamientos de *Rhizobium*, *Pararhizobium* y *Mesorhizobium* hallaron mayoritariamente aislamientos de *Bradyrhizobium* que presentaban un alto grado de diversidad.

En este trabajo de tesis, de acuerdo con los resultados obtenidos del análisis de las secuencias ARNr 16S y de los espectros de proteínas celulares totales, el análisis filogenético de los rizobios simbiontes de *D. incanum* presentes en suelos argentinos en su conjunto, reveló la presencia mayoritaria de bradyrizobios, en concordancia con los datos bibliográficos disponibles de estudios realizados en otros países. Los resultados mostraron una estrecha homología entre las secuencias obtenidas y aquellas presentes en la base de datos. Los aislamientos noduladores de *D. incanum* obtenidos en suelos del centro y norte de Argentina que hemos seleccionado pertenecen mayoritariamente al género *Bradyrhizobium* (con un porcentaje de similitud en las secuencias del gen ARNr 16S igual o superior al 85%) y están estrechamente relacionados con *Bradyrhizobium elkani*, *Bradyrhizobium japonicum* y *Bradyrhizobium yuanmingense* (Figura V.4). Dentro del subgrupo de aislamientos noduladores de *D. incanum* analizados, solo el aislamiento P10 117 se encontró filogenéticamente vinculado a *Rhizobium tropici*. Como hemos mencionado, resultados similares fueron informados por Gu *et al.*, (2007).

Al realizar la caracterización genotípica por medio de la técnica de huella digital de ADN, utilizando BOX-PCR que es considerado un método robusto para detectar la diversidad entre las cepas, obtuvimos un cladograma que nos permitió evidenciar un alto

grado de diversidad en los perfiles de productos de amplificación. Es importante remarcar que *Desmodium incanum* DC se encontró en distintos tipos de suelos y se escogieron lugares para la recolección de los ejemplares que representan una diversidad de distritos fitogeográficos. El material analizado en este capítulo incluyó muestras de las provincias de Chaco (San Fernando), Santa Fe (General Obligado), Tucumán (Yerba Buena) y Corrientes (Itatí). La diversidad bacteriana encontrada, no parece relacionarse con el sitio de procedencia de cada población. Las cepas nativas mostraron un comportamiento heterogéneo tanto para los caracteres estudiados en el Capítulo anterior (tolerancia a la alta temperatura, a la acidez, a la salinidad, etc.) como en su diversidad genética, independientemente del sitio de procedencia.

Con el propósito de avanzar en la caracterización genética de los rizobios asociados a *Desmodium* también analizamos el tipo de variantes *nodC* presentes en ciertos aislamientos seleccionados en este trabajo de tesis e investigamos las relaciones filogenéticas con los genes *nodC* homólogos de otros rizobios. Si bien el análisis Blastn de los fragmentos *nodC* secuenciados en este trabajo, en todos los casos arrojó como mejor *hit* (81-95 %identidad) al gen *nodC* presente en *B. elkanii* (Tabla V.4), los resultados presentados en la Figura V.7 muestran que las secuencias *nodC* de los aislamientos analizados forman parte de varios clados que incluyen secuencias *nodC* de diversos bradyrizobios. Esta observación pone en evidencia que las filogenias cromosomales y plasmídicas no son siempre coincidentes y que podría existir algún tipo de preferencia de la planta hospedadora con relación a la secuencia *nodC*. En este sentido, Rogel y colaboradores (2011), han encontrado que las filogenias de los genes *nod* de los rizobios se correlacionan con las especies de las leguminosas huéspedes. Desafortunadamente, no se hallaron disponibles las secuencias *nodC* de los aislamientos noduladores de *Desmodium incanum* recuperados por otros autores. Disponer de estas secuencias sin duda ayudaría a evaluar si los mismos son similares o diferentes a los alelos *nodC* presentes en Argentina, y a dilucidar si realmente existe algún tipo de preferencia de la planta hospedadora con relación a la secuencia *nodC*.

A fin de lograr una comprensión profunda sobre la señalización temprana de la relación simbiótica entre rizobios y *Desmodium sp.*, serán necesarios futuros esfuerzos, para avanzar en la secuenciación de cada uno de los grupos de genes *nod*, además de la elucidación estructural de los factores Nod correspondientes.

Los resultados detallados en este capítulo revelan las características de diversidad genotípica de los rizobios noduladores de *D. incanum* y la posición filogenética de los simbiontes obtenidos de suelos de Argentina. Las evidencias disponibles nos permitieron escoger aislamientos de potencial interés en cuanto a sus características. En el Capítulo siguiente abordaremos el estudio de los aislamientos de rizobios noduladores de *D. incanum* seleccionados en cuanto a su capacidad de nodular otras leguminosas y analizaremos las características simbióticas con su huésped original, *D. incanum*.

Tesis Doctoral - Toniutti María Antonieta

CAPÍTULO VI

**Caracterización
simbiótica de
aislamientos locales
noduladores de
*Desmodium incanum***

VI.1. ANTECEDENTES GENERALES

La FBN es la principal forma de ingreso del N en pastizales naturales, siendo los sistemas simbióticos leguminosa - rizobio los de mayor impacto cuantitativo en el ciclo del nitrógeno. En un sistema óptimo que asegure la presencia en el suelo de cantidades adecuadas de rizobios específicos para la leguminosa, dicha planta puede llegar a satisfacer del 36 al 68% del nitrógeno que necesita en su ciclo productivo a través de este mecanismo (Herridge, 2008). En término de eficiencia de la FBN hay evidencias que las leguminosas forrajeras perennes (por ejemplo, *Medicago sativa*, L., *Lotus corniculatus*, *Trifolium repens* L. y *Trifolium pratense*) son, por lo general, más eficientes para obtener un mayor porcentaje de nitrógeno de la atmósfera (N₂) que la mayoría de las especies de leguminosas de grano (Hassen *et al.*, 2014).

En este contexto, la caracterización de los rizobios simbiotes de las leguminosas es de alto interés agronómico y se centra principalmente en seleccionar individuos con capacidad de nodular y fijar nitrógeno de manera de lograr un aumento en el rendimiento y calidad de las leguminosas, sin que ello implique una pérdida de nutrientes para el suelo (Melchiorre *et al.*, 2011). La práctica de la inoculación podría traer beneficios significativos tanto desde el punto de vista agroecológico como económico (Franco & Balieiro, 2000). A pesar de las ventajas prácticas de la inoculación con rizobios, es escaso el conocimiento sobre la contribución de la FBN y la nodulación por rizobios nativos en leguminosas tropicales, así como el grado de especificidad de esta interacción (Etiene *et al.*, 2005), particularmente en plantas de *D. incanum* en suelos locales de Argentina. Por lo tanto es importante la evaluación de rizobios nativos de modo de posibilitar la selección de cepas altamente eficientes adaptadas a diferentes condiciones edafoclimáticas de nuestro país.

Un suelo puede contener diversas especies y cepas de rizobios diferentes dentro de la misma especie, mientras que también aislamientos similares se pueden encontrar en lugares distantes (Lindström *et al.*, 2010). Para alcanzar el potencial de la simbiosis es necesario avanzar en el estudio de las interacciones entre rizobios, leguminosas y su relación con el ambiente. En los sistemas naturales las especies de leguminosas en general, interactúan con cepas rizobianas de diversos genotipos, aunque muchas de estas combinaciones resultan poco eficientes en la fijación de nitrógeno. El conocimiento y el

manejo agronómico de las interacciones simbióticas de poblaciones nativas y naturalizadas de rizobios es un factor clave en la dinámica de las leguminosas en sistemas naturales, así como en el éxito de la introducción y persistencia de dichas especies en el campo natural.

Existen diversos enfoques para mejorar los sistemas de fijación simbiótica, entre ellos podemos mencionar, la mayor adopción de leguminosas, el fitomejoramiento y la selección de cepas de rizobios nativos para ser usadas como inoculantes. En este contexto, las consideraciones en la selección de cepas necesita incluir la compatibilidad y alta eficiencia en la fijación de nitrógeno de la bacteria con los genotipos de la leguminosa huésped, y también su adaptación a las condiciones ambientales y de suelo en cada región, particularmente cuando una, o varias restricciones abióticas pueden limitar la actividad simbiótica y la sobrevivencia de la bacteria inoculante, así como la presencia de rizobios en el suelo capaces de nodular y fijar nitrógeno (Olivares *et al.*, 2013). En particular, la capacidad de infección y fijación de nitrógeno se puede determinar por diversos parámetros y métodos que permiten su estimación en forma directa o indirecta (Somasegaran & Hoben, 2012). Algunos de los métodos más empleados para evaluar la actividad nitrogenasa, el rendimiento o el contenido de N incorporado a través de la fijación son: el recuento y peso seco de los nódulos, peso seco de la planta y el método de Kjeldahl respectivamente, siendo el número y peso seco nodular, y la materia seca de las planta indicadores indirectos de la capacidad de fijar N₂ utilizados en la evaluación de la eficiencia simbiótica entre rizobios y leguminosas.

Además debemos mencionar que las leguminosas presentan diferentes grados de promiscuidad. Mientras que algunos géneros como *Macrotium* o *Phaseolus* pueden ser nodulados por varias especies de rizobios, otros son huéspedes restrictivos para la nodulación como *Cicer*, *Trifolium* o *Vicia*. De igual manera las cepas de rizobios pueden tener un rango de plantas huéspedes amplio o estrecho (Peix *et al.*, 2015). La alta especificidad o por el contrario la promiscuidad de las leguminosas con respecto a los simbiontes rizobianos es probable que tenga ventajas y desventajas para la leguminosa (Ehinger *et al.*, 2014). Por ejemplo, la promiscuidad podría permitir a una leguminosa participar en una gama más amplia de interacciones beneficiosas y, por tanto, posiblemente ocupar más ambientes. Sin embargo, es probable que una alta especificidad dé como resultado una "aptitud" mayor, por el aumento de la fijación de N₂, dentro de un rango más estrecho de condiciones (Ehinger *et al.*, 2014). Actualmente es de gran

importancia la determinación de los grupos de compatibilidad y la selección de especies de rizobios que posean la capacidad de establecer simbiosis y fijar nitrógeno eficientemente. La existencia de rizobios de baja especificidad que establecen simbiosis eficientes con leguminosas forrajeras nativas y con otras exóticas permiten facilitar la adaptación de la leguminosa introducida. Estudios preliminares encontraron que el género *Desmodium* nodulaba con bradyrhizobios que mostraban diferentes grados de especificidad entre especies y variedades, incluyendo a este género en el grupo de leguminosas promiscuas pero a menudo ineficientes (Date, 1977). Un estudio realizado por Parker (1999) mostró la presencia de un conjunto común de bradyrhizobios capaces de establecer relaciones simbióticas con las leguminosas *Desmodium glutinosum* y *Amphicarpae bracteata* localmente cercanas, comunes de América del Norte. Posteriormente, Crosa *et al.* (1999) y Granada *et al.* (2014) encontraron una alta especificidad simbiótica de los rizobios que nodulan *Desmodium incanum*.

El interés agronómico en la caracterización simbiótica de los rizobios noduladores de *D. incanum* se centra fundamentalmente en seleccionar cepas locales adaptadas a las condiciones edafoclimáticas del centro y norte de Argentina, con capacidad de nodular y fijar eficientemente nitrógeno de manera de avanzar en la búsqueda de un potencial bioinoculante a fin de lograr un aumento en la producción y calidad del forraje. Será deseable seleccionar cepas que además de presentar características fenotípicas relevantes, manifiesten también una destacada competencia para la nodulación de las plantas de *D. incanum*.

El objetivo del presente capítulo fue caracterizar el comportamiento simbiótico de las cepas representativas de la colección de rizobios noduladores de *D. incanum*, evaluar la performance en suelo no estéril y la compatibilidad con otras leguminosas.

En primer término, estimamos la FBN de cepas de rizobios noduladores de *D. incanum* provenientes de diversas poblaciones (que fueran previamente seleccionadas por sus características fenotípicas y genotípicas) en soporte inerte y en condiciones de crecimiento controlado. Evaluamos además la compatibilidad simbiótica con otras leguminosas de interés agronómico y finalmente, describimos los resultados de la evaluación del comportamiento de dichos simbioses en suelo no estéril en invernadero de aquellos aislamientos que presenten mejor respuesta en condiciones controladas y la compatibilidad con otras leguminosas.

VI.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.2.1. Estimación de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) de rizobios locales en simbiosis con *Desmodium incanum* en condiciones hidropónicas con soporte inerte.

Con el propósito de evaluar el comportamiento simbiótico de los rizobios representativos de las distintas poblaciones de *D. incanum* hemos seleccionados dieciséis aislamientos para estimar la eficiencia en la FBN. Los mismos fueron elegidos con un amplio criterio selectivo, teniendo en cuenta los variados entornos donde crece *D. incanum*, diferentes tolerancias a factores abióticos tales como temperaturas y pH extremos y diversidad genotípica.

En todos los ensayos de estimación de la FBN se incluyeron plantas que fueron inoculadas con cada aislamiento y testigos no inoculados, libre de nitrógeno y suplementado con nitrógeno mineral. La cepa de referencia *Rhizobium hainanense* CCBAU 57015T aislada de *Desmodium sinuatum* en regiones tropicales de China (Chen *et al.*, 1997), fue incluida en los ensayos como control positivo. Previo a la instalación del ensayo en macetas con soporte inerte se determinó la carga de los inóculos bacterianos utilizados (aprox. 10^8 ufc/ml). Para todos los tratamientos, el período de crecimiento fue de 60 días encontrándose las plantas en cámaras de crecimiento en condiciones controladas de temperatura y humedad según se describe en el Capítulo II sección 7.3.

La eficiencia simbiótica se evaluó a través de características morfológicas de las plantas como la altura y longitud de raíz, producción de biomasa aérea y radicular y la evaluación de la nodulación utilizando semillas obtenidas de plantas de *D. incanum* del mismo lugar de procedencia de los aislamientos seleccionados. El contenido de nitrógeno de la parte aérea no fue calculado debido a que el peso seco de las plantas inoculadas no resultó suficiente para realizar dicha determinación. Se halló la eficiencia relativa (ER) que mide la acumulación de biomasa seca de los tratamientos inoculados en relación a los controles con y sin adición de nitrógeno (adaptado de Brockwell *et al.*, 1966), ver sección 7.4 del Capítulo II. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y las medias se compararon por el test de Tukey ($P \leq 0,05$).

VI.2.1.1 Evaluación de la biomasa vegetal

Los resultados obtenidos en los ensayos en los que se inocularon los rizobios seleccionados aislados de plantas de *D. incanum* de la población P5 se muestran en la Tabla VI.1. El análisis estadístico de los datos de las características morfológicas de las plantas mostró que la inoculación con el aislamiento P5 505 presentó la mayor altura de plantas con diferencias significativas en relación al tratamiento control sin N y mayor longitud de la raíz al igual que el aislamiento P5 514.

Estos resultados también mostraron una respuesta variable de la biomasa aérea y radicular de las plantas cuando fueron inoculadas con estas cepas. El análisis de la materia seca aérea permitió separar a los tratamientos en dos grupos. Un grupo formado por la inoculación con los aislamientos P5 97, P5 505 y P5 514 que alcanzaron los valores más elevados de biomasa aérea en las plantas superiores al tratamiento testigo con nitrógeno, siendo las diferencias significativas. Las plantas inoculadas con estos aislamientos formaron un mayor número de nódulos (ver figura VI.1., sección 2.1.2) sugiriendo que la mayor biomasa aérea observada sería atribuible a no solo a la mayor capacidad de fijación de nitrógeno, sino también a una mayor capacidad de nodulación. En el segundo grupo la materia seca aérea de las plantas de *D. incanum* fue inferior al testigo con adición de nitrógeno cuando fueron inoculadas con el aislamiento P 501 y la cepa de referencia *R. hainanense*.

Tabla VI.1. Evaluación de las características morfológicas, biomasa aérea, radicular y la eficiencia relativa (ER) en plantas de *D. incanum* inoculadas con los aislamientos seleccionados de la Población P5 proveniente de la provincia de Chaco. Id de las plantas 6926.

Aislamiento	Identificación (16S rRNA)	Características morfológicas de la planta		Biomasa de las plantas (mg/planta)		ER (%)
		Altura (cm)	Long. Raíz (cm)	Peso seco aéreo	Peso seco radicular	
P5 97	<i>B. tropiciagri</i>	4,15 ± 0,89 ab	6,23 ± 1,58 abc	42,40 ± 14,7 abc	12,68 ± 4,62 ab	148,2
P5 501	<i>B. jicamae</i>	4,13 ± 0,81 ab	5,73 ± 2,11ab	31,93 ± 10,99 ab	8,53 ± 2,52 ab	94,1
P5 505	<i>B. yuanmingense</i>	6,75 ± 0,99b	9,15 ± 1,01 c	85,35 ± 24,07 c	27,20 ± 9,92 b	370,1
P5 514	<i>B. yuanmingense</i>	5,38 ± 1,31ab	8,13 ± 1,18 bc	59,95 ± 8,78 bc	17,75 ± 2,32ab	238,9
Referencia	<i>R. hainanense</i> CCBAU57015 ^T	4,25 ± 1,74 ab	7,48 ± 1,51bc	29,55 ± 9,52 ab	16,83 ± 3,92 ab	81,8
T	----	2,80 ± 0,89 a	3,80 ± 0,26a	13,73 ± 1,63 a	5,53 ± 0,74a	-
T+N	----	4,54 ± 1,22ab	8,62 ± 1,48bc	33,08 ± 6,76 ab	13,96 ± 5,43 ab	100
NS P ≤ 0,05	----	<0,0107	<0,0008	<0,0013	<0,0345	-

Referencias:

T: Tratamientos de control sin nitrógeno y T+N: tratamiento con 25 mg de nitrógeno/maceta como NO₃K. Cada tratamiento se compone de 5 réplicas de una planta de la población de *D. incanum* en cada maceta inoculada con 1mL de un cultivo de 10⁸ufc.mL⁻¹. Id: Identificación correspondiente al número de catálogo de colección del Dr. Pensiero. Los promedios seguidos de letras diferentes en la misma columna difieren según el test Tukey (NS: Nivel de significación P ≤ 0,05).

En la tabla VI.2 se observa los valores promedio de la altura de las plantas, longitud de raíz y biomasa seca aérea y radicular en plantas de la población P8 de *D. incanum* inoculadas con los rizobios nativos seleccionados de los suelos de Santa Fe. La producción de materia seca aérea de las plantas inoculadas con los aislamientos P8 802, P8 810 y P8 828 fue superior al tratamiento control sin nitrógeno duplicando los valores promedio, pero siendo bajos al compararlos con el tratamiento control nitrogenado, con diferencias significativas. La biomasa nodular y los valores de ER muy bajos indicaron que la capacidad simbiótica de las cepas de esta población no fue eficiente para la FBN. Observamos que la cepa de referencia mostró un comportamiento similar al tratamiento testigo sin nitrógeno debido a la falta de nodulación con este ecotipo de *D. incanum*.

El efecto de la inoculación con los rizobios seleccionados de la población P9 (Tucumán) presentó un comportamiento destacado cuando se inocularon en plantas de *D. incanum* del mismo origen (Tabla VI.3). Los aislamientos P9 118 y P9 915 mostraron un efecto significativo sobre la producción de materia seca aérea y radicular de las plantas, superior al tratamiento control con nitrógeno, mientras que los aislamientos P9 904 y P9 907 fueron similares al control nitrogenado.

La materia seca aérea en las plantas inoculadas con la cepa de referencia difirió muy poco con el tratamiento control sin nitrógeno. Estos resultados muestran que la cepa *R. hainanense* en esta población fue ineficiente en suplir el nitrógeno para el crecimiento de las plantas. Por el contrario, los aislamientos seleccionados fueron eficientes, destacándose P9 118 y P9 915 con alta producción de biomasa aérea y radicular asociada a una elevada capacidad de nodulación (ver Figura VI.1 y VI.2).

En la población de Corrientes los parámetros evaluados se muestran en la tabla VI.4. Sólo la inoculación con los aislamientos P10 85 y P10 130 aumentaron significativamente el crecimiento de las plantas, mostrando una mayor altura, longitud radicular y producción de materia seca aérea en relación al tratamiento control sin aplicación de nitrógeno, como así también una elevada masa radicular en relación a las cepas restantes y el control libre de nitrógeno. El efecto favorable de la inoculación sobre el crecimiento de las raíces podría deberse a que estas cepas producirían sustancias promotoras que estimularían el crecimiento radicular de las plantas.

Tabla VI.2. Evaluación de las características morfológicas, biomasa aérea, radicular y el índice de eficiencia relativa (ER) en plantas de *D. incanum* inoculadas con los aislamientos seleccionados de la Población P8 proveniente de la provincia de Santa Fe. Id de las plantas 6935.

Aislamiento	Identificación (16S rRNA)	Características morfológicas de la planta		Biomasa de las plantas (mg/planta)		ER (%)
		Altura (cm)	Long. Raíz (cm)	Peso seco aéreo	Peso seco radicular	
P8 802	<i>B. tropiciagri</i>	6,83 ± 0,96 a	5,96 ± 1,35ab	54,02 ± 11,18 a	14,03 ± 4,11 a	22,1
P8 810	<i>B. tropiciagri</i>	4,07 ± 1,21a	7,71 ± 2,51ab	42,07 ± 10,35 a	10,91 ± 3,81 a	13,9
P8 823	<i>B. guangxiense</i>	5,60 ± 2,22a	5,10 ± 1,48a	20,84 ± 3,73 a	9,72 ± 3,71 a	0,7
P8 828	<i>B. kavangense</i>	5,90 ± 1,05 a	6,90 ± 1,48 ab	39,46 ± 12,24a	18,52 ± 4,50 a	12,1
Referencia	<i>R. hainanense</i> CCBAU57015 ^T	3,33 ± 0,58 a	7,33 ± 1,53 ab	21,37 ± 10,81a	13,43 ± 5,81a	-
T	----	4,38 ± 1,18a	8,25 ± 2,75 ab	21,80 ± 2,71a	18,63 ± 4,08a	-
T+N	----	9,33 ± 3,57a	12,6 ± 0,58b	167,83 ± 54,98b	49,87 ± 5,81 b	100
NS P ≤ 0,05	----	ns	<0,0612	<0,0006	<0,0014	-

Referencias:

T: Tratamientos de control sin nitrógeno y T+N: tratamiento con 25 mg de nitrógeno/maceta como NO₃K. Cada tratamiento se compone de 5 réplicas de una planta de la población de *D. incanum* en cada maceta inoculada con 1mL de un cultivo de 10⁸ufc.mL⁻¹. Id: Identificación correspondiente al número de catálogo de colección del Dr. Pensiero. Los promedios seguidos de letras diferentes en la misma columna difieren según el test Tukey (NS: Nivel de significación P≤0,05).

Tabla VI.3. Evaluación de las características morfológicas, biomasa aérea, radicular y el índice de eficiencia relativa (ER) en la fijación de nitrógeno en plantas de *D. incanum* inoculadas con los aislamientos seleccionados de la Población P9 proveniente de la provincia de Tucumán. . Id de las plantas 6992.

Aislamiento	Identificación (16S rRNA)	Características morfológicas de la planta		Biomasa de las plantas		ER (%)
		Altura (cm)	Long. Raíz (cm)	Peso seco aéreo (maceta)	Peso seco radicular	
P9 118	<i>B. yuanmingense</i>	21,00 ± 5,89 c	15,79 ± 4,14b	530,09 ± 63,77c	185,19 ± 22,59b	570,2
P9 904	<i>B. yuanmingense</i>	8,00 ± 3,10 ab	11,0 ± 1,10 a	111,02 ± 44,12ab	40,48 ± 20,57a	109,9
P9 907	<i>B. yuanmingense</i>	12,66 ± 4,35 bc	11,00 ± 2,36 a	154,50 ± 28,23 ab	54,26 ± 21,61 a	157,6
P9 915	<i>B. denitrificans</i>	16,71 ± 2,28c	13,50 ± 2,10 ab	323,71 ± 63,77 bc	99,03 ± 37,99 ab	343,5
Referencia	<i>R. hainanense</i> CCBAU57015 ^T	4,61 ± 1,52ab	9,43 ± 1,27 a	39,43 ± 13,45ab	23,84 ± 9,33a	37,2
T	----	2,38 ± 0,79 a	10,81 ± 2,49a	10,99 ± 3,60a	15,86 ± 5,09a	-
T+N	----	7,17 ± 1,75ab	11,83 ± 2,42 ab	102,03 ± 17,90 ab	43,02 ± 13,30 a	100
NS P≤ 0,05	----	<0,0001	<0,0007	<0,0001	<0,0001	-

Referencias: T: Tratamientos de control sin nitrógeno y T+N: tratamiento con 25 mg de nitrógeno/maceta como NO₃K. Cada tratamiento se compone de 5 réplicas de una planta de la población de *D. incanum* en cada maceta inoculada con 1mL de un cultivo de 10⁸ufc.mL⁻¹. Id: Identificación correspondiente al número de catálogo de colección del Dr. Pensiero. Los promedios seguidos de letras diferentes en la misma columna difieren según el test Tukey (NS: Nivel de significación P≤0,05).

Tabla VI.4. Evaluación de las características morfológicas, biomasa aérea, radicular y el índice de eficiencia relativa (ER) en la fijación de nitrógeno en plantas de *D. incanum* inoculadas con los aislamientos seleccionados de la Población P10 proveniente de la provincia de Corrientes. Id de las plantas 6897.

Aislamiento	Identificación (16S rRNA)	Características morfológicas de la planta		Biomasa de las plantas (mg/planta)		ER (%)
		Altura (cm)	Long. Raíz (cm)	Peso seco aéreo	Peso seco radicular	
P10 85	<i>B. jicamae</i>	13,35 ± 4,09 b	17,20 ± 2,99 b	112,9 ± 20,38 bc	44,28 ± 14,09 a	105,5
P10 102	<i>B. jicamae</i>	2,80 ± 1,05a	8,50 ± 0,77a	18,92 ± 9,57 a	18,52 ± 5,80 a	11,1
P10 117	<i>B. tropici</i>	3,20 ± 0,36 a	9,25 ± 0,96a	20,43 ± 7,80 a	21,45 ± 9,68 a	12,6
P10 130	<i>B. yuanmingense</i>	12,83 ± 3,48 b	12,67 ± 3,25 ab	135,30 ± 22,38c	46,10 ± 16,28 a	128,1
Referencia	<i>R. hainanense</i> CCBAU57015 ^T	3,13 ± 0,85a	9,00 ± 1,15 a	29,40 ± 9,67 ab	15,33 ± 6,23 a	21,6
T	----	1,70 ± 0,42a	9,35 ± 3,39 a	7,90 ± 2,68 a	10,83 ± 4,34a	-
T+N	----	10,53 ± 3,40b	14,81 ± 2,37b	107,39 ± 33,91 bc	64,13 ± 10,65 a	100
NS P ≤ 0,05	----	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0375	-

Referencias:

T: Tratamientos de control sin nitrógeno y T+N: tratamiento con 25 mg de nitrógeno/maceta como NO₃K. Cada tratamiento se compone de 5 réplicas de una planta de la población de *D. incanum* en cada maceta inoculada con 1mL de un cultivo de 10⁸ufc.mL⁻¹. Id: Identificación correspondiente al número de catálogo de colección del Dr. Pensiero. Los promedios seguidos de letras diferentes en la misma columna difieren según el test Tukey (NS: Nivel de significación P≤0,05).

La estimación de la ER indicó una amplia variación de la capacidad simbiótica de las cepas de esta población, observamos que los aislamientos P10 85 y P10 130 fueron eficientes superando al control nitrogenado La cepa de referencia y los aislamientos P10 102 y P10 117 presentaron un bajo desempeño en las condiciones del ensayo y una menor contribución en términos de materia seca aérea y eficiencia simbiótica, no difiriendo del tratamiento control sin nitrógeno.

Las plantas generadas de semillas de diversas poblaciones de *D. incanum* mostraron una respuesta variable en la producción de biomasa aérea cuando fueron inoculadas con rizobios procedentes de su mismo origen. La biomasa radicular en los aislamientos tuvo relación con la biomasa aérea, pero no mostró diferencias significativas con el tratamiento control sin nitrógeno, excepto en P5 505 y P9 118. Los aislamientos P5 97, P5 505, P5 514, P9 118, P9 915, P10 85 y P10 130 presentaron un comportamiento simbiótico de alta eficiencia en la fijación de nitrógeno, que se manifestó por alcanzar los mayores valores de biomasa aérea, altura de las plantas y longitud de sus raíces. Este comportamiento estuvo asociado a una mayor capacidad de nodulación de estas cepas como se detalla en la sección siguiente. Las diferencias en el potencial de fijación de nitrógeno de los aislamientos fue reflejado por los altos índices de eficiencia relativa, superiores al 100%.

En la población 8 los tratamientos de inoculación con los aislamientos seleccionados no aumentaron en forma significativa la materia seca aérea en relación al tratamiento testigo sin nitrógeno presentando una baja eficiencia simbiótica en las condiciones del ensayo. Asimismo, la cepa *R. hainanense* CCBAU57015^T mostró un bajo desempeño en los parámetros evaluados para las poblaciones de *D. incanum* seleccionadas bajo las condiciones de ensayo empleadas.

VI.2.1.2. Caracterización de la nodulación.

En los ensayos en que se empleó soporte inerte, todos los tratamientos controles, con o sin la aplicación de nitrógeno, no presentaron formación de nódulos radiculares. El análisis estadístico del número de nódulos obtenidos en los tratamientos correspondientes a los aislamientos de cada población se observan en la figura VI.1. En la población P5 las plantas inoculadas con los aislamientos P5 505 y P5 514 produjeron el mayor número promedio de nódulos por planta siendo 34 y 27 respectivamente. Estos valores superiores

a los producidos por los aislamientos P5 501, P5 97 y la cepa de referencia *R. hainanense* que formaron entre 5 y 11 nódulos por planta.

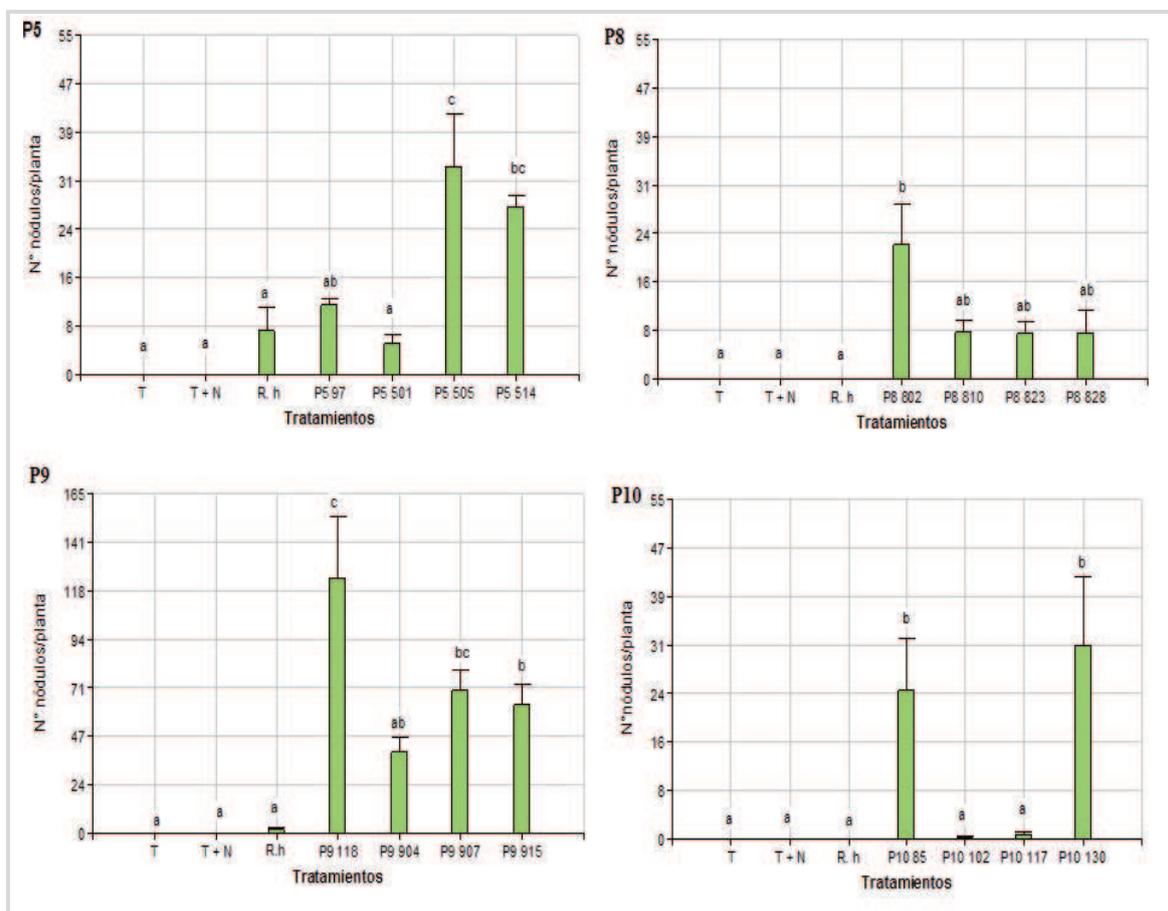


Figura VI.1. Número de nódulos promedio en plantas de *D. incanum* inoculadas con los rizobios seleccionados y cultivadas en soporte estéril en cámara de crecimiento para plantas. P: Población; R.h: *R. hainanense* CCBAU57015; T: Tratamiento control sin nitrógeno; T+N: Tratamiento control con nitrógeno como NO_3K . Los promedios seguidos de letras diferentes en la misma columna difieren según el test Tukey ($P \leq 0,05$)

El aislamiento P8 802 presentó la mayor nodulación en la población P8 con un promedio de 22 nódulos por planta, seguido por los aislamientos P8 810, P8 823 y P8 828 con un promedio de 7 nódulos por planta, y sin observar nodulación en las plantas inoculadas con la cepa de referencia *R. hainanense*. Esta cepa presentó el mismo comportamiento en plantas de la población 10, y muy escasa nodulación en la población P9. Como se observa en la figura VI 1. las plantas de *D. incanum* de la P9 mostraron una nodulación abundante. La inoculación con el aislamiento P9 118 resultó en un promedio

de 124 nódulos por planta, duplicando este valor a los encontrados en los aislamientos P9 907 con 69 nódulos, P9 915 63 nódulos y P9 904 39 nódulos por planta.

En la población P10 de Corrientes los aislamientos que presentaron un mayor número promedio de nódulos fueron P10 130 y P10 85 con 31 y 24 nódulos por planta respectivamente, siendo las diferencias significativas con los aislamientos P10 117 y P10 102 con 1 nódulo promedio por planta.

En la figura VI.2 se muestran los resultados de la masa seca nodular de las plantas de *D. incanum* de cada población inoculadas con los aislamientos seleccionados. La mayor masa nodular fue en aquellos aislamientos más infectivos como P5 505 y P5 514 con un promedio de 6,0 y 3,4 mg/planta respectivamente. Valores similares mostraron los aislamientos P10 85 con 6,88 mg/planta y P10 130 5,53 mg/planta con diferencias significativas con los restantes aislamientos de la misma población.

Las plantas de *D. incanum* de la población 9 mostraron una elevada biomasa nodular que se corresponde con la abundante nodulación que presentaron, destacándose la P9 118 y P9 915 con 42,06 mg/planta y 24,36 mg/planta respectivamente difiriendo significativamente con el resto de los aislamientos de la población. Todos los parámetros simbióticos evaluados en esta población fueron superiores al resto de las poblaciones estudiadas lo que podría indicar que los genotipos de una misma especie de leguminosa pueden mostrar un comportamiento diferencial con cepas de rizobios específicas (Parker, 1999). En los ensayos con plantas y aislamientos provenientes de la P8 no hubo diferencias significativas entre los tratamientos P8 802, P8 810, P8 823 y P8 828 en la biomasa seca nodular no superando en promedio los 4mg/planta.

La mayor formación de masa nodular es una característica importante en una cepa de rizobio ya que indica potencial de eficiencia en la fijación de nitrógeno (Somasegaran & Hoben, 1994).

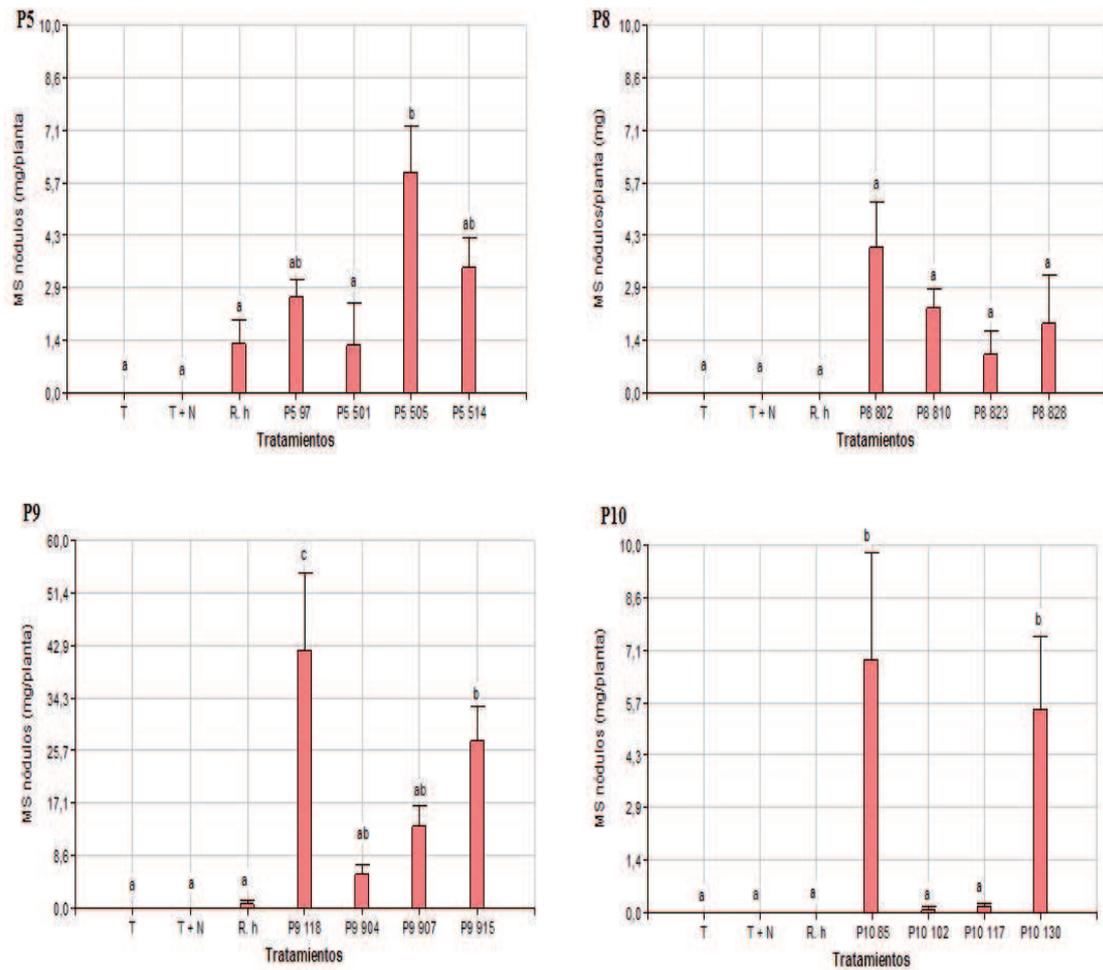


Figura VI.2. Masa seca de nódulos en plantas de *D. incanum* inoculadas con los rizobios seleccionados y cultivadas en soporte estéril en cámara de crecimiento para plantas. P: Población, R.h: *R. hainanense* CCBAU57015; T: Tratamiento control sin nitrógeno.; T+N: Tratamiento control con nitrógeno como NO_3K . Los promedios seguidos de letras diferentes en la misma columna difieren según el test Tukey ($P \leq 0,05$)

Para conocer la asociación entre la nodulación y los caracteres vegetativos de las plantas de *D. incanum* y evaluar la contribución de la fijación de nitrógeno en el crecimiento de las mismas, hallamos los coeficientes de correlación lineal. En este sentido, el número de nódulos por planta estuvo significativamente correlacionado ($P \leq 0,05$) con la masa seca nodular por planta en las cuatro poblaciones de *D. incanum* estudiadas ($r = 0,84$ a $0,95$). Además, la masa nodular estuvo asociada significativamente de manera positiva con la biomasa aérea de las plantas cuando fueron inoculadas con los aislamientos de las poblaciones P5, P9 y P10 ($r = 0,90$, $0,97$ y $0,72$) respectivamente, mientras que en la P8 la correlación fue menos consistente, no significativa ($r = 0,16$).

Los resultados sugieren que ciertos aislamientos de cada población contribuyen mediante la FBN al crecimiento de las plantas de *D. incanum*. Los resultados nos permitieron seleccionar seis aislamientos por su efectividad simbiótica (los cuales fueron superiores en la nodulación y en producción de biomasa vegetal). Los mismos fueron aislados de suelos localizados en distintos lugares del centro y norte de Argentina: P5 514 proveniente de Chaco, P8 810 de Santa Fe, P9 118 y P9 915 de Tucumán, y P10 85 y P10 130 aislados de Corrientes. En una etapa posterior, todos ellos fueron analizados en su comportamiento en suelo no estéril y además se ha evaluado su capacidad para nodular otras especies de leguminosas.

VI.2.2 Evaluación de la compatibilidad simbiótica de los aislamientos seleccionados en cuatro leguminosas huésped elegidas para este estudio

Realizamos un ensayo para evaluar el rango de hospederos de los aislamientos seleccionados en plantas de *Phaseolus vulgaris*, *Vicia sativa*, *Macroptilium lathyroides* y *Glycine max* (ver Capítulo II.7.5). La evaluación se realizó a través de la observación visual de los nódulos y la estimación de la materia seca de las plantas mencionadas. Una nodulación efectiva se caracterizó por nódulos de color interno rosado, en cambio los casos de nodulación inefectiva presentaron nódulos con una coloración interna blanca. Las leguminosas ensayadas difirieron en su capacidad de nodular con las cepas de rizobios en base a su respuesta a la nodulación y efectividad (Tabla VI.5).

En plantas de *P. vulgaris* solamente el aislamiento P9 118 logró inducir la formación de nódulos efectivos mientras que los aislamientos P8 810 y P10 85 produjeron nódulos muy pequeños y blancos. Mientras que en plantas de *M. lathyroides* los mismos aislamientos (P8 810 y P10 85) mostraron la capacidad de nodular y fijar nitrógeno simbióticamente efectivos al presentar nódulos con una coloración interna rosada. Ninguno de los aislamientos de *D. incanum* seleccionados fue capaz de nodular *G. max* bajo nuestra condición experimental. Los rizobios testeados tampoco nodularon *V. sativa* ya que esta planta es restrictiva para los aislamientos pertenecientes al género *Bradyrhizobium*.

Tabla VI.5. Evaluación de la capacidad de inducir la nodulación y fijación simbiótica de nitrógeno de los rizobios aislados de *D. incanum* en plantas de *P. vulgaris*, *V. sativa*, *M. lathyroides* y *G. max*.

Inóculo	Leguminosas							
	<i>Phaseolus vulgaris</i>		<i>Vicia sativa</i>		<i>Macrotilium lathyroides</i>		<i>Glycine max</i>	
	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix
P5 514	-	-	-	-	-	-	-	-
P8 810	+	-	-	-	+	+	-	-
P9 118	+	+	-	-	-	-	-	-
P9 915	-	-	-	-	-	-	-	-
P10 85	+	-	-	-	+	+	-	-
P10 130	-	-	-	-	-	-	-	-

Referencias:

Nod +: aislamiento capaz de inducir nodulación; Fix +: aislamientos que generan nódulos rosados; (-) aislamiento de rizobio nativo seleccionado que no fue capaz de nodular y/o fijar nitrógeno en la planta leguminosa indicada.

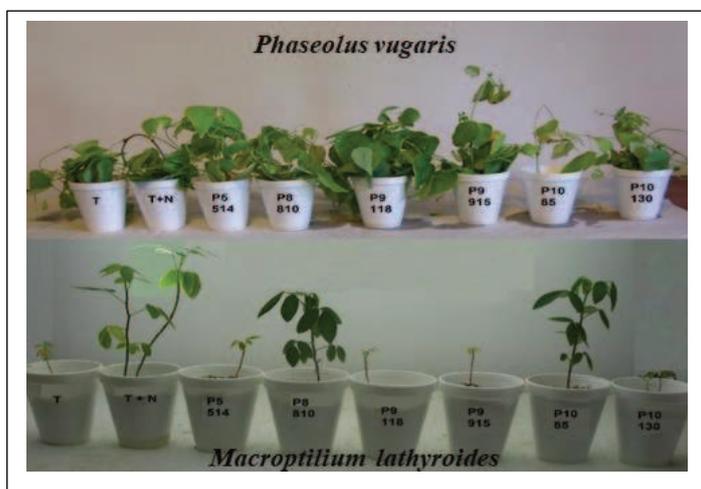


Figura VI.3. Ensayo de inoculación de plantas de *P. vulgaris* y *M. lathyroides* con los aislamientos seleccionados. Las macetas fueron mantenidas en cámara de crecimiento para plantas durante 35 días. Tratamientos: T, control sin nitrógeno y T+N, con 25mg de nitrógeno/maceta como NO₃K.

En la figura VI.3 se muestra el comportamiento de los aislamientos bacterianos en la nutrición nitrogenada de las especies de leguminosas donde hubo respuesta a la inoculación cruzada, *P. vulgaris* y *M. lathyroides*. El desarrollo vegetativo y el aspecto más verde de las plantas se observó en aquellas que recibieron los aislamientos que resultaron en una nodulación y FBN eficiente, y en las que fueron tratadas con nitrógeno mineral. Las plantas del tratamiento control así como las inoculadas con aislamientos ineficientes en la FBN muestran un aspecto clorótico.

Las plantas de *P. vulgaris* inoculadas con el aislamiento P9 118 presentaron una coloración verde intensa y un crecimiento vigoroso en respuesta a una profusa nodulación. La materia seca aérea fue similar al tratamiento testigo nitrogenado presentando diferencias significativas con el control absoluto. La inoculación de *P. vulgaris* con los aislamientos P5 514 y P10 130 (que no nodularon esta especie), generó plantas que presentaron una coloración de las hojas y producción de materia seca aérea similar al tratamiento control nitrogenado y un mayor peso seco radicular, sin mostrar diferencias significativas, lo que sugeriría una posible capacidad PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) de estos rizobios. (Tabla VI.6).

Los resultados obtenidos de la inoculación de las cepas seleccionadas en plantas de *M. lathyroides* mostraron que solo los aislamientos P8 810 y P10 85 indujeron una abundante nodulación efectiva, favoreciendo el desarrollo de las plantas en relación al testigo sin nitrógeno, siendo las diferencias significativas, y presentando una coloración, vigor y peso seco de las plantas similar al tratamiento testigo nitrogenado.

Estos resultados indicarían que entre las bacterias nativas seleccionadas existen aislamientos que presentan capacidades biológicas y compatibilidad simbiótica variables frente a las leguminosas ensayadas. Estos resultados coinciden con diversos estudios que han demostrado una amplia variación en términos de eficiencia simbiótica en cepas de rizobios nativos.

Tabla VI.6. Materia seca aérea, radicular y número de nódulos de las plantas *P. vulgaris* y *M. lathyroides* inoculadas con los aislamientos seleccionados de *D. incanum*, cultivadas en condiciones de cámara de crecimiento de plantas durante 35 días.

<i>Phaseolus vulgaris</i>			<i>Macroptilium lathyroides</i>			
CEPA	Peso seco aéreo (mg/planta)	Peso seco radicular (mg/planta)	Nódulos/ planta	Peso seco aéreo (mg/planta)	Peso seco radicular (mg/planta)	Nódulos/ planta
P5 514	1036,7 ± 46,6 ab	986,7 ± 86,1ab	0 a	10,0 ± 0,2a	25,0 ± 7,1ab	0 a
P8 810	1000,0 ± 28,3ab	375,0 ± 15,7a	7,5 ± 3,0a	290,0 ± 25,5b	100,0 ± 15,3b	100 ± 6c
P9 118	1362,5 ± 63,0b	505,0 ± 36,7a	287 ± 83b	10,0 ± 0,8a	15,0 ± 7,1a	0 a
P9 915	696,7 ± 11,1a	706,7 ± 27,6 a	0 a	16,7 ± 5,8a	13,3 ± 5,8a	0 a
P10 85	426,7 ± 36,0a	553,3 ± 38,4a	10 ± 2a	180,0 ± 11,3b	80,0 ± 5,6ab	31,5 ± 12b
P10 130	1270,0 ± 80,4b	877,5 ± 48,5ab	0 a	13,3 ± 5,8a	10,0 ± 0,1a	0 a
T	876,0 ± 56,5 a	710,0 ± 25,4a	0 a	10,0 ± 0,2a	10,0 ± 0,5a	0 a
TN+N	1220,0 ± 21,2b	645,0 ± 7,1a	0 a	190,0 ± 14,1b	55,0 ± 7,1ab	0 a
NS P ≤ 0,05	<0,0566	<0,7734	<0,0001	<0,0004	<0,011	<0,0001

Referencias:

T: Tratamientos control sin nitrógeno; T+N: Tratamiento con 25mg de nitrógeno/maceta como NO₃K. Cada tratamiento se compone de 4 réplicas de una planta de cada especie por maceta inoculada con 1mL de un cultivo de 10⁸ufc.mL⁻¹ rizobios. Los promedios seguidos de letras diferentes en la misma columna difieren según el test Tukey (P≤0,05). (NS: Nivel de significación P≤0,05).

VI.2.3 Caracterización del comportamiento de aislamientos locales noduladores de *Desmodium incanum* en condiciones de suelo no estéril e invernadero.

Los aislamientos P5 514, P8 810, P9 118, P9 915, P10 85 y P10 130 seleccionados por su destacada efectividad simbiótica en condiciones hidropónicas fueron evaluados en macetas con suelo no estéril en invernáculo con el propósito de elegir posibles candidatos para ser usados como inoculantes de *D. incanum* en Argentina. En la actualidad, no existen estudios sobre la FBN de aislamientos nativos capaces de nodular *D. incanum* en nuestros suelos.

Uno de los puntos más vulnerables de la simbiosis es el propio rizobio que en condiciones de campo deberá presentar una capacidad de adaptación adecuada a las condiciones del medio, crecimiento y eficiencia para la interacción simbiótica en un medio ambiente con características edafoclimáticas propias de cada sitio. En este marco tan complejo, el estudio sobre un suelo real nos permitirá una aproximación inicial para indagar si los aislamientos con buena capacidad de fijar nitrógeno en condiciones óptimas para el proceso simbiótico, son además capaces de competir con las bacterias del suelo y adaptarse a las condiciones físico-químicas del mismo. El suelo elegido fue un argiudol ácuico del Orden Molisoles que es representativo de algunos suelos de las regiones fitogeográficas donde se encontraron las poblaciones de *D. incanum*. Presenta un nivel medio de carbono y nitrógeno orgánico, pH neutro y altos niveles de fósforo asimilable. La técnica del número más probable (NMP) basado en la infección en plantas fue utilizada para estimar el número de rizobios en el suelo (Vincent, 1970). El NMP de la población nativa del suelo presentó en promedio $3,1 \times 10^1$ rizobios .g suelo⁻¹.

Las plantas permanecieron en el invernadero durante 60 días hasta el inicio de la floración. A los 14 días de trasplantadas en macetas fueron inoculadas con cada aislamiento comparando los parámetros observados con dos testigos no inoculados, sin la aplicación de N (T) y suplementado con 240 mg de N mineral como urea (200kg.ha⁻¹ de N) (T+N). Como controles se utilizaron las cepas *R. hainanense* CCBAU 57015^T utilizada en el ensayo de hidroponía y *B. yuanmingense* CCBAU 10071^T aislada de *Lespedeza cuneata* en China (Yao, *et al.* 2002), ya que ambas cepas fueron capaces de inducir la nodulación en plantas de *D. incanum*.

En todos los tratamientos las plantas de *D. incanum* presentaron un rápido crecimiento alcanzando a los 60 días de trasplantadas el inicio de la floración. Se observó la presencia de ramas laterales y el surgimiento de nuevos brotes (Figura VI.4. A y B). Los nódulos estaban distribuidos en todo el sistema radicular como se observa en la figura VI.4 A' y B' a modo de ejemplo para dos de los tratamientos evaluados, Testigo y P10130 respectivamente. Los nódulos mostraron un tamaño variable de 1-2,5 mm de diámetro y forma esférica característica de los nódulos determinados. La estructura desmoides típico de la tribu Desmodieae y de otras especies de las tribus Phaseoleae y Psoraleae estrechamente relacionadas, de distribución tropical y subtropical (Sprent, 2009). La estructura interna de los nódulos maduros estaba formada por la corteza nodular y una zona central que correspondió a la zona infectada. No se observó la presencia de meristema nodular. Los haces vasculares por los que se comunica el nódulo a la raíz también se situaron en la corteza (Figura VI.4. C y D). La zona infectada contenía principalmente y en mayor proporción células del huésped invadidas por el endosimbionte bacteriano, si bien se observaron algunas células no infectadas (Figura VI: E y F). En el interior de las células infectadas se encontrarían las bacterias diferenciadas en bacteroides fijadores de nitrógeno rodeados por una membrana vegetal o simbiosoma. Esta morfología nodular fue similar a la observada en todos los tratamientos evaluados.

Los resultados obtenidos en relación al número y biomasa seca nodular están representados en la Figura VI.5. Observamos que los tratamientos no inoculados, con y sin adición de nitrógeno presentaron nódulos en menor cantidad en relación a los que se observaron en las plantas inoculadas.

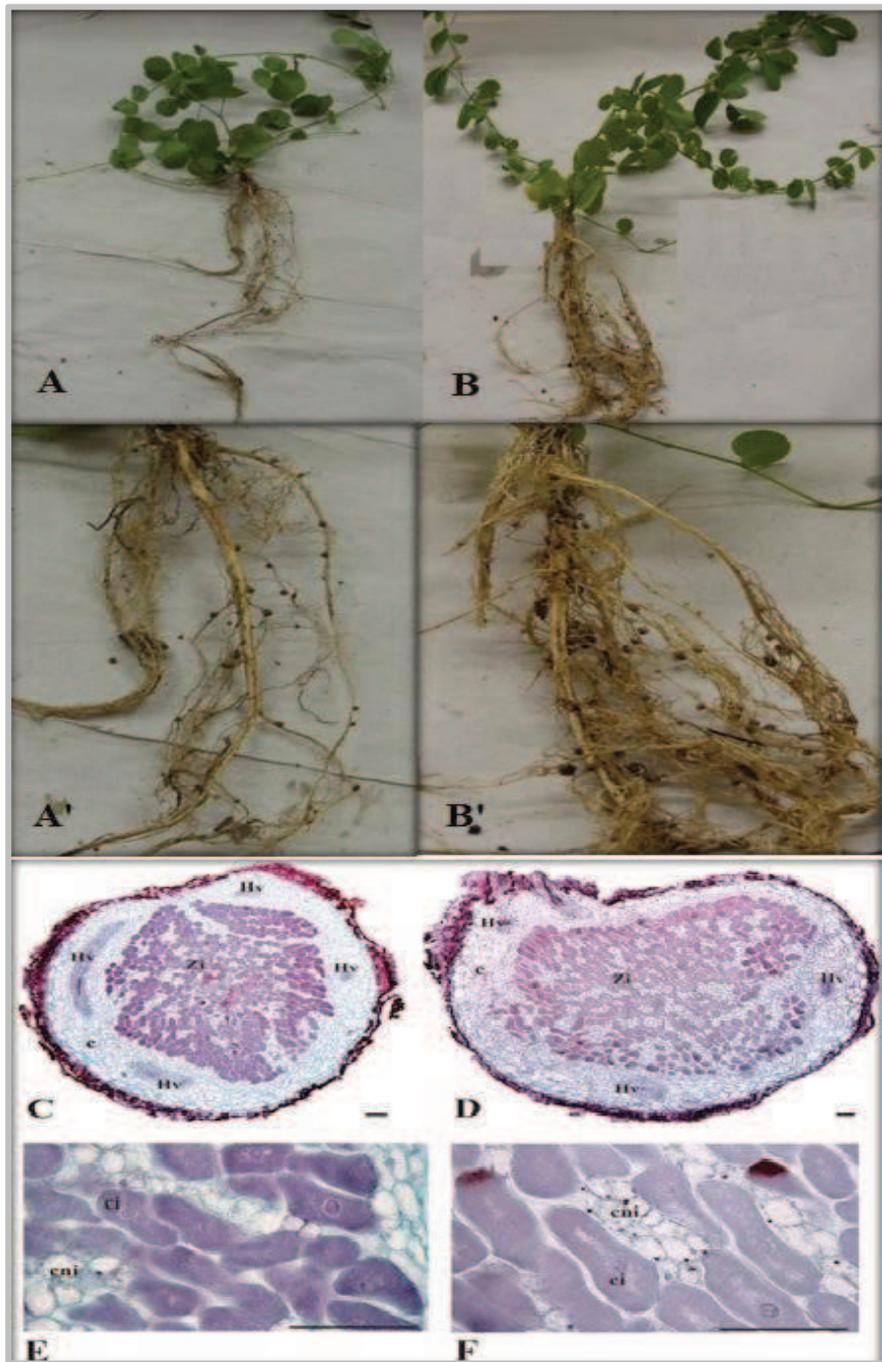


Figura VI.4. Desarrollo de las plantas de *D. incanum* a los 60 días de trasplantadas en macetas con suelo no estéril. **A** tratamiento (T) y **B** inoculado con la cepa (P10 130). Detalle del sistema radicular donde se observa la forma y distribución de los nódulos en la planta. **A'** (T) **B'** (P10 130). Microfotografía con microscopio óptico de sección de nódulo completo esférico, teñido con safranina-fast Green. **C** (T) y **D** (P10 130). El corte permite observar en detalle la ausencia del tejido meristemático en un nódulo maduro típico determinado. Se muestra la corteza nodular (**c**) y los haces vasculares (**Hv**) en la periferia del nódulo y la localización de la zona de infección (**Zi**) en el centro nodular. **E** y **F**: vista ampliada de la zona de infección donde se observan las células infectadas (**ci**) conteniendo numerosos simbiosomas, y células no infectadas (**cni**) del huésped. Las barras representan 100µm.

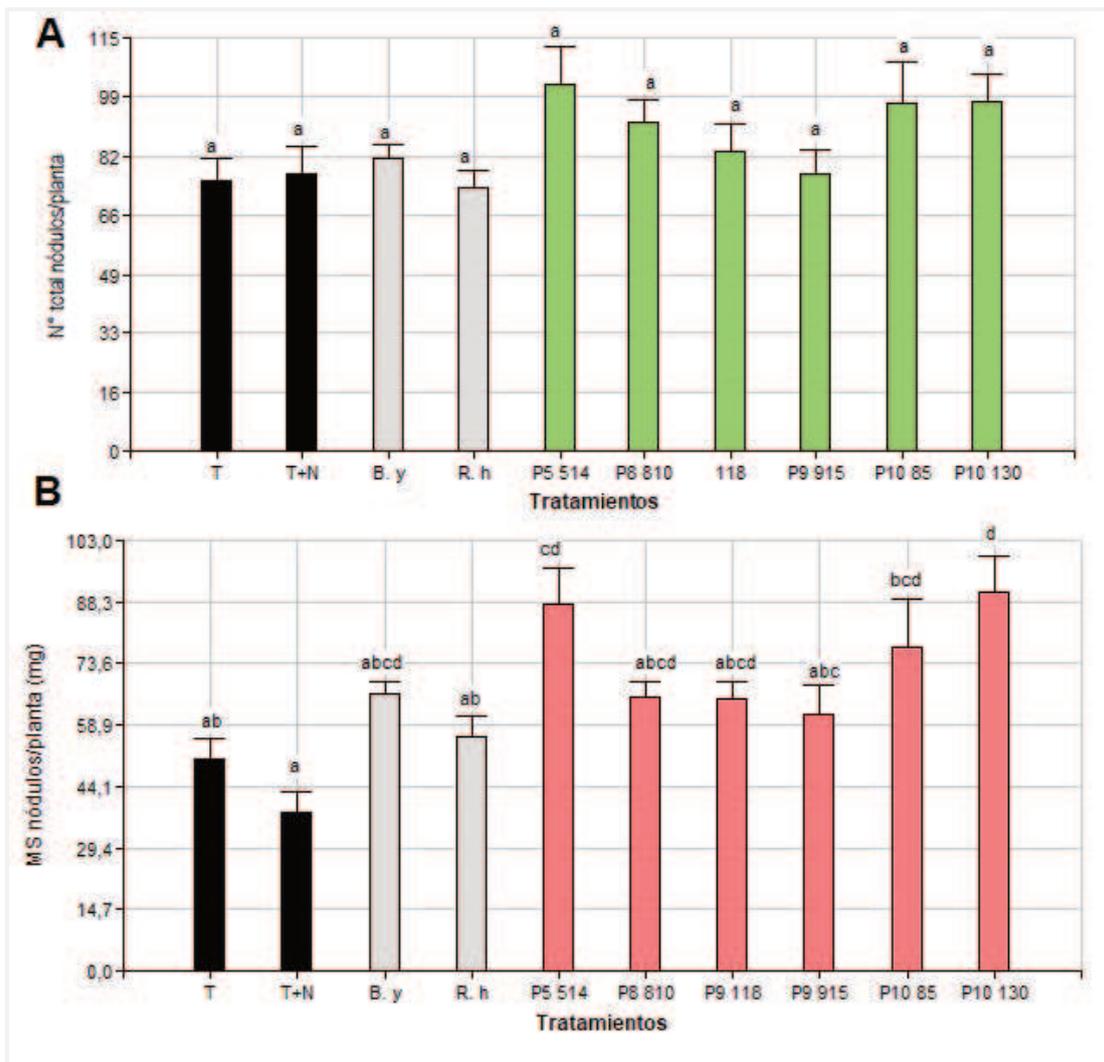


Figura VI.5. Efecto de los tratamientos de inoculación sobre el número y peso seco de nódulos de *D. incanum* cuando crecieron en macetas con suelo no estéril. **A:** Número de nódulos **B:** Masa seca nodular. Cada tratamiento se compone de 6 réplicas, 18 plantas por tratamiento inoculada con 10mL de un cultivo de 10^9 ufc.mL⁻¹ rizobios. T: tratamiento control sin inóculo bacteriano; T+N: plantas sin inoculación con el agregado de 240 mg de nitrógeno/maceta como urea. R.h: *R. hainanense* CCBAU 57015^T; B.y: *B. yuanmingense* CCBAU 10071^T Los promedios con letras diferentes sobre las columnas difieren según el test Tukey ($P \leq 0,05$)

El promedio de número de nódulos por planta no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ensayados (Figura VI.5 A). Se observó la aparición de nódulos en los tratamientos T y T+N y se observó que el aumento del contenido de nitrógeno del suelo por la incorporación de nitrógeno mineral, afectó significativamente el peso seco de los nódulos generados por la población nativa.

En la Figura VI.5.B observamos la masa seca nodular por planta en los tratamientos evaluados. El peso seco de los nódulos en las plantas inoculadas con los aislamientos P5 514, P10 85 y P10 130 fue superior a los demás tratamientos, siendo las diferencias significativas, y los valores promedio fueron 87,94 mg, 77,46 mg y 90,56 mg por planta respectivamente. Valores intermedios de masa nodular presentaron los tratamientos P8 810, P9 118, P9 915 y el inoculado con la cepa *B. yuanmingense* CCBAU 10071^T. Estas fueron superiores a las encontradas en el tratamiento inoculados con la cepa *R. hainanense* CCBAU 57015^T 56, 02mg.planta⁻¹ y en los tratamientos T 50,58mg.planta⁻¹ y T+N 37,75mg.planta⁻¹.

Los resultados de producción de materia seca de las plantas en las condiciones en que se realizó el ensayo se observan en la Figura VI.6. El tratamiento control T proporcionó una menor acumulación de biomasa seca aérea de las plantas probablemente debido a la menor eficiencia simbiótica de los rizobios nativos del suelo, mientras que la inoculación con los aislamientos seleccionados y la fertilización mineral con nitrógeno, proporcionaron un incremento en la producción de biomasa seca aérea de las plantas de *D. incanum*. El tratamiento inoculado con el aislamiento P10 130 además de presentar la mayor biomasa nodular fue capaz de incrementar significativamente el peso seco aéreo y radicular de las plantas en comparación con el testigo no inoculado. También aumentó el peso seco de las plantas cuando se lo comparó con el tratamiento T+N y con los tratamientos inoculados con las cepas control *B. yuanmingense* CCBAU 10071^T y *R. hainanense* CCBAU 57015^T (Figura VI.6 A y B). El mayor rendimiento de la materia seca obtenida por la inoculación con el aislamiento P10 130 fue en promedio 2.664 mg.planta⁻¹ mientras que en los tratamientos control sin inocular fueron 1.497 mg.planta⁻¹ el testigo y 2.292 mg.planta⁻¹ T+N. La biomasa aérea de las plantas de los tratamientos inoculados con los restantes aislamientos seleccionados fue en promedio, un 20% superior al T si bien no presentaron diferencias significativas.

Estos resultados se corroboraron con los análisis de correlación y regresión. La materia seca aérea de las plantas correlacionó positivamente con el peso total de nódulos $r=0,72$). Al relacionar la MS aérea de las plantas y la MS de los nódulos se determinó una relación estadísticamente significativa y positiva ($p<0.0001$) entre las variables (Figura VI.7.A) lo que permitiría utilizarlo como un criterio más para la selección de cepas. Cuando relacionamos la masa nodular con el contenido de nitrógeno total en las plantas los resultados fueron estadísticamente significativos.

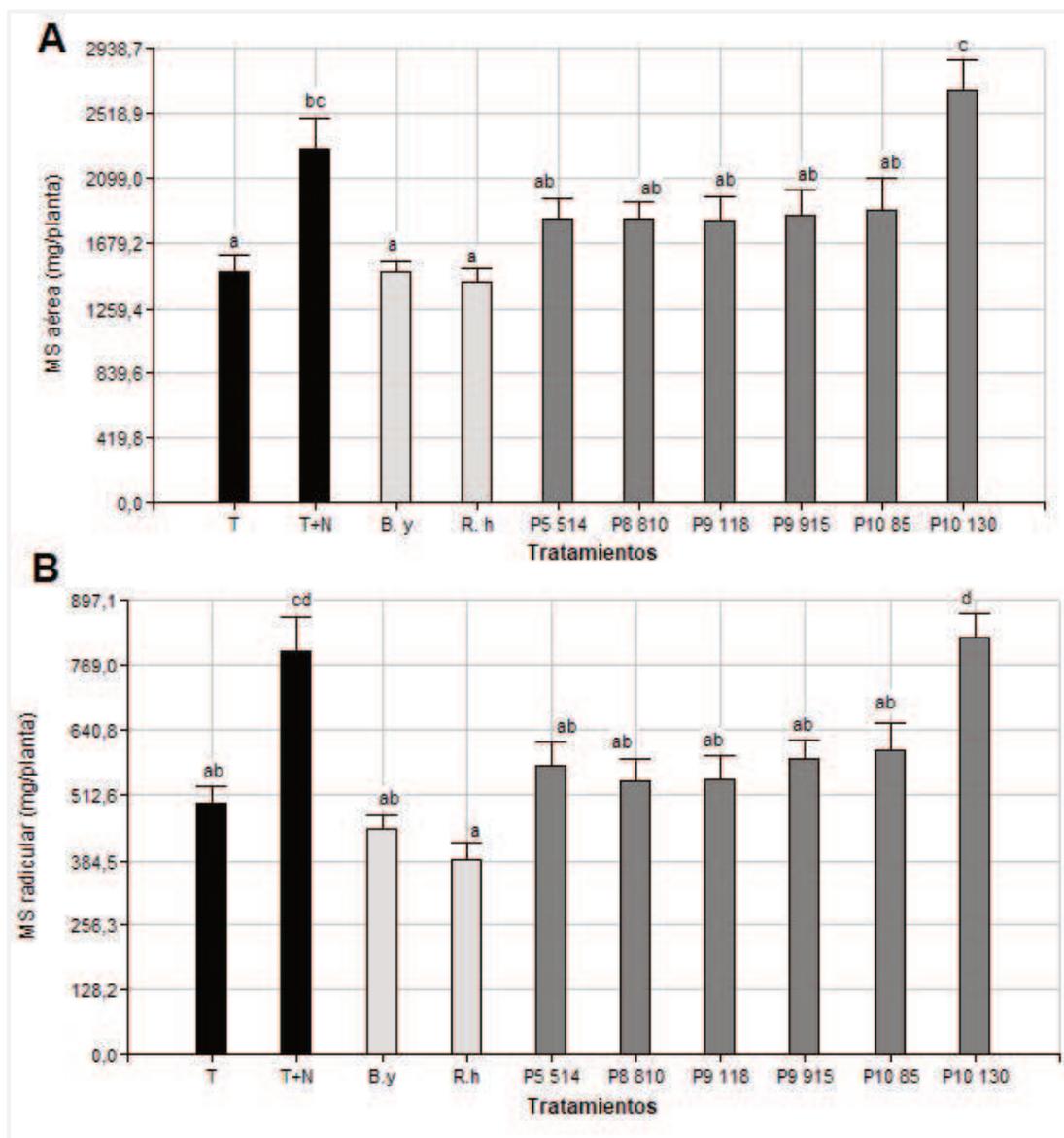


Figura VI.6. Efecto de los tratamientos de inoculación sobre el peso seco de las plantas de *D. incanum* cuando crecieron en macetas con suelo no estéril. **A:** Masa seca aérea **B:** Masa seca radicular. Cada tratamiento se compone de 6 réplicas, 18 plantas por tratamiento inoculada con 10 mL de un cultivo de 10^9 ufc.mL⁻¹ rizobios. T: tratamiento control sin inóculo bacteriano; T+N: plantas sin inoculación con el agregado de 240 mg de nitrógeno/maceta como urea. R.h: *R. hainanense* CCBAU 57015^T; B.y: *B. yuanmingense* CCBAU 10071^T. Los promedios con letras diferentes sobre las columnas difieren según el test Tukey ($P \leq 0,05$)

Por cada miligramo de masa nodular la cantidad de N total en la parte aérea por planta incrementó 20,52 mg (Figura VI.5.B). En consecuencia, se observó que la cantidad acumulada de nitrógeno por planta estaba significativamente relacionada con la masa seca de los nódulos y con la biomasa aérea vegetal ($R^2=0,52$).

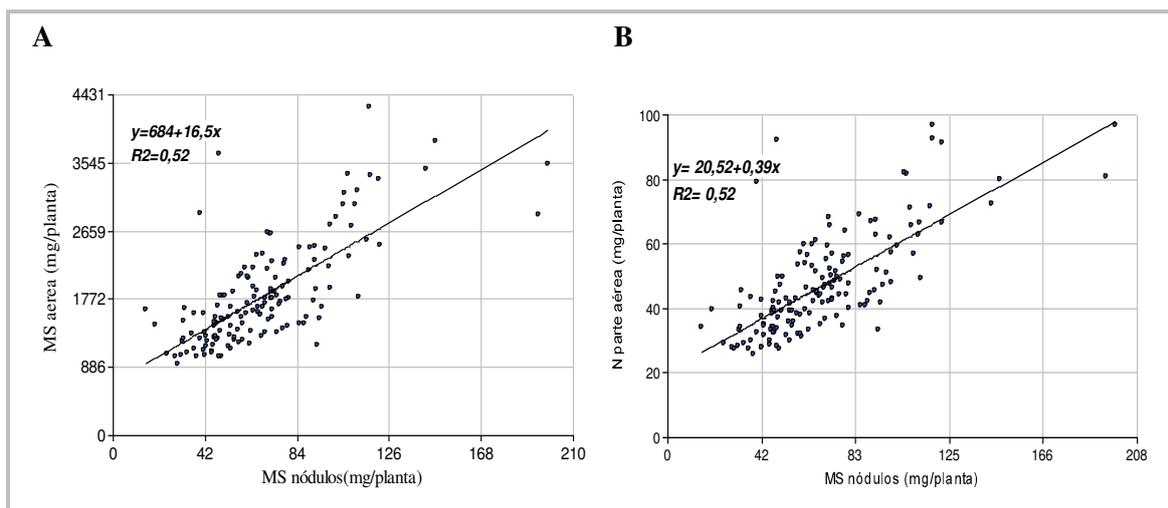


Figura VI.7. **A.** Relación entre la masa seca nodular y la masa seca aérea de las plantas. **B.** Relación entre la masa seca nodular y el nitrógeno total acumulado en la parte aérea de las plantas. Se analizaron plantas de *D. incanum* provenientes de los tratamientos inoculados con las cepas seleccionadas y de referencia en plantas en suelo no estéril en invernadero (N= 165).

En la tabla VI.7 se presentan los resultados del contenido de N en las plantas de *D. incanum* cuando fueron inoculadas con los aislamientos seleccionados en suelo no estéril. Si bien no se observaron diferencias significativas, los tratamientos de inoculación aumentaron el nivel de N en las plantas, por lo tanto, el nitrógeno total acumulado en la parte aérea mantuvo la misma tendencia observada para la producción de materia seca y biomasa nodular. En el tratamiento P10 130 las plantas de *D. incanum* presentaron los valores más altos de nitrógeno total acumulado y los tratamientos inoculados con los aislamientos P5 514 y P10 85 también fueron superiores al T+N. La inoculación con las cepas control *B. yuanmingense* y *R. hainanense* fueron los tratamientos que presentaron menor respuesta, con contenidos de N acumulado en las plantas semejante al tratamiento T probablemente por una baja adaptación a las condiciones del ensayo. Relacionado con esta variable, los índices de eficiencia relativa calculados para los tratamientos inoculados (Tabla VI.7) fueron muy variables, la inoculación con la cepa P10 130 mostró el índice más alto (153%) mientras que los más bajos se observaron en los tratamientos donde se inocularon las cepas tipo, *B. yuanmingense* CCBAU 10071^T (7,3%), y *R. hainanense* CCBAU 57015^T la cual arrojó un valor negativo, corroborando la baja eficiencia simbiótica de estas cepas cuando se inoculan en plantas de *D. incanum*. Estas observaciones son coincidentes con los resultados de materia seca aérea y radicular de las plantas y el comportamiento simbiótico ineficiente en hidroponía, que hemos previamente discutido en este capítulo.

Tabla VI.7. Contenido de nitrógeno. Nitrógeno total acumulado en la parte aérea de las plantas e índice de eficiencia relativa (ER) en la fijación de nitrógeno en plantas de *D. incanum* crecidas en macetas con suelo no estéril e inoculadas con las cepas indicadas.

Tratamiento	N en la biomasa aérea (%)	N total acumulado en la biomasa aérea (mg.planta ⁻¹)	ER (%)
P5 514	2,82	51,91 ± 14,3ab	110,4
P8 810	2,60	47,72 ± 12,4ab	67,7
P9 118	2,51	45,89 ± 16,0ab	49,0
P9 915	2,74	50,96 ± 18,7ab	100,7
P10 85	2,74	52,01 ± 17,9ab	111,4
P10 130	2,09	56,12 ± 18,1 b	153,0
<i>B. yuanmingense</i>	2,80	41,80 ± 8,18ab	7,3
<i>R. hainanense</i>	2,68	38,30 ± 10,1a	-28,3
T	2,74	41,08 ± 11,8ab	-
T+N	2,22	50,89 ± 17,6ab	100

Referencias:

T: Tratamientos control sin nitrógeno; T+N: Tratamiento con 240mg de nitrógeno/maceta como urea. Cada tratamiento se compone de 6 réplicas, 18 plantas por tratamiento inoculadas con 10 mL de un cultivo de 10⁹ufc.mL⁻¹ rizobios. R.h: *R. hainanense* CCBAU 57015^T; B.y: *B. yuanmingense* CCBAU 10071^T. Los promedios seguidos de letras diferentes en la misma columna difieren según el test Tukey (P≤0,05)

Teniendo en cuenta el contenido de nitrógeno (%) en la biomasa aérea de las plantas (Tabla VI.7), los valores de proteína bruta (PB) calculados oscilaron entre 16% y 17,6% salvo en el tratamiento inoculado con la cepa P10 130 y en T+N con un porcentaje de PB 13,1% y 13,8% respectivamente. Estos porcentajes más bajos podrían deberse a que las plantas mostraron una mayor proporción de tallos más gruesos. De acuerdo a lo informado por Marques & Paim, (1993), en *D. incanum* el contenido de PB en los tallos de las plantas (9,68%) fue un 7% inferior al de las hojas (14,97%) en el estado de prefloración.

Los resultados presentados aquí revelaron que el aislamiento P10 130 en suelo no estéril se destaca por promover un crecimiento aéreo y radicular de las plantas de *D. incanum* significativamente mayor que el resto de los tratamientos inoculados y superior al observado en las plantas control fertilizadas con N mineral. La actividad promotora del

crecimiento de las plantas de este aislamiento podría incluir no solo la fijación simbiótica de nitrógeno sino también propiedades adicionales tales como la producción de fitohormonas o solubilización de fosfatos, como se ha informado en otras cepas de *Bradyrhizobium*. Asimismo, las cepas P5 514 y P10 85 presentaron mayor biomasa nodular y mayor acumulación de N que el tratamiento fertilizado.

En consecuencia, el rendimiento simbiótico de los rizobios nativos parece estar relacionado con las características específicas de cada aislamiento, y no con su composición genética general, ya que aislamientos con diferentes propiedades simbióticas se agruparon en el mismo grupo del cladograma 16S rRNA por ejemplo P5 505, P5 514, P9 118, P9 904, P9 907 y P10 130 y los aislamientos P5 501, P10 85 y P10 102 o P5 97, P8 802 y P8 810.

En el presente capítulo hemos investigado las propiedades simbióticas de los rizobios asociados a plantas de *D. incanum* seleccionados por sus características fenotípicas y diversidad genética provenientes de diferentes sitios del centro y norte de Argentina. En primer lugar se realizó en cámaras de crecimiento un experimento de inoculación en medio para plantas libre de nitrógeno para comparar la eficiencia simbiótica de los dieciséis aislamientos seleccionados. Los resultados mostraron que todos los aislamientos fueron capaces de sobrellevar el crecimiento de las plantas en ausencia de una fuente de nitrógeno mineral, y un grupo de ellos produjo mayor peso seco en comparación con las plantas fertilizadas con nitrógeno en respuesta al incremento del número y masa nodular (Tabla 1, 2, 3 y 4), siendo una fuerte indicación de su eficiencia simbiótica. Resultados similares encontraron Granada *et al.* (2014) y Crosa *et al.* (1999) quienes informaron que aislamientos rizobianos capaces de nodular *D. incanum* produjeron mayor producción de materia seca aérea y radicular de las plantas. Asimismo, Hassen *et al.* (2014) mostraron que aislamientos obtenidos de *D. uncinatum* incrementaron significativamente la nodulación y materia seca de dichas plantas.

Además, en estos ensayos evidenciamos una respuesta simbiótica variable en las poblaciones o ecotipos de esta leguminosa nativa como también lo mencionó en su trabajo Crosa *et al.* (1999). Por otro lado relacionado a la cepa de referencia utilizada *R. hainanense* CCBAU 57015^T, estudios realizados por Chen *et al.* (1997) mostraron que la cepa podía nodular *D. sinuatum* (de dónde había sido aislada) y presentaba un fenotipo

nod con otros miembros de su grupo como por ejemplo *D. triquetrum*, *D. gyroides*, *D. heterophyllum* y *Macroptillum lathyroides*. Nosotros observamos un comportamiento similar en los ensayos de fijación simbiótica de nitrógeno en cultivos axénicos, donde la inoculación con esta cepa en las diferentes poblaciones de plantas de *D. incanum* ensayadas generó una nodulación baja o nula. Similares resultados mostraron Gu *et al.* (2007) al estudiar la diversidad genética de rizobios asociados a especies de *Desmodium* que crecen en China.

Los aislamientos P5 514, P5 505, P9 118, P9 904, P9 907 y P10 130, que provienen de distintas zonas geográficas del país, conforman un grupo de aislamientos que se destacó por su capacidad simbiótica y de acuerdo a los resultados detallados en el capítulo V de esta tesis, se hayan filogenéticamente relacionadas a la especie *B. yuanmingense*. Estudios realizados por Sarr *et al.* (2016) sobre rizobios asociados a *Pueraria phaseoloides* y *Vigna unguiculata* identificaron cepas de rizobios con altos potenciales de fijación de nitrógeno, clasificadas como *B. yuanmingense*, y encontraron que independientemente de la zona geográfica o planta huésped, podían albergar genes *nif* más eficientes capaces de contribuir con FBN superiores (Sarr *et al.* 2009; Appunu, *et al.* 2009). Los aislamientos P9 915 y P10 85 también mostraron efectos pronunciados sobre la producción de la materia seca y nodulación, mientras que el aislamiento P10 117 asignado al género *Rhizobium*, no promovió el crecimiento de las plantas, siendo similar al tratamiento control absoluto, observando entonces que las dos cepas de crecimiento rápido analizadas resultaron ineficientes (*fix*⁻) en esta leguminosa. Resultados similares encontraron Baraúna *et al.* (2014) al estudiar la diversidad y eficiencia en la fijación de N de rizobios aislados de nódulos de *Centrolobium paraense*, y Chibebaa *et al.* (2017) al seleccionar cepas de rizobios indígenas con alto potencial para el cultivo de soja en Mozambique. Por otro lado estudios realizados por Parker *et al.* (2015) utilizando distintas especies de *Desmodium* mostraron que el número y tamaño de los nódulos, así como la biomasa de las plantas variaron significativamente cuando las especies de *Desmodium* fueron inoculadas con seis cepas de *Bradyrhizobium* que representaron diferentes linajes.

En los ensayos realizados para estimar la FBN (en macetas con soporte estéril y solución mineral libre de nitrógeno), las diferencias entre los tratamientos fueron tales que permitieron identificar seis aislamientos de *Bradyrhizobium* superiores en los parámetros evaluados (P5 514, P8 810, P9 118, P9 915, P10 85 y P10 130) que provenían de distintas regiones edafoclimáticas del centro y norte de Argentina.

Para investigar las propiedades simbióticas de estos seis aislamientos, se estudió la nodulación cruzada en cuatro especies de leguminosas tropicales. Todos los rizobios analizados fueron incapaces de nodular *Vicia sativa* por ser un huésped restrictivo (Álvarez-Martínez *et al.* 2009). Por el contrario *Macropodium lathyroides* y *Phaseolus vulgaris* de la tribu Phaeoleae son noduladas por rizobios de diferentes géneros dentro de las alfa y beta proteobacterias (Martínez-Romero 2003; Elliott *et al.* 2009; Guimãraes *et al.* 2012). Particularmente *P. vulgaris* es altamente promiscuo para la nodulación y fijación de nitrógeno con rizobios de crecimiento rápido y en general no es nodulado eficientemente por rizobios de crecimiento lento (Brownfield *et al.* 1990; Michiels *et al.* 1998; Bala *et al.* 2001), sin embargo la cepa P9 118 (identificada como *B. yuanmingense*, ver Capítulo V, sección V.2.3.1.) mostró en *Phaseolus vulgaris* una nodulación abundante, con plantas que desarrollaron una coloración verde intensa, un crecimiento vigoroso y la materia seca aérea fue similar al tratamiento testigo nitrogenado de esa especie. Resultados similares mostraron Gu *et al.* (2007) que aislaron cepas de crecimiento lento de *Desmodium* capaces de nodular eficientemente *P. vulgaris*, y que también nodularon *Glicine max* aunque en estas plantas la FBN fue ineficiente. En nuestro trabajo, ninguno de los aislamientos evaluados fue capaz de nodular plantas de *G. max*. Los aislamientos P8 810 y P10 85 presentaron un comportamiento simbiótico similar a las cepas *B. embrapense* CNPSo2833^T aislada de *Desmodium heterocarpon* y *B. tropiciagri* CNPSo1112^T aislada de *Neonotonia wightii* CIAT Colombia (soja peremne) (Delamuta *et al.* 2015). Estas cepas resultaron capaces de nodular y fijar nitrógeno en *M. lathyroides*, generaron nódulos pequeños y blancos en *P. vulgaris* y no nodularon soja. Por el contrario, los aislamientos P5 514, P10 130 y P9 915 mostraron especificidad más restringida ya que solo nodularon con la planta de la cual fueron aislados. Estos resultados concuerdan con los informados por Crosa *et al.* (1999) donde cepas de rizobios aisladas de *D. incanum* en Uruguay solo nodularon dos ecotipos de la leguminosa huésped y no nodularon otras leguminosas nativas o introducidas.

Andrews & Andrews (2017) mostraron que especies del género *Desmodium* podían ser noduladas por distintos géneros de rizobios: *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* y *Pararhizobium*. Cuando una leguminosa se asocia a múltiples linajes bacterianos, es muy poco probable que cada linaje le confiera iguales beneficios simbióticos (Parker *et al.* 2015). En este sentido, los hallazgos obtenidos en nuestro estudio revelaron que *D. incanum* exhibió cierto grado de promiscuidad simbiótica ya que

fue nodulado por rizobios de diversas especies pertenecientes mayoritariamente al género *Bradyrhizobium* y en menor proporción a *Rhizobium*.

Con el fin de avanzar en el estudio de los aislamientos seleccionados, analizamos su comportamiento en suelo no estéril. La fertilidad natural del suelo y particularmente el alto contenido de fósforo asimilable (18,2 ppm) favoreció el óptimo desarrollo de las plantas en invernadero. Estudios previos han informado que el fósforo es uno de los principales nutrientes limitantes en el establecimiento de pasturas leguminosas, y se ha demostrado que el aumento de la disponibilidad de fósforo en el suelo estimula la nodulación e incrementa la materia seca de las plantas en especies de *Desmodium* (Ogola *et al.* 2012; Silva *et al.* 200¹; Haque *et al.* 1995; Ridzwan & Othman 1982). El suelo utilizado tenía una alta disponibilidad de potasio (555 ppm) y azufre (11,2 ppm) para el desarrollo y nodulación de las plantas. Divito & Sadras (2014) en un trabajo de revisión del efecto de los nutrientes fósforo, azufre y potasio sobre el crecimiento de las plantas y la FBN en cultivos y pasturas de leguminosas, mostraron que las deficiencias de estos nutrientes reducen el crecimiento, número y masa de los nódulos, la masa aérea de las plantas y principalmente la FBN.

La población de rizobios del suelo muestreado, del orden de $3,1 \times 10^1$ células viables de rizobios .g suelo⁻¹, indicó la presencia de rizobios nativos compatibles con *D. incanum*. Existen reportes que indican que la presencia de la planta huésped, factores como la temperatura, humedad, contenido de materia orgánica y pH del suelo, condicionan la población nativa (Woomer *et al.*, 1988; Atemkeng & Begoude 2014). En nuestro estudio la escasa presencia de leguminosas y particularmente la ausencia de la leguminosa huésped en el sitio de muestreo podría ser el factor que más se relacionó con la baja población de rizobios encontrada en el suelo. Varios investigadores mencionaron que cuando la población de rizobios naturalizados en el suelo es alta (mayor a 10^3 bacterias.g suelo⁻¹) la introducción de nuevas cepas puede ser muy dificultosa (Thies *et al.* 1991; Brockwel *et al.* 1995^a). Sin embargo la inoculación con las cepas seleccionadas mostró respuestas positivas en los parámetros evaluados. La inoculación con el aislamiento P10 130 promovió un incremento significativo de la biomasa aérea de las plantas en comparación con el resto de los tratamientos inoculados, las cepas de referencia y el control absoluto, y tan alto como el observado en las plantas control con fertilizante nitrogenado. Además, el análisis del peso radicular permitió detectar un efecto promotor del desarrollo radicular en este aislamiento que también se observó cuando se inoculó *Phaseolus vulgaris* pese a su incapacidad para nodular esta especie. Si bien no conocemos

los mecanismos que operan aquí, es posible que P10 130 sea capaz de producir una ó más fitohormonas, o solubilización de fosfatos como se ha informado para otros rizobios. La capacidad de los rizobios de sintetizar estas hormonas y regular muchos aspectos de la fisiología de la planta que le permita resistir estreses bióticos y abióticos está ampliamente documentada en la literatura. Granada *et al.* (2014) mostraron que la producción de compuestos indólicos fue la característica más común entre aislamientos noduladores de *D. incanum* y especies de *Lotus*, que se reflejaron en el crecimiento de las plantas. Asimismo, Menezes *et al.* (2016) informaron la capacidad de los rizobios de producir fitohormonas, como el ácido indol acético en bacterias que nodulan *Erythrina velutina* en suelos forestales del noreste de Brasil.

La similitud estadística entre los tratamientos inoculados y no inoculados con respecto al número de nódulos indicó que la comunidad rizobiana presente en el suelo utilizado para este experimento fue capaz de nodular abundantemente *D. incanum*. si bien en los tratamientos testigos se observó menor masa nodular principalmente cuando se fertilizó con N. Varios autores han demostrado que el NO_3^- , NH_4^+ y urea influyen tanto en el proceso de infección como en la FBN. Concentraciones mayores a 10 mM resultan inhibitorias de la nodulación (Waterer & Vessey, 1993). Un efecto similar de reducción de la masa nodular se observó en plantas de *Arachis hipogaea* en el tratamiento con aplicación de N mineral, en un estudio sobre la efectividad de rizobios nativos aislados de suelos de Brasil (Etiene *et al.*, 2005). Los valores significativamente más altos de masa seca nodular se observaron en los tratamientos inoculados con las cepas P5 514, P10 85 y P10 130 lo que demostró la capacidad de estos aislamientos para establecer simbiosis eficientes con *D. incanum*. De acuerdo a lo informado por Ngwu (2005) en *Desmodium ramississimon* y *Vigna unquiculata*, la cantidad de nitrógeno biológicamente fijado es una función de la masa nodular. Asimismo, la inoculación con estas cepas indujo un mayor contenido de nitrógeno acumulado en la materia seca de las plantas (mg N/planta) de *D. incanum*, siendo hasta un 37% superior en la inoculación con la cepa P10 130 en relación al tratamiento T sin diferir estadísticamente entre tratamientos, lo que indicaría la presencia de una población nativa eficiente en FBN. Santos *et al.* (2014) estudiaron el crecimiento y la composición mineral de tres leguminosas forrajeras tropicales, entre las que se encontraba *D. heterocarpon* subsp. *ovalifolium* y obtuvieron resultados similares a los hallados en nuestro trabajo. Al evaluar el efecto de la inoculación con cepas de *Rhizobium* sp., rizobios nativos y la fertilización nitrogenada sobre estas plantas crecidas

en macetas con suelo no estéril, encontraron que tanto los rizobios nativos como los inoculados suministraron nitrógeno a la planta y aumentaron la materia seca, masa nodular y el contenido de PB con valores promedio del 15%, mientras que en nuestro estudio en los tratamientos inoculados los contenidos de PB en las plantas de *D. incanum* oscilaron entre el 16% y 17%. La fertilización con sulfato de amonio causó una ligera reducción en los parámetros evaluados, mientras que en nuestro trabajo la fertilización con urea solo produjo una significativa reducción de la biomasa nodular. Por otro lado, Alves *et al.* (2000) con el objetivo de investigar la aplicación de la técnica de abundancia relativa de ureídos y compararla con la técnica de dilución de isótopos N¹⁵, cuantificaron la contribución de la FBN a la leguminosa forrajera *D. ovalifolium* y otras especies no leguminosas. Uno de los ensayos fue realizado en macetas con suelo no estéril y contó con los siguientes tratamientos: no inoculado, inoculado con una mezcla de cepas *Bradyrhizobium sp.*, o con dosis crecientes de nitrógeno marcado. Encontraron que la materia seca de las plantas en los tratamientos inoculados y no inoculados no fue significativamente afectada por la proporción de N agregado, sugiriendo que donde la proporción de N del suelo fue menor, la FBN compensó ese déficit. Además no disminuyó el peso seco de los nódulos en dosis altas de N y tampoco se evidenció una respuesta significativa a la inoculación en la masa nodular ni en el nitrógeno total acumulado. Esto indicó que hubo una población de rizobios capaces de nodular esta especie en el suelo ensayado. La falta de respuesta a la inoculación podría deberse a una menor eficiencia simbiótica de las cepas o bien a la competencia con los rizobios nativos por ocupar el nicho simbiótico. Alguna de estas causas podría explicar los resultados de la inoculación con las cepas de referencia y algunos de los aislamientos evaluados en nuestro trabajo. Además estos autores pudieron evidenciar que hubo un incremento muy pequeño del N total acumulado en las plantas de *D. ovalifolium* y una gran proporción del N derivó de la FBN.

Los resultados detallados en este trabajo nos permiten proponer futuros estudios a fin de avanzar en la selección de simbioses de *D. incanum*. En particular, la cepa P10 130 demostró tener una destacada eficiencia simbiótica y la capacidad de promover el crecimiento vegetal. Además, en base a su rendimiento simbiótico, podemos seleccionar los aislamientos P5 514 y P10 85 para futuros experimentos. A partir de estas evidencias será importante evaluar si el comportamiento de estos rizobios a campo refleja los resultados que hemos observado en el laboratorio.

La concepción de estrategias de desarrollo sustentable para nuestro país requerirá del diseño y obtención de bioinoculantes que permitan cubrir diversas insuficiencias nutricionales del suelo y que además sean capaces de adaptarse y persistir bajo diferentes esquemas de prácticas agropecuarias. Los resultados de este trabajo indican que existen vastas posibilidades para incrementar significativamente la FBN en *D. incanum* gracias a la selección de cepas rizobianas adecuadas adaptadas a las condiciones edafoclimáticas del centro y norte de Argentina y eficientes en la FBN.

Tesis Doctoral - Toniutti María Antonieta

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

En la introducción de esta Tesis hemos mencionado que la FBN es la responsable del 65% del N biológicamente disponible que ingresa en los ecosistemas terrestres, y que puede ser utilizado por las plantas, contribuyendo a la mejora y productividad de los cultivos. Asimismo, resaltamos la importancia económica que tiene el cultivo de leguminosas forrajeras en nuestro país, como así también su alto requerimiento de N. Con el propósito de que la planta pueda obtener este nutriente del aire, se utiliza la biofertilización con rizobios eficientes para asociarse con ella y fijar N₂. Para que esta estrategia genere una respuesta significativa en el rendimiento, diversos factores deben conjugarse. El resultado de la biofertilización (y del proceso simbiótico) depende de factores diversos tales como la planta, los rizobios y el suelo, incluyendo su microbiota, sus características intrínsecas (estructura, pH, iones, etc.) y su heterogeneidad, expresada en variedad de nichos ecológicos. Esto lo vuelve un sistema complejo de estudiar. Particularmente, dentro del ecosistema del suelo van a estar presentes poblaciones de rizobios alóctonos, que van a estar compitiendo por la nodulación de *D. incanum* con los rizobios de un potencial inoculante. En tal sentido, creemos que es de vital importancia poder caracterizar los simbioses locales, como etapa inicial para mejorar la eficiencia de la relación simbiótica entre el inoculante y el cultivo de *D. incanum*.

En Argentina los pastizales nativos del Centro y Norte del país son la fuente principal de alimentos para el ganado, presentan una importante variación de especies, principalmente gramíneas y leguminosas. El beneficio de estas últimas a la productividad resulta no solo en mejorar el valor proteico de la dieta animal cuando es consumida mejorando así la producción ganadera extensiva, sino también el nitrógeno transferido a la gramínea en forma indirecta por muerte de sus raíces y directamente a través del nitrógeno fijado. Como ya hemos mencionado, en particular el género *Desmodium* se reconoce por su capacidad para adaptarse a un amplio rango de suelos y climas. Varias especies, entre las que se encuentra *D. incanum*, se destacan por su importancia como plantas forrajeras, su capacidad de fijar nitrógeno en asociación simbiótica con rizobios y su calidad de forraje. En este contexto, el estudio de la biodiversidad de rizobios noduladores de *D. incanum* es importante no solo por su papel como microsimbioses de leguminosas con potencial forrajero, sino también por su importancia como factor biótico para el establecimiento de especies de *Desmodium* en nuestros suelos.

Muy poco se ha estudiado acerca de los rizobios simbioses que se asocian con estas leguminosas. Estudios pioneros de Parker (1999) informaron el aislamiento de bacterias de nódulos de raíz de *D. glutinosum*, una leguminosa herbácea común en el este de América del Norte, e indicaron que albergaban genotipos similares a *B. japonicum*. Sin embargo, estas bacterias estaban estrechamente relacionadas con *B. elkanii* en términos de alelos de genes simbióticos y comportamiento en vida libre. Posteriormente, Gu *et al* (2007) avanzaron en la caracterización de rizobios de nódulos recuperados de nueve especies nativas de *Desmodium* cultivadas en regiones templadas y subtropicales de China. Estos autores encontraron que más del 70% de los aislamientos se identificaron como *Bradyrhizobium* de crecimiento lento, muy relacionado con *B. elkanii*, *B. japonicum* y *B. yuanmingense*, aunque también encontraron algunas cepas asociadas a *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*. En nuestro continente, Granada *et al* (2014) estudiaron la diversidad genética de aislamientos de rizobios noduladores de *D. incanum* recolectados en Brasil y recientemente, Xu *et al* (2016) analizaron 34 cepas de rizobios obtenidos a partir de nódulos de raíz de cuatro especies de *Desmodium* silvestre encontradas en China que informaron la presencia de aislamientos de *Rhizobium*, *Pararhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* y un alto nivel de diversidad. Los estudios mencionados se realizaron en suelos de otros países/continentes, cuyas características edáficas no necesariamente coinciden con las nuestras siendo escasos los estudios de esta especie en la República Argentina. Hace unos años, con el fin de avanzar en la incorporación y mejora de nuevas alternativas forrajeras, en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral se inició un programa de documentación, conservación y valoración de recursos forrajeros nativos, entre ellos del género *Desmodium*.

Conclusiones y Perspectivas

Este trabajo de tesis se inició a través de la colección de semillas, plantas, nódulos, y muestras de suelo de ocho poblaciones correspondientes a la especie nativa *D. incanum*. En nuestro país, las poblaciones se encontraron en diferentes tipos de suelos y clima, que representan distritos fitogeográficos variados. Los mismos fueron lugares elegidos para recolectar especímenes (Capítulo III).

En la primera parte de esta Tesis nos focalizamos en construir y establecer una vasta colección de rizobios nativos noduladores de *D. incanum* recuperados de ocho poblaciones que abarcan las provincias de Entre Ríos, Misiones, Formosa, Chaco, Tucumán, Santa Fe y Corrientes. Las características climáticas de los sitios de colecta de las muestras y la comparación de las características edáficas analizadas de cada suelo evidenciaron que las poblaciones de *D. incanum* habitan naturalmente tanto en zonas de climas cálidos tropicales y subtropicales como así también en zonas templadas y en suelos de naturaleza química diferentes del centro y norte del país (Capítulo III). La caracterización de los suelos donde se encontró *Desmodium incanum* permitió evidenciar que existen poblaciones presentes en suelos desde arenosos, francos hasta arcillo-limosos. Su amplia distribución geográfica en ambientes de diferentes características edáficas muestra su plasticidad y hace de esta especie una forrajera promisoría para zonas subtropicales del país.

En particular, un muy bajo número de nódulos pudo ser recuperado en el ambiente de origen de las plantas. A pesar de ello cuando en el laboratorio se cultivaron las plantas con los suelos provenientes de las diferentes poblaciones ensayadas, la totalidad de las mismas desarrolló estructuras nodulares en sus raíces, indicando la presencia en el suelo de rizobios nativos noduladores de *D. incanum*. En este estudio, se recolectaron 143 cepas asociadas con *D. incanum* y se avanzó en la caracterización de aspectos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de simbiontes de *Desmodium incanum* recolectados en el campo o provenientes de ensayos de laboratorio como así también en el estudio de la asociación simbiótica entre ambos.

Observamos que los aislamientos de la colección presentaron una gran heterogeneidad fenotípica (Capítulo IV) y diversidad genética (Capítulo V), a pesar de su sitio de origen. Muchos aislamientos fueron tolerantes a estreses abióticos tales como alta temperatura y salinidad, mientras que algunos también fueron capaces de crecer a pH extremos, tan alto

como 10 o ácidos como 4 (en medio agarizado). Un grupo de aislamientos de la colección presentó resistencias marcadas a diversas combinaciones de estreses abióticos, las cuales muchas veces están presentes en los sitios de nuestro país en los que habita *D. incanum*. Desde un punto de vista aplicado, la tolerancia a la temperatura mostrada por algunos de los aislamientos podría constituir una característica positiva, que favorecería la supervivencia de los rizobios tanto en la superficie de las semillas inoculadas como en los suelos. Además, la caracterización del germoplasma microbiano asociado a *D. incanum* utilizando la técnica de la huella dactilar nos permitió observar un alto nivel de diversidad genética entre los rizobios de la colección, con variaciones a nivel de dicha diversidad que dependieron del sitio de origen (Capítulo V).

El análisis filogenético de rizobios simbioses de *D. incanum* reveló en nuestro país, la presencia mayoritaria de *Bradyrhizobium*, resultado que fue coincidente con los datos disponibles de otros países. Los aislamientos noduladores de *D. incanum* seleccionados principalmente pertenecían al género *Bradyrhizobium* ($\geq 85\%$ de similitud en el gen 16S rRNA) y estaban estrechamente relacionados con *B. elkanii*, *B. japonicum* y *B. yuanmingense* (Capítulo V). Dentro del grupo de aislamientos estudiados, solo un aislamiento (*R. sp.* P10 117) pertenecía al género *Rhizobium*, siendo *R. tropici*, *R. rhizogenes*, *R. hainanense*, *R. multihospitium* y *R. lusitanum* las especies evolutivamente más cercana (Capítulo V). Queda pendiente realizar futuros estudios que involucren un enfoque polifásico para arrojar luz sobre la identificación de estas cepas.

En conjunto, nuestros hallazgos y resultados previos indican que *D. incanum* exhibe un alto grado de promiscuidad simbiótica siendo nodulado por rizobios de diferentes géneros / especies. Esta compleja situación, nos llevó a caracterizar el tipo de variantes de genes *nodC* presentes en aislamientos argentinos seleccionados y a investigar las relaciones filogenéticas con genes homólogos de otros rizobios. Rogel *et al* (2011), encontraron que las filogenias de genes *nod* de los rizobios correlacionaba con las especies de huéspedes de leguminosas.

El análisis BLASTn de los fragmentos *nodC* secuenciados en este trabajo mostró una alta similitud de secuencia con genes *nodC* presentes en *B. elkanii* (81-95% de identidad) (Capítulo V), y dichas secuencias *nodC* se agruparon en varios clados los cuales contienen secuencias *nodC* de diversos *Bradyrhizobium*. Desafortunadamente, no pudimos amplificar el alelo *nodC* de los aislamientos locales *Rhizobium sp.* P10 117 y *Bradyrhizobium sp.* P10 130, sugiriendo la existencia de variante/s *nodC* adicional/es asociada a estos simbioses de *D. incanum*. Resultados diferentes encontraron Xu *et al*

(1995) quienes observaron que los genes *nodC* de cuatro simbiontes aislados de *Desmodium spp.* mostraron 100% de similitud de secuencia con genes *nodC* de cepas *Ensifer sp.* aisladas de árboles de *Leucaena* en China, mientras que otras secuencias *nodC* se relacionaron con secuencias presentes en *Bradyrhizobium*. En conjunto, estas observaciones muestran que las filogenias cromosómicas y plasmídicas no siempre coinciden y que podría haber algún tipo de preferencia geográfica de la planta huésped en relación con la secuencia *nodC*. En este sentido, Aguilar *et al* (2004) observaron la existencia de polimorfismo en el gen *nodC* entre cepas de *R. etli* con diferentes alelos *nodC* en cepas americanas en correlación con los centros de diversificación genética de frijol. Estudiar si existe una nodulación preferencial de *D. incanum* por linajes de rizobios geográficamente relacionados podría proporcionar información sobre una posible coevolución en los centros de diversificación genética del huésped. Asimismo, para lograr una comprensión profunda de las primeras señales de la relación simbiótica entre rizobio y *Desmodium spp.* se necesitarán esfuerzos futuros para avanzar en la secuenciación *nodC* de más aislamientos y otros grupos de genes *nod*, además de la elucidación estructural de sus correspondientes Factores Nod.

En el Capítulo VI mostramos que varios aislamientos pudieron mantener el crecimiento de la planta en ausencia de fertilización nitrogenada y algunos de ellos produjeron pesos secos más altos en comparación con los de las plantas fertilizadas con N. La eficiencia simbiótica de las bacterias nativas parece estar relacionada con las características específicas de cada aislamiento y no con su composición genética general, ya que aislamientos que mostraron diferentes propiedades simbióticas se agruparon en el mismo grupo del dendrograma del análisis del gen ARNr 16S (p. Ej., *B. sp.* P5 514, *B. sp.* P9 118 y *B. sp.* P9 904). Además, el análisis del peso de las raíces (ensayos con suelo) permitió la detección de un posible efecto promotor del crecimiento vegetal del aislamiento *B. yuanmingense* P10 130. Resta dilucidar los mecanismos que operan en la promoción del crecimiento de la raíz por la cepa inoculada, podría ocurrir que dicha cepa haya producido una o más fitohormonas, o la solubilización de fosfatos como ya se ha observado en otros bradyrhizobios (Ahemad & Kibret, 2014, Boiero *et al* 2007). Además, observamos que en suelo no estéril, *B. yuanmingense* P10 130 promovió un crecimiento aéreo vegetal significativamente mayor que el resto de los tratamientos inoculados, y tan alto como el observado en las plantas de control fertilizadas con N.

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis constituyen una muy importante contribución al conocimiento a nivel funcional y molecular de los

rizobios noduladores de *Desmodium incanum* en ecosistemas de Argentina. Hemos indagado las características de la diversidad genotípica de rizobios noduladores de *D. incanum* y la posición filogenética de los simbioses obtenidos de suelos argentinos. La evidencia disponible nos permitió además seleccionar el mejor candidato para inoculación basado en criterios selectivos diversos. En cualquier caso, la notable tolerancia a altas temperaturas y la amplia tolerancia al pH de *B. yuanmingense* P10 130, junto con su rendimiento simbiótico tanto en medio libre de N como en suelo no estéril, posicionan a este aislamiento como un potencial candidato para avanzar en la tarea de selección de cepas más eficientes con potencial interés agronómico como inoculante rizobiano de *D. incanum*. En este caso se requerirán evaluaciones básicas y de campo en diferentes condiciones edafoclimáticas de nuestro país para poder realizar un uso sustentable del mismo. Actualmente, nuestro grupo de trabajo está concentrado en la secuenciación del genoma de *B. yuanmingense* P10 130, a fin de avanzar en el estudio de las variantes alélicas de los genes de nodulación que produce esta bacteria. A partir de estos datos, será importante indagar si los rizobios simbioses de *D. incanum* producen la misma familia de moléculas señal Nod o, alternativamente, si todos estos rizobios producen un conjunto diverso, aunque simbióticamente activo, de factores de nodulación a fin de lograr una comprensión más acabada sobre la señalización temprana de la relación simbiótica rizobio-*D. incanum*. Asimismo, nos proponemos avanzar en el análisis detallado *in vitro* de las potenciales actividades promotoras del crecimiento vegetal y además será importante evaluar si el comportamiento de este rizobio a campo refleja el incremento del sistema radical que hemos observado en los ensayos en el laboratorio.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que existe un amplio potencial para incrementar en forma significativa la fijación de nitrógeno en la simbiosis rizobio-*D. incanum* mediante la selección de cepas bacterianas eficientes y adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de nuestro país.

En base a nuestros resultados deberá apuntarse a avanzar en estudios a campo incluyendo, además, información sobre las distancias geográficas y/o variables demográficas además de las variables ambientales o de nicho. Estos modelos podrán luego utilizarse para planes de conservación y restauración de suelos y para tomar medidas y políticas de manejo de pasturas nativas. Como se mencionó en la introducción, el entendimiento de los procesos ecológicos, simbióticos y biológicos que mantienen el funcionamiento del suelo como ecosistema es imprescindible para poder realizar un uso sustentable del mismo.

Tesis Doctoral - Toniutti María Antonieta

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS

- Aarons, S.R. & Graham P.H. (1991) Response of *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli to acidity. *Plant Soil* 134:145–151.
- Abdel-Salam, M. S.; Ibrahim, S.A.; Abd-El-Halim, M.M.; Badawy, F.M.; Abo-Abal, S.E.M. (2010). Phenotypic characterization of indigenous Egyptian rhizobial strains for abiotic stresses performance. *J. Am. Sci.* 6 9: 498-503.
- Ackerman J.; Bonefont-Flores K.; Vega-Lopez V.; Areces-Berazzin, F. (1991). Flora virtual de la Estación Biológica El Verde. Universidad de Puerto Rico - Río Piedras (UPRRP) y Centro de Ecología Tropical Aplicada (CATEC). [www.floraelderde.catec.upr.edu /especie info.php](http://www.floraelderde.catec.upr.edu/especie%20info.php)
- Aguilar OM, Riva O, Peltzer E. (2004) Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(37):13548-53.
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26(1), 1-20.
- Aleman, M.; Figueroa Fleming, T.; Etcheverry, A.; Sührig, S.; Ortega Baez, P. (2014). The explosive pollination mechanism in *Papilionoideae* (*Leguminosae*): an analysis with three *Desmodium* species. *Plant Syst. Evol.* 300 1: 177-186.
- Ali, S.F.; Rawat, L.S.; Meghvansi, M.K.; Mahma, S.K. (2009). Selection of stress-tolerant rhizobial isolates of wild legumes growing in dry regions of Rajasthan, India. *J. Ag. Bio. Sci. (ARPN)*. 4 1: 14-18.
- Al-Niemi, T.S.; Kahn, M.L.; Mc Dermott, T.R. (1997). P metabolism in the bean-*Rhizobium tropici* symbiosis. *Plant Physiol.* 113:1233–1242.
- Althabegoiti, M.J. (2010). Optimización de inoculantes para la agricultura sustentable en soja: rol de los flagelos en *Brayrhizobium japonicum* en la competición para la nodulación. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP.
- Alvarez-Martínez, E.R.; Valverde, A.; Ramírez-Bahena, M.H.; García-Fraile, P.; Tejedor, C.; Mateos, P.F.; Santillana, N.; Zúñiga, D.; Peix, A.; Velázquez, E. (2009). The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of

- Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds. Arch Microbiol. 191(8):659-68.
- Alves, B.J.R.; Rezende, C. de P.; Resende, A.S.; Macedo, R.; Tarré, R.; Urquiaga, S.; Boddey, R.M. (2000). Estimation of N₂ fixation in *Desmodium ovalifolium* from the relative ureide abundance of stem solutes: comparison with the 15N-dilution and an in situ soil core technique. Nutr. Cycl. Agroecosyst. 56: 177–193.
- Andrews, M.Y. & Andrews, M. (2017). Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. Int. J. Mol. Sci. 18 4: 705.
- Angelini, J.; Ibáñez, F.; Taurian, T.; Tonelli, M. L.; Valetti, L.; Fabra, A. (2011). A study on the prevalence of bacteria that occupy nodules within single peanut plants. Curr Microbiol, 62 6: 1752-1759.
- APG II (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Bot. J. Lin. Soc. 141 4: 399-436.
- Appunu, C.; N'Zoue, A.; Moulin, L.; Depret, G.; Laguerre, G. (2009). *Vigna mungo*, *V. radiata* and *V. unguiculata* plants sampled in different agronomical-ecological-climatic regions of India are nodulated by *Bradyrhizobium yuanmingense*. Syst. Appl. Microbiol., 32: 460–470.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). Official Methods of Analysis of the AOAC. (15th Ed. AOAC) Washington, D.C.
- Atemkeng, M.F.; Begoude, B. (2014). Assessment of indigenous *Bradyrhizobia* spp. Population levels in low phosphorus soils of southern Cameroon using cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) as trap crop. J. Ecol. Nat. Environ. 6 8: 280–286.
- Badar, R.; Malik, H.; Ilyas, H. (2015). Influence of organic, inorganic and biofertilizers on physical and biochemical parameters of *Vigna unguiculata*. Int. J. of Adv. Res. 3 1: 738-748.
- Bailly, X.; Olivieri, I.; De Mita, S.; Cleyet-Marel, J. C.; Béna, G. (2006). Recombination and selection shape the molecular diversity pattern of nitrogen-fixing *Sinorhizobium* sp. associated to *Medicago*. Mol Ecol, 15 10: 2719-2734.
- Bala, A. & Giller, K. E. (2001). Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes. New Phytol 149, 495–507.
- Baraúna, A. C.; Silva, K. D.; Pereira, G. M. D.; Kaminski, P. E.; Perin, L.; Zilli, J. E. (2014). Diversity and nitrogen fixation efficiency of rhizobia isolated from nodules of *Centrolobium paraense*. Pesq. Agr. Br. 49 4: 296-305.

- Barboza, G.E.; Cantero, J.J.; Núñez, C.; Pacciaroni, A.; Ariza Espinar, L. (2009). Medicinal plants: a general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana* 34: 7-365.
- Barcellos, F.G.; Menna, P.; da Silva Batista, J.S.; Hungría, M. (2007). Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) feedii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savanna soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2635-2643.
- Barrientos, L.D.; Campillo, R.R.; Méndez, E.A. (1994) La acidez del suelo y su efecto sobre la fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas forrajeras. *Agric. Tech. (Chile)* 54 2: 118-123.
- Batista, J. S. S.; Hungria, M.; Barcellos, F. G.; Ferreira, M. C.; Mendes, I. C. (2007). Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. *Microbial Ecol.*, 53 2: 270-284.
- Bautista, V.V.; Monsalud, R.G.; Yakta, A. (2010) *Devosia yakushimensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Pueraria lobata* (Willd.) O.U.I. *International J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 627-632.
- Bécquer, C.J.; Prévost, D.; Prieto, A. (2000). Caracterización fisiológica-bioquímica de cepas de rizobios, aislados en leguminosas forrajeras. *Rev. Biol.* 14 1: 57-65.
- Bécquer, C.J.; Galdo, Y.; Ramos, Y.; Peña, M.D.; Almaguer, N.; Peña, Y.F.; Mirabal, A.; Quintana, M.; Puentes, A. (2016). Rhizobia isolated from forage legumes of an arid cattle rearing ecosystem in Holguín, Cuba. Morpho-cultural evaluation and nodulation (phase I). *Cuban J. Agric. Science.* 50 4: 607-617.
- Bécquer, C.J.; Galdo, Y.; Mirabal, A.; Quintana, M.; Puentes, A. (2017). Rhizobia isolated from forage legumes of an arid cattle rearing ecosystem in Holguín, Cuba. Tolerance to abiotic stress and catalase production (Phase II). *Cuban J. Agric. Science.* 51 1:117-127.
- Bell, L.W.; Bennett, R.G.; Ryan, M.H.; Clarke, H. (2011). The potential of herbaceous native Australian legumes as grain crops: a review. *Renew. Agric. Food Syst.* 26 1: 72-91.
- Bena, G.; Lyet, A.; Huguet, T.; Olivieri, I. (2005). *Medicago-Sinorhizobium* symbiotic specificity evolution and the geographic expansion of *Medicago*. *J Evolut. Biol.* 18 6: 1547-1558.

- Bergey, S. (1984). *Manual of Determinative Bacteriology*. The William and Wilkings Co. Baltimore, USA.
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen. Microbiol.* 84: 188–198.
- Bingle, L.E.; Bailey, C.M.; Pallen, M.J. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol. Review.* 11 1: 3-8.
- Boiero L, Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassán F, Luna V. (2007). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74(4):874-80.
- Boldrini, I.I. (1993). *Dinamita da Vegetação de uma Pastagem Natural sob Diferentes Níveis de Oferta de Forragem e Tipos de Solos*. Porto Alegre: UFRGS. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduana em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. p 262.
- Boom, R.; C. J. A.; Sol, M. M. M.; Salimans, C. L.; Jansen, P. M. E.; Wertheimvan Dillen; van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28: 495–503.
- Bordeleau, L. M. & Prevost, D. (1994). Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil* 161:115–124.
- Bosman, H.G.; Castillo, E.; Valles, B.; De Lucía, G.R. (1990) Composición botánica y nodulación de leguminosasen las pasturas nativas de la planicie costera del Golfo de México. *Pasturas Tropicales.* 121: 1-8.
- Bottomley, P.J. & Myrold, D.D. (2015). Biological N inputs. In: *Soil Microbiology, Ecol. Biochem.* Elsevier, A. Paul. Fourth Edition MA, 447-470.
- Boucher, Y.; Nesbo, C.L.; Doolittle, W.F. (2001). Microbial genomes: dealing with diversity. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 285-289.
- Bray, R.H. & L.T. Kurtz. (1945). Determination of total, organic and available forms of phosphorus in soils. *Soils Sc.* 59: 39-45.
- Brelles Marino, G. & Boiardi, J. L. (1996). Nitrogen limitation of chemostat-grown *Rhizobium etti* elicits higher infection-thread formation in *Phaseolus vulgaris*. *Microbiol.*142: 1067-1070.
- Brelles-Mariño, G. & Ané, J.M. (2008). Nod factors and the molecular dialogue in the rhizobia - legume interaction. In: *Nitrogen Fixation Research Progress*. Editor: Guilherme N. Couto. 1-57.

- Bremer, K. M. W.; Chase, P. F.; Stevens, A. A.; Anderberg, A.; Backlund, B.; Bremer, B. G.; Briggs, P.; Endress, M. F.; Fay, P.; Goldblatt, M. H. G.; Gustafsson, S. B.; Hoot, W. S.; Judd, M.; Källersjö, E. A.; Kellogg, K. A.; Kron, D. H.; Les, C. M.; Morton, D. L.; Nickrent, R. G.; Olmstead, R. A.; Price, C. J.; Quinn, J. E.; Rodman, P. J.; Rudall, V.; Savolainen, D. E.; Soltis, P. S.; Soltis, K. J. Sytsma ; Thulin, M. (1998) Angiosperm Phylogeny Group (APG) An ordinal classification for the families of flowering plants. *J: An. Mo.Bot. Gard.* 85: 531-553.
- Brett, J.; Ferguson, B. J.; Indrasumunar, A.; Hayashi, S.; Lin, M.; Lin, Y., Reid, D. E.; Gresshoff, P. M. (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* 52: 61–76.
- Brockwell, J.; Bottomley, P.J.; Thies, J.E. (1995a). Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility : A critical assessment. *Plant and Soil*, 174: 143–180.
- Brockwell, J.; Pilka, A.; Holliday, R. (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 Agric.* 31: 211-219.
- Brockwell, J.; Hely, F. W.; Neal-Smith, C. A. (1966). Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. *Aust.J. Exp.Agr.* 6 23: 365-370.
- Bromfield, E.S.P & L.R. Barran. (1990). Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* and *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* 36: 369-372.
- Buchanan, R. E. (1980). In. V. B. D. Skerman, V. McGowan, P. H. A. Sneath (Ed.). Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 225-420.
- Burkart, A. (1939). Las Leguminosas Hedisareas de la República Argentina y regiones adyacentes. *Darviniana* 3: 117-302.
- Burkart, A. (1952). Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. 2 ed. Buenos Aires, Acme, 569.
- Burkart, A. (1987). *Desmodium*, en Troncoso, N. y Bacigalupo, N. (eds.) Fl II Entre Ríos, *Colec. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu.* 6 3a: 595-606.
- Cabrera, A. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Fascículo 1. Regiones Fitogeográficas Argentinas. (1994). Ed. ACME S.A.C.I Buenos Aires. Argentina. p 85.

- Capoen, W.; Oldroyd, G.; Goormachtig, S.; Holsters, M. (2010) *Sesbania rostrata*: a case study of natural variation in legume nodulation. *New Phytol.* DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03124.x.
- Chahboune, R.; Carro, L.; Peix, A.; Barrijal, S.; Velázquez, E.; Bedmar, E.J. (2011). *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 2922–2927.
- Chahboune, R.; Carro, L.; Peix, A.; Ramírez-Bahena, M.H.; Barrijal, S.; Velázquez, E.; Bedmar, E.J. (2012). *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Syst. Appl. Microbiol.* 35 5: 302-305.
- Chaintreuil, C.; Giraud, E.; Prin, Y.; Lorquin, J.; Ba, A.; Gillis, M.; de Lajudie, P.; Dreyfus, B. (2000). Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5437-5447.
- Chang, Y.L.; Wang, J.Y.; Wang, E.T.; Liu, H.C.; Sui, X.H.; 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, T.H.H. & Murata, N. (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes, *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 250–257.
- Chen, W. M.; Laevens, S.; Lee, T. M.; Coenye, T.; Vos, P.; Mergeay, M.; Vandamme, P. (2001) *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1729–1735.
- Chen, W. M., Lee, T. M., Lan, C. C., Cheng, C. P. (2000). Characterization of halotolerant rhizobia isolated from root nodules of *Canavalia rosea* from seaside areas. *FEMS Microbiol. Ecol.* 34.1: 9-16.
- Chen, W. X.; Tan, Z. Y.; Gao, J.L.; Li, Y.; Wang, E.T. (1997). *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 870–873.
- Chibebaa, A.M.; Kyei-Boahen, S.; Guimarães, M.F.; Nogueira, M.A.; Hungria, M. (2017). Isolation, characterization and selection of indigenous *Bradyrhizobium* strains with outstanding symbiotic performance to increase soybean yields in Mozambique. *Agric. Ecosyst. Environment.* 246: 291-305.
- CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical (1988) Simbiosis leguminosa-rizobio. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico, CIAT Eds., Cali, Colombia. p 203.

- Cooper, J. (2004) Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection, in: Callow, J.A. (Ed.), *Adv. Bot. Res.: Incorporating advances in plant pathology*, Academic Press. 1–62.
- Crosa, M.; Olivera A.; Goyenola, R.; Frioni, L. (1999). Comportamiento simbiótico de *Desmodium incanum* en Uruguay. *Agrociencia*. 3 1: 38-43.
- Cuadrado, B.; Rubio, G.; Santos, W. (2009). Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de fríjol caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 38 1: 78-104.
- Cullimore, J.V.; Ranjeva, R.; Bono, J.J. (2001) Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes, *Trends Plant Sci.* 6: 24–30.
- 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.; 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 10: 3395-3401.
- Dalton, D.A. & Kramer, S. (2006). Nitrogen-fixing bacteria in non-legumes. In: Springer Netherlands, Dordrecht. 105-130.
- D'Ambrogio de Argüeso, A. (1986). *Manual de Técnicas de Anatomía Vegetal*. Ed. Hemirferio Sur.
- Date, R.A. & Ratcliff, D. (1989). Growth, nodulation and nitrogen fixation in *Stylosanthes*: effect of different root temperatures at two shoot temperatures. *Exp. Agric.* 25: 446-460.
- Date, R.A. (1977). Inoculation of tropical pasture legumes. In: *Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture* J. M. Vincent, A. S. Whitney, and J. Bose (ed.), University of Hawaii, Paia. 293-311.
- Date, R.A. (1982). Collection, isolation, characterization and conservation of rhizobium. En: *Nitrogen fixation in legumes*. Ed. J.M. Vincent, Academic Press. Sydney, Australia. p. 95
- De Bruijn F. (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic 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 Peña, M. R. & J. F. Pensiero. (2011). *Catálogo de nombres comunes de la flora argentina*. Ed. UNL. p 463 .

- de Lajudie, P.M.; Young, J.P.W. (2017). International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee for the Taxonomy of Rhizobium and Agrobacterium Minutes of the meeting, Budapest, 25 August 2016. *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* 67 7: 2485-2494.
- Del Papa, M.F.; Balague, L.J.; Sowinski, S.C.; Wegener, C.; Segundo, E.; Abarca, F.M.; Toro, N.; Niehaus, K.; Pühler, A.; Aguilar, O.M.; Martínez-Drets, G.; Lagares, A. (1999) Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 4: 1420-7.
- Delamuta, J. R.; Ribeiro, R. A.; Ormeño-Orrillo, E.; Parma, M. M.; Melo, I. S.; Martínez-Romero, E.; Hungria, M. (2015). *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov., nitrogen-fixing symbionts of tropical forage legumes. *Int J Syst. Evol. Microbiol.* 65 12: 4424-443.
- Delamuta, J.R.; Ribeiro, R.A.; Ormeño-Orrillo, E.; Melo, I.S.; Martínez-Romero, E.; Hungria, M. (2013). Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* 63: 3342-51.
- Delamuta, J.R.M.; Gomes, D.F.; Ribeiro, R.A.; Chueire, L.M.O.; Souza, R.C.; Almeida, L.G.P.; Vasconcelos, A.T.R.; Hungria, M. (2015) Genome sequence of *Bradyrhizobium tropiciagri* strain CNPSo 1112T, isolated from a root nodule of *Neonotonia wightii*. *Genome Announc.* 3 6: e01482-15.
- Delle Monache, G.; Botta, B.; Vinciguerra, V.; De Mello, J.R.; De Andrade Chiappeta, A. (1996). Antimicrobial isoflavanones from *Desmodium canum*. *Phytochemistry.* Elsevier Science Ltd. 41 2: 537-544.
- Demezas, D. H.; Reardon, T. B.; Strain, S. R.; Watson, J. M.; 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 2: 209-220.
- Demezas, D. H.; Reardon, T. B.; Watson, J. M.; Gibson, A. H. (1991). Genetic diversity among *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii strains revealed by allozyme and restriction fragment length polymorphism analyses. *Appl. Environm. Microbiol.* 57 12: 3489-3495.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. (2013). InfoStat versión 2013. (<http://www.infostat.com.ar>).
- Dice L. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology.* 26: 297-302.

- Divito, G.A. & Sadras V.O. (2014). How do phosphorus, potassium and sulphur affect plant growth and biological nitrogen fixation in crop and pasture legumes? A meta-analysis. *Field Crop Res.* 156:161–171.
- Dudeja, S. S.; Sheokand, S.; Kumari, S. (2012). Legume root nodule development and functioning under tropics and subtropics: perspectives and challenges. *Legume Res.* 35 2: 85-103.
- Downie, J. A. (2014). Legume nodulation. *Current Biology* 24 5: R184-R190.
- Downie, J.A. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of *rhizobia* with legume roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 150-170.
- Doyle, J.J.; Chappill, J.A.; Donovan Bailey, C.D.; Kajita, T. (2000). Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. In: Herendeen, P.S. y Bruneau, A. (Eds.): *Adv. Legume Syst.*: Royal Bot. Gard. Kew. 9: 1-20.
- Durán, D.; Rey, L.; Mayo, J.; Zúñiga-Dávila, D.; Imperial, J.; Ruiz-Argüeso, T.; Martínez-Romero, E.; Ormeño-Orrillo, E. (2014 b). *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 6: 2072-2078.
- Durán, D.; Busquets, A.; Imperial, J.; Ruiz-Argüeso, T. (2014 a). *Bradyrhizobium valentinum* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lupinus mariae-josephae*, a lupine endemic of basic-lime soils in Eastern Spain. *Syst. Appl. Microbiol.* 37 5: 336-341.
- Dykhuizen, D. E. & Green, L. (1991). Recombination in *Escherichia coli* and the definition of biological species. *J Bacteriol.* 173 22: 7257-7268.
- Eardly, B. D.; Materon, L. A.; Smith, N. H.; Johnson, D. A.; Rumbaugh, M. D.; Selander, R. K. (1990). Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Appl Environm Microbiol*, 56 1: 187-194.
- Eardly, B. D., Wang, F. S., Whittam, T. S., & Selander, R. K. (1995). Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl Environm Microbiol.* 61 2: 507-512.
- Economou, A.; Davies, A.E.; Johnston, A.W.B.; Downie, J.A. (1994). The *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae nodO* gene can enable a *nodE* mutant of *R.l. trifolii* to nodulate vetch. *Microbiol.* 140: 2341-2347.

- Ehinger, M.; Mohr, T. J.; Starcevich, J. B.; Sachs, J. L.; Porter, S. S.; Simms, E. L. (2014). Specialization-generalization trade-off in a *Bradyrhizobium* symbiosis with wild legume hosts. *BMC ecology*, 14: 1-8.
- Elliott, G.N.; Chou, J.H.; Chen, W.M.; Bloemberg, G.V.; Bontemps, C.; Martínez-Romero, E.; Velázquez, E.; Young, J.P.W.; Sprent, J.I.; James, E.K. (2009). *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of Mimosa, particularly under N-limited conditions. *Environ. Microbiol.*, 11: 762-778.
- Emerich, D.W. & Krishnan†, H.B. (2014) Symbiosomes: temporary moonlighting organelles. *Biochem. J.* 460: 1–11.
- Estrella, M. J.; Munoz, S.; Soto, M. J.; Ruiz, O.; Sanjuán, J. (2009). Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Appl. Environm. Microbiol.* 75 4: 1088-1098.
- Etiene, R.C.; Santos Silva S.; Freitas, A.N.; Mendonça Bastos Vieira, I. M. de; Manhães Souto, S.; Prata Neves, M. C.; Gouveia Rumjanek, N. (2005). Efetividade de rizóbios isolados de solos da região Nordeste do Brasil na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.) *Acta Scientiarum. Biological Sciences.* . Universida de Estadual de Maringá Maringá, Bras. 27 2: 301-307.
- Fauvert, M. & J. Michiels (2008). Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium–legume symbiosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 285 1: 1-9.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fernández, C. & Novo, R. (1988). En: *Vida microbiana del suelo*. Universidad de La Habana. 525p.
- Fernández, J. C.; Benítez, C.A.; Pizzio, R.M.; Royo Pallarés, O.; Pizzio, R. (1993). Principales forrajeras nativas del medio este de la Provincia de Corrientes. Estación Agropecuaria Mercedes. Corrientes. Argentina. Ser. Téc., n. 23. 2^obEd. p. 1-82.
- Ferreira, L.; Sánchez-Juanes, F.; García-Fraile, P.; Rivas, R.; Mateos, P.F.; Martínez-Molina, E.; González-Buitrago, J.M.; Velázquez, E. (2011) MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae. *PLoS One* 6 5 e20223.
- Fisher, R.A. & Yates, R.Y. (1963). *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research* (6th.ed.), Oliver and Boyd.London.
- Fornasero, L.V.; Del Papa, M.F.; López, J.L.; Albicoro, F.J.; Zabala, J.M.; Toniutti, M.A.; Pensiero, J.F.; Lagares, A. (2014). Phenotypic, molecular and symbiotic

- characterization of the rhizobial symbionts of *Desmanthus paspalaceus* (Lindm.) Burkart that grow in the province of Santa Fe, Argentina. *PloS one*. 9 8, p.e104636.
- Fowler, D.; Coyle, M.; Skiba, U.; Sutton, M.A.; Cape, J.N.; Reis, S.; Sheppard, L.J.; Jenkins, A.; Grizzetti, B.; Galloway, J.N.; Vitousek, P. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 368 (1621), .20130164.
- Franco, A.A. & Balieiro, F. (2000). The role of biological nitrogen fixation in land reclamation agroecology and sustainability of tropical agriculture: In: Rocha Miranda (Ed.). *Transition global sustainability: the contribution of Brazilian science*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 209-233.
- Freitas, M.; Reis, D.; da Costa, A.L.; Bortoluzzi, R.; Santos, M. (2014). Morphological and micromorphological characteristics of *Desmodium* fruits (Leguminosae: Papilionoideae). *Rev. Biol. Trop.* 62 4: 1597-1608.
- Frioni, L. (1999). *Procesos microbianos*. Ed. Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina. ISBN: 950-665-110.
- Gage, D.J. & Margolin, W. (2000) Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia, *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 613–617.
- Gagnon, H. & Ibrahim, R.K. (1998) Aldonic acids: a novel family of nod gene inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, and *Sinorhizobium meliloti*, *Mol. Plant Microbe Int.* 11: 988–998.
- Galloway, J.N.; Townsend, A.R.; Erisman, J.W.; Bekunda, M.; Cai, Z.; Freney, J.R.; Martinelli, L.A.; Seitzinger, S.P.; Sutton, M.A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*. 320 5878: 889-892.
- Garg, N. & Manchanda, G. (2008). Effect of arbuscular mycorrhizal inoculation on salt-induced nodule senescence in *Cajanus cajan* (pigeonpea). *J. Plant Growth Regulation*. 27 2:115-124.
- Garg, N. (2007). Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A review. *Agron. Sustain. Develop.* Springer Verlag (Germany), 27 1:59-68.
- Garrity, G.M.; Bell, J.A.; Lilburn, T. (2005) Family VII. Bradyrhizobiaceae fam. nov. In: Brenner, D.J, Krieg, N.R, Staley, J.T Eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology, volume two the proteobacteria, part C the alpha, beta, delta, and epsilon proteobacteria*. Springer, New York, pp. 438-476.
- Garrity, G.M.; Winters, M.; Searles, D. B. (2001). Taxonomy outline of the procariotic genera. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2.
- Garrity, G.M. & Holt, J.G. (2001). The road map to the Manual. *See Ref. 10*, 1:119–66.

- Gaur, Y.D. (1993). Microbiology, Physiology and Agronomy of nitrogen fixation. Legume-Rhizobium symbiosis. In: proceedings of Indian Nacional Science Academy. 59B: 333-358.
- Geurts, R. & Bisseling, T. (2002) *Rhizobium* Nod factor perception and signalling, Plant Cell 14, S239–S249.
- Gibson, K. E., Kobayashi, H., Walker, G. C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. Annual review of genetics, 42, 413-441.
- Giongo, A.; Ambrosini, A.; Vargas, L.K.; Freire, J.R.J.; Bodanese-Zanettini, M.H.; Passaglia, L.M.P. (2008). Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) isolated from South Brazilian fields. Appl. Soil Ecol., 38: 261-269.
- Goormachtig, S.; Capoen, W.; Holsters, M. (2004a). *Rhizobium* infection: lessons from the versatile nodulation behavior of water-tolerant legumes. Trends Plant Sci 9: 518-522.
- Goormachtig, S.; Capoen, W.; James, E.K.; Holsters, M. (2004b) Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume nodulation. P Nat. Acad. Sci. USA 101: 6303–6308.
- Graham, P.H. (1992) Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. Can. J. Microbiol. 38 6: 475-484.
- Graham, P. H.; Draeger, K., Ferrey, M. L.; Conroy, M. J.; Hammer, B. E.; Martinez, E.; Naarons, S.R.; Quinto, C. (1994). Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. Can. J. Microbiol. 40:198–207.
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. Field Crops Res. 65(2-3), 93-106.
- Graham, P.H. & Vance, C.P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. Plant Physiol. 131: 872-877.
- Granada, C. E.; Strochein, M.; Vargas, L.K.; Bruxel, M.; Saccol de Sá, E.L.; Passaglia, L.M.P. (2014) Genetic diversity and symbiotic compatibility among rhizobial strains and *Desmodium incanum* and *Lotus* spp. plants. Genet. Mol. Biol. 37 2: 396-405.
- Grange, L. & Hungria, M. (2004). Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. Soil Biol Biochem, 36 9: 1389-1398.

- Gronemeyer, J. L.; Hurek, T.; Bunger, W.; Reinhold-Hurek, B. (2016) *Bradyrhizobium vigna* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:62–69.
- Gronemeyer, J. L., Chimwamurombe, P.; Reinhold-Hurek, B. (2015a) *Bradyrhizobium subterraneum* sp. nov., a symbiotic nitrogenfixing bacterium from root nodules of groundnuts. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:3241–324.
- Gronemeyer, J.L., Hurek, T.; Reinhold-Hurek, B. (2015b) *Bradyrhizobium kavangense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of traditional Namibian pulses. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:4886–4894
- Gu, J.; Wang, E.T.; Chen, W.X. (2007) Genetic diversity of rhizobia associated with *Desmodium* species grown in China. *Lett. Appl. Microbiol.* 44 3: 286–92.
- Guerrouj, K.; Ruíz-Díez, B.; Chahboune, R.; Ramírez-Bahena, M.H.; Abdelmoumen, H.; Quiñones, M.A.; El Idrissi, M.M.; Velázquez, E.; Fernández-Pascual, M.; Bedmar, E.J.; Peix, A. (2013). Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Sist. Appl. Microbiol* 36 4: 218-223.
- Guimarães, A.A.; Jaramillo, P.M.D.; Nóbrega, R.S.A.; Florentino, L.A.; Silva, K.B.; Moreira, F.M.deS. (2012). Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the Western Amazon by using cowpea as the trap plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 6726-6733.
- Gutell, R.R.; Weiser, B.; Woese, C.R.; Noller, H.F. (1984) Comparative anatomy of 16S like ribosomal RNA. *Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 32: 55–216.
- Hamdi, Y.A. (1985). *La fijación biológica de nitrógeno*. Roma. FAO ISBN: 92-5-301261-7.160p.
- Han, T.X.; Wang, E.T.; Wu, L.J.; Chen, W.F.; Gu, J.G.; Gu, C.T.; Tian, C.F.; Chen, W.X. (2008). *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58 7: 1693-1699.
- Haque, L.; Lupwayi, N.Z.; Luyindula, N. (1995). Inoculation and phosphorus effects on *Desmodium intortum* and *Sesbania sesbam* in the Ethiopian hig wands. *Agric. Ecosys. Environ.* 56, 165-172.
- Harborne, J.B. & Williams C.A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry* 55: 481–504.

- Harwani, D. 2006. Biodiversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains are arbuscular mycorrhizal fungi of soybean cultivars grown in Haroti region of Rajasthan. Ph. D. Thesis. Maharshi Dayanand Saraswati University, Ajmer, India.
- Hassen, A.I.; Bopape, F.L.; Trytsman, M. (2014). Nodulation study and characterization of rhizobial microsymbionts of forage and pasture legumes in South Africa. *World J Agric Res* 2 3: 93-100.
- Hassink J. (1992). Effects of soil texture and structure on carbon and nitrogen mineralization in grassland Soil. *Biol. Fert. Soils* 14: 126-134.
- Haston, E.; Richardson, J. E.; Stevens, P.F.Mark W. Chase, M. W.; Harris, D.J. (2009) The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. *Bot. J. Lin. Soc.* 161: 128–131.
- Heider, B.; Fischer, E.; Berndl, T.; Schultze-Kraft, R. (2009) Genetic relationships among accessions of four species of *Desmodium* and allied genera (*Dendrolobium triangulare*, *Desmodium gangeticum*, *Desmodium heterocarpon*, and *Tadehagi triquetrum*). *Trop. Conserv. Sci.* 2 1: 52–69.
- Herridge, D.F.; Peoples, M.B.; Boddey, R.M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems *Plant Soil*. 311: 1-18.
- Hirsch, P. & M. Müller. (1985). *Blastobacter aggragatus* sp. nov., *Blastobacter capsulatus* sp. nov., and *Blastobacter denitrificans* sp. nov., new budding bacteria from fresh water habitats. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6: 281–286.
- Hooper, A. M.; Caulfield, J. C.; Hao, B.; Pickett, J. A.; Midega, C. A. O.; Khan, Z. R. (2015). Isolation and identification of *Desmodium* root exudates from drought tolerant species used as intercrops against *Striga hermonthica*. *Phytochemistry*. 117: 380-387.
- Howieson, J.G. & Ewing, M.A. (1986) Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti*–*Medicago* symbiosis. *Aust. J. Agric. Res* 37: 55–64.
- Hubber, A.; Vergunst, A.C.; Sullivan, J.T.; Hooykaas, P.J.; Ronson, C.W. (2004). Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 54 2: 561-574.
- Hung, M.H.; Bhagwath, A.A.; Shen, F.T.; Devasya, R.P.; Young, C.C. (2005). Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. *Pedobiología*. 49: 577-584.
- Hungria, M. & Vargas, M.A.T. (2000) Environmental factor affectin N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brasil. *Field Crop Res.* 65: 151-164.

- Hungria, M.; Franchini, J. C.; Campo, R. J.; Crispino, C. C.; Moraes, J. Z.; Sibaldelli, R. N.; Arihara, J. (2006). Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. *Can. J. Plant Sci.*, 86 4: 927-939.
- Hyde, M.A.; Wursten, B.T.; Ballings, P. (2012). Flora of Zimbabwe. Genus page *Desmodium*. http://www.zimbabweflora.co.zw/speciesdata/genus.php?genus_id=744.
- Ikeda, J.L.; Kobayashi, M.; Takahashi, E. (1992). Salt stress increases the respiratory cost of nitrogen fixation. *Soil Sci. Plant Nutr.* 38: 51–56.
- Islam, M.S.; Kawasaki, H.; Muramatsu, Y.; Nakagawa, Y.; Seki, 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 6: 1416–1429.
- Janczarek, M.; Rachwał, K.; Marzec, A.; Jaroslaw, G.; Palusińska-Szys, M. (2015). Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. *Appl. Soil Ecol.* 85 0: 94-113.
- 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*, vol. 66, 98–108.
- Jia, R. Z.; Zhang, R.J.; Wei, Q.; Chen, W.F.; Cho, I. K.; Chen, W.X.; Li, Q.X. (2015). Identification and classification of rhizobia by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Proteomics Bioinform*; 8: 98-107.
- Johansen, D. (1940). *Plant Microtechnique*. Mc Graw Hill. pp. 523.
- Jones, K. M.; Kobayashi, H.; Davies, B.W.; Taga, M.E.; Walker, G.C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 619-633.
- Jordan, D.C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:136-139.
- Jordan., D.C. (1984). En: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Ed. por Williams and Wilkins Baltimore., 1: 23-256
- Jourand, P.; Giraud, E.; Béna, G. (2004) *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume rootnodule- forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2269–73.

- Judd, A. K.; Schneider, M. A. R. I. A.; Sadowsky, M. J.; de Bruijn, F. J. (1993). Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* sero cluster 123 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 6: 1702-1708.
- Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Sato, S.; Minamisawa, K.; Uchiumi, T.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Idesawa, K.; Iriguchi, M.; Kawashima, K.; Kohara, M.; Matsumoto, M.; Shimpo, S.; Tsuruoka, H.; Wada, T.; Yamada, M.; Tabata, S. (2002) Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* 9 6: 189-97.
- Kaschuk, G.; Hungria, M.; Santos, J. C. P.; Berton-Junior, J. F. (2006). Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. *Soil Tillage Res.* 87 2: 205-217.
- Kawaharada, Y.; Kelly, S.; Nielsen, M.W.; Hjuler, C.T.; Gysel, K.; Muszyński, A.; Carlson, R.W.; Thygesen, M.B.; Sandal, N.; Asmussen, M.H.,; Vinther, M.; Andersen, S.U.; Krusell, L.; Thirup, S.; Jensen, K.J.; Ronson, C.W.; Blaise, M.; Radutoiu, S.; Stougaard, J. (2015). Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature.* 523 7560: 308-312.
- Khan, Z.R.; Midega, C.A.O.; Pittchar, J.O; Murage, A.W.; Birkett, M.A.; Bruce, T.J.A.; Pickett, J.A. (2014). Achieving food security for one million sub-Saharan African poor through push-pull innovation by 2020. *Phil. Trans. Roy. Soc. B: Biological Sciences*, 369 (1639). 20120284.
- Kitamura, R. S. A. & Maranhão, L. T. (2016). Phytoremediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soil using *Desmodium incanum* DC. Fabaceae. *Rev. Latin. Biotech. Amb. Algal.* 7 1: 1-15.
- Knudsen, H. (2000). Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe. Primera edición. *Int. Plant Gen. Resources Inst. (IPGRI)*, Roma, Italia.
- Krishnan, H.B. & Bennett, J.O. (2006). *Rhizobium-legume* symbioses: molecular signals elaborated by rhizobia that are important for nodulation. In: *Plant- Associated Bacteria*. S.S. Gnanamanikam (Ed), Springer, New York, ISBN-3:978L40002045363. 57-104.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33 7: 1870-1874.

- Kuykendall, L.D.; Saxena, B.; Devine, T.E.; Udell, S.E. (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp.nov. Can. J. Microbiol. 38 6: 501-505.
- Laguerre, G.; Allard, M. R.; Revoy, F.; Amarger, N. (1994). Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. Appl. Environ. Microbiol. 60 1: 56-63.
- Laguerre, G.; Nour, S.M.; Macheret, V.; Sanjuan, J.; Drouin, P.; Amarger, N. (2001) Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. Microbiol. 147: 981-993.
- Laus, M.C.; Logman, T.J.; Lamers, G.E.; Van Brussel, A.A.N.; Carlson, R.W.; Kijne, J.W. (2006). A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. Mol. Microbiol. 59: 1704-1713.
- Laus, M.C.; van Brussel, A.A.; 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.
- Lerouge, P.; Roche, P.; Faucher, C.; Maillet, F.; Truchet, G.; Promé, J.C.; Dénarié, J. (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature 344: 781-784.
- Lewis, G.P.; Schrire, B.; Mackinder, B.; Lock, M. (2005) (Eds). Legumes of the world. Kew: Royal Bot.Gard. 01-12.
- Li, Q.Q.; Wang, E.T.; Zhang, Y.Z.; Zhang, Y.M.; Tian, C.F.; Sui, X.H.; Chen, W.F.; Chen, W.X. (2011). Diversity and biogeography of rhizobia isolated from root nodules of *Glycine max* grown in Hebei Province, China. Microb. Ecol. 61 4: 917-931.
- Li, Y.H.; Wang, R.; Zhang, X.X.; Young, J.P.W.; Wang, E.T.; Sui, X.H.; Chen, W.X. (2015) *Bradyrhizobium guangdongense* sp. nov. and *Bradyrhizobium* sp. nov., isolated from effective nodules of peanut in China. Int. J Syst. Evol. Microbiol. 65: 4655-4661.
- Lima, L.C.P. Estudos filogenéticos em *Desmodium* Desv. (Leguminosae-Papilionoideae) na América do Sul e revisão taxonômica das espécies brasileiras. Feira de Santana. (2011). 348. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Estadual de Feira de Santana. 298pp.
- Lima, L.C.P.; Oliveira, M.L.A.A.; Tozzi, A.M.G.A. (2010). Fabaceae: *Desmodium*. In: R. C. Forzza; P. Leitman. (Org.). Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. v. 2. Andrea Jakobsson Estúdio, Rio de Janeiro. 874-1699.

- Lima, A. S.; Nóbrega, R. S. A.; Barberi, A.; da Silva, K.; Ferreira, D. F.; de Souza Moreira, F. M. (2009). Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). *Plant Soil*. 319 1-2: 127-145.
- Limpens, E. & Bisseling, T. (2003) Signaling in symbiosis, *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 343–350.
- Lin, D.X.; Wang, E.T.; Tang, H.; Han, T.X.; He, Y.R.; Guan, S.H.; Chen, W.X. (2008) *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*, *Int. J.Syst. Evol. Microbiol.* 58:1409-1413.
- Lindström, K. & Young, J.P.W. (2009). International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Agrobacterium* and *Rhizobium*: Minutes of the meetings, 31 August 2008, Gent, Belgium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 921-922.
- Lindström, K.; Murwira, M.; Willems, A.; Altier, N. (2010). The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: The case of rhizobia. *Res. Microbiol.* 161 6: 453-463.
- Lira Jr, M. A.; Nascimento, L. R.; Fracetto, G. G. (2015). Legume-rhizobia signal exchange: promiscuity and environmental effects. *Front. Microbiol*, 6: 945
- Liu, J.; Wang, E. T.; 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.
- Lloret, L. & Martínez – Romero, E. (2005). Evolución y Filogenia de *Rhizobium*. *Rev Latinoam Microbiol.* 47 1-2: 43-60.
- Lodeiro, A.R.; Lopez-Garcia, S.L.; Vazquez, T.E.; Favelukes, G. (2000). Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin. *FEMS Microbiol. Lett* 188: 177-184.
- Lopez Sanches, L.; González, L.M.; Ramirez, R.; Cordoví, E; Gomez, I; Castillo, P. (2000) Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Rhizobium* aisladas de leguminosas praterenses en suelos afectados por la salinidad. *Pastos y forrajes.* 23 2: 0-5.
- Lorenzi, H. (2008). Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 640 pp.

- Loureiro, M.S.; Kaschuc, G.; Alberton, O.; Hungria, M. (2007). Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation managements. *Biol. Fertil. Soils*. 43: 665–674.
- Lu, J.K.; Dou, Y.J.; Zhu, Y.J.; Wang, S.K.; Sui, X.H.; 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.
- Mabood, F.; Souleimanov, A.; Khan, W.; Smith, D.L. (2006). Jasmonates induce Nod factor production by *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiol. Biochem.* 44: 759–765.
- MacLean, A.M.; Finan, T.M.; Sadowsky, M.J. (2007). Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. Review. *Plant Physiol.* Jun. 144 2: 615–22.
- Madsen, L.H.; Tirichine, L.; Jurkiewicz, A.; Sullivan, J.T.; Heckmann, A.B.; Bek, A.S.; Ronson, C.W.; James, E.K.; Stougaard, J. (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat. Commun* 1:10.
- Maldaner, J., Schwalbert, R.; Saldanha, C. W.; Conterato, I.F.; Kist Steffen, G.P.K. (2014) Procedimentos para cultivo *in vitro* de *Desmodium incanum*. *Encicl. Biosf. Centro Científico Conhecer – Goiânia.* 10 18: 2533-2542.
- Marcondes De Sousa, J.A.; Garrareto Alves, L.M.; De Mello Varani, A. (2014). The Family Bradyrhizobiaceae. In: *The Prokariotes. Alpha proteobacteria and Betaproteobacteria.* (Ed) Rosemberg E. Delong, E.F Lory, S. Stackebrand, E. Thompson, F. 135-154.
- Marie, C.; Deakin, W.J.; Viprey, V.; Kopcińska, J.; Golinowski, W.; Krishnan, H.B.; Perret, X.; Broughton, W.J. (2003). Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16 9: 743-751.
- Marques, M. A. J. & Paim, N. R. (1993). Características agronomicas e reprodutivas de espécies de *Desmodium Desv.* *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 28 4: 439-445.
- Marquina, M.E.; González, N.E.; Castro, Y. (2011) Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela *Rev. biol. Trop.* 59 3: 1017-1036.
- Martin, G. & Agüero, S. (2014). Los pastizales y el deterioro ambiental. Serie didáctica N°86. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán. 21p.

- Martínez, M.C.; Marcelo Helguera, M; Carrera, A. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Parte II: Capítulo 5: Marcadores Moleculares. Editores: G. Levitus; V. Echenique, C. Rubinstein; E. Hopp; Mroginski, L. Ediciones INTA. 70-85.
- Martínez-Romero, E. (2003). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant Soil* 252: 11-23.
- Martínez-Romero, E. (2009). Coevolution in *Rhizobium*-legume symbiosis? *DNA Cell Biol. Review.* 28 8: 361-70.
- Martínez-Romero, E. & Caballero-Mellado, J. (1996). *Rhizobium phylogenies* and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plant Sci.* 15: 113-140.
- Martínez-Romero, E. (1994). Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil.* 161: 11-20.
- Martínez-Romero, E.; Segovia, L.; Mercante, F.M.; Franco, A.A.; Graham, P.; Pardo, M.A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 41 3: 417-426.
- Medeiros, R. D.; Favareto R., Ferreira, O.; Siewerdt, L. (2006). Persistência de *Desmodium incanum* DC. ("pega-pega") em meio a cultivos agrícolas estabelecidos sobre campo nativo. *Pesq. Agrop. Gaúcha, Porto Alegre.* 12 1-2: 37-44.
- Medeot, D. B.; Bueno, M.A.; Dardanelli, M.S.; Lema, M.G. (2007). Adaptational changes in lipids of *Bradyrhizobium SEMIA 6144* nodulating peanut as a response to growth temperature and salinity. *Curr. Microbiol.*, 54: 31-35.
- Melchiorre, M.; De Luca, M. J.; Anta, G. G.; Suarez, P.; Lopez, C.; Lascano, R.; Racca, R. W. (2011). Evaluation of bradyrhizobia strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants. *Biology and Fertility of Soils.* 47 1: 81-89.
- Menezes, K.A.S.; Nunes, G.F.O.; Sampaio, A.A.; Silva, A.F.; Souza, L.S.B.; Gava, C.A.T.; Martins, L.M.V.; Fernandes-Júnior, P.I. (2016). Diversity of new root nodule bacteria from *Erythrina velutina* willd., a native legume from the dry forest Caatinga (Northeastern, Brazil). *Rev Cienc Agrár.* 39: 222-33.
- Menna, P.; Hungria, M.; Barcellos, F.G.; Bangel, E.V.; Hess, P.N.; Martinez-Romero, E. (2006). Molecular phylogeny base don the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 315-332.
- Michiels, J.; Dombrecht, B.; Vermeiren, N.; Xi, C.; Luyten, E.; Vanderleyden, J. (1998). *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microb. Ecol.* 26: 193-205.

- Michiels, J.; Verte, C.; Vanderleyden, J. (1994). Effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium strains*. Appl. Environ. Microbiol. 60:1206–1212.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Provincia de Santa Fe (MAG). (1982). Toma de muestras y Determinaciones Analíticas en Suelos y Aguas de Santa Fe. Dirección General de Extensión e Investigaciones Agropecuarias. 152 pp
- Miranda-Sánchez, F.; Rivera, J.; Vinuesa, P. (2016). Diversity patterns of Rhizobiaceae communities inhabiting soils, root surfaces and nodules reveal a strong selection of rhizobial partners by legumes. Environ. Microbiol. 18 8: 2375-2391.
- Mohammadi, K.; Sohrabi, Y.; Heidari, G.; Khalesro, S.; Majidi, M. (2012). Effective factors on biological nitrogen fixation. Afr. J. Agric. Res. 7: 1782-88.
- Molouba, F.; Lorquin, J.; Willems, A.; Hoste, B.; Giraud, E.; Dreyfus, B.; Gillis, M.; de Lajudie, P.; Masson-Boivin, C. (1999). Photosynthetic *Bradyrhizobia* from *Aeschynomene* spp. are specific to stem-nodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3084-3094.
- Montañez, A.; Danso, S.K.A.; Hardarson, G. (1995). The effect of temperature on nodulation and nitrogen fixation by five *Bradyrhizobium japonicum* strains. Appl. Soil. Ecol. 2:165-174.
- Morris, J.B.; Wang, M.L.; Tonniss, B. (2014). *Desmodium* genetic resources for improving flavonoid concentrations, oil content and fatty acid compositions. Plant Genet. Resour. 12 01: 120-128.
- Moulin, L.; Munive, A.; Dreyfus, B.; Bolvin-Masson, C. (2001) Nodulation of legumes by members of the b sub-class of Proteobacteri. Nature. 411: 948–950.
- Mpepereki, S.; Makonese, F.; Wollum, A.G. (1997). Physiological characterization of a indigenous rhizobia nodulating *Vigna unguiculata* in Zimbabwean soils. Symbiosis. 22: 275-292.
- Mpepereki, S.; Wollum, A.G.; Maconese, F. (1996). Growth temperature characteristics of indigenous *Rhizobium* and *Brad yrhizobium* isolates from zimbabwean soils. Soil Biol. Biochem. 28: 1537-1539.
- Mtambanengwe, F.; Mapfumo, P.; Kirchmann, H. (2004). Decomposition of organic matter in soil as influenced by texture and pore size distribution. In: Bationo A (eds). Managing nutrient cycles to sustain soil fertility in sub-Saharan Africa 608.

- Muller, J.; Boller, T.; Wiemken, A. (2001). Trehalose becomes the most abundant nonstructural carbohydrate during senescence of soybean nodules. *J. Exp. Bot.* 52: 943-947.
- Nabizadeh, E.; Jalilnejad, N.; Armakani, M. (2011). Effect of salinity on growth and nitrogen fixation of alfalfa (*Medicago sativa*). *World Appl. Sci. J.* 13: 1895-1900.
- Nelson, M.S. & Sadowsky, M.J. (2015) Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. Review. *Front. Plant Sci.* 6: 491.
- Ngwu, O.E. (2005) Comparative studies of nitrogen fixing potential of *Desmodium ramississimon* and *Vigna unguiculata* for soil fertility management. *Tropicicultura.Bélgica.* 23 2: 110-116.
- Niste, M.; Vidican, R.; Rodica Pop; Rota I. (2013). Stress Factors Affecting Symbiosis Activity and Nitrogen Fixation by *Rhizobium* Cultured in Vitro. *ProEnvironment. Cluj-Napoca, Romania.* 6: 42 - 45.
- Ogola, A. H.; Odhiambo, G. D.; Okalebo, J. R.; Muyekho, F. N. (2012) Influence of phosphorus on selected *Desmodium* growth and nodulation parameters ARP. *J. Agr. Biol. Science* 7 5: 294-301.
- O'Hara, G.W.; Dilworth, M.J.; Boonkerd, N.; Parpian, P. (1988). Iron deficiency specifically limits nodule development in peanut inoculated with *Bradyrhizobium* sp. *New Phytologist* 108: 51-57.
- Ohashi, H. (2005) Tribe Desmodieae. In: Lewis, G.P.; Schrire, B.; Mackinder, B. & Look, M. (Eds.) *Legumes of the world.* Kew: Royal Bot. Gard. p 433-453.
- Ohashi, H.; Polhill, R.M.; Schubert, B.G. (1981). *Desmodieae*. In: Raven, P.H. & Polhill, R.M. (Eds) *Advances in legume systematics* kew: Royal Bot. Gard. 1: 292-300.
- Ohta, H. & Hattori, T. (1983). *Agromonas oligotrophica* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing oligotrophic bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 49 4-5:429-46.
- Okalebo, P.L.; Woomer, C.O.; Othieno, S.O.; Gudu, A.O.; Nekesa, P.O.; Kisinyo, W.; Ngetich, D.; Lesueur, P.; Pypers, B.; Vanleuwe, R.; Merckx, C.; Serem, J.; Bashir, D.; Mbakaya, B.; Amar, A.; Ekwamu, M.; Bekunda, J.; O.; Osundwa, M.A. (2009). Some current efforts to raise maize and grain legume yields through expanded fertilizer and agricultural lime. Applications on Acid Soils of W. Kenya. 25th Conference of Soil Science Society of East Africa. Moshi, Tanzania.
- Okazaki, S.; Noisangiam, R.; Okubo, T.; Kaneko, T.; Oshima, K.; Hattori, M.; Teamtisong, K.; Songwattana, P.; Tittabutr, P.; Boonkerd, N.; Saeki, K.; Sato, S.;

- Uchiumi, T.; Minamisawa, K.; Teaumroong, N. (2015). Genome analysis of a novel *Bradyrhizobium* sp. DOA9 carrying a symbiotic plasmid. PLoS One. 10 2:e0117392.
- Oldroyd, G.E. & Downie, J.A. (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. Review. Annu. Rev. Plant Biol. 59: 519-46.
- Oldroyd, G.E. (2007). Plant science. Nodules and hormones. Science 315: 52-53.
- Oldroyd, G.E.D.; Murray, J.D.; Poole, P.S.; Downie, J.A., (2011). The rules of engagement in the *legume-rhizobial* symbiosis. Annu. Rev. Genet. 45: 119-144.
- Olivares J, Bedmar, E.J.; Sanjuán J. (2013). Biological nitrogen fixation in the context of global change. Mol. Plant Microbe In. 26: 486-494.
- Oliveira, W.S.D.; Meinhardt, L.W.; Sessitsch, A.; Tsai, S.M. (1998). Analysis of Phaseolus-Rhizobium interactions in a subsistence farming system. Plant Soil. 204:107-115. En: Simms, E.L. & D. L. Taylor. 2002. Partner Choice in Nitrogen-Fixation Mutualisms of Legumes and Rhizobia. Integ. Comp. Biol., 42: 369-380.
- Overbeck, G.E.; Müller, S.C.; Fidelis, A.; Pfadenhauer, J.; Pillar, V.D.; Blanco, C.C.; Boldrini, I.I.; Both, R.; Forneck, E.D. (2007) Brazil's neglected biome: the south Brazilian campos. Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst. 9 2: 101-116.
- Paffetti, D.; Scotti, C.; Gnocchi, S.; Fancelli, S.; Bazzicalupo, M. (1996). Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. Appl. Environm. Microbiol. 62 7: 2279-2285.
- Palmer, K. M. & Young, J. P. W. (2000). Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations in arable soils than in grass soils. Appl. Env.l Microbiol. 66 6: 2445-2450.
- Panigatti, J.L. (2010). Argentina 200 años, 200 suelos. Ilustraciones y cuadros. Ed. INTA Buenos Aires. 345pp.
- Pankhurst, C.E. & Gipson, A.H. (1973) *Rhizobium* strain influence on disruption of clover nodule development at high temperature. J. Gen. Microbiol. 74: 219-231.
- Parker, M.A. (1999). Relationships of bradyrhizobia from the legumes *Apios americana* and *Desmodium glutinosum*. Appl. Environ. Microbiol. 65 11: 4914-20.
- Parker, M.A. (2002) Bradyrhizobia from wild *Phaseolus*, *Desmodium*, and *Macroptillium* species in northern Mexico. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2044 -2048.
- Parker, M.A. (2003) A widespread neotropical *Bradyrhizobium* lineage associated with *Macherium* and *Desmodium* (Papilionoideae). Plant Soil 254: 263 -268.
- Parker, M.A. (2012) Legumes select symbiosis island sequence variants in *Bradyrhizobium*. Mol. Ecol. 21:1769-78.

- Parker, M.A. & Rousteau, A. (2014). Mosaic origins of *Bradyrhizobium* legume symbionts on the Caribbean island of Guadeloupe. *Mol. Phylogenet. Evol.* 77:110 - 115.
- Parker, M.A.; Jankowiak, J.G.; Landrigan, G.K. (2015) Diversifying selection by Desmodiinae legume species on *Bradyrhizobium* symbionts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91 7.
- Parniske, M. & Downie, J.A. (2003) Plant biology: locks, keys and symbioses. *Nature* 425: 569-570.
- 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.; 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 4: 1213-1219.
- Peix, A.; Ramírez-Bahena, M.H.; Velázquez, E.; Bedmar, E.J. (2015). Bacterial associations with Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34: 17-42.
- Perret, X.; Staehelin, C.; Broughton, W.J. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity, *Microbiol. Mol. Biol. R.* 64: 180-201.
- Phillips, D.A.; Joseph, C.M.; Maxwell, C.A. (1992) Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*, *Plant Physiol.* 99: 1526–1531.
- Pickett, J.A.; Hamilton, M.L.; Hooper, A.M.; Khan, Z.R.; Midega, C.A.O. (2010). Companion cropping to manage Parasitic plants *Annun. Rev. Phytopatol.* 48:161-177.
- Pistorio, M. Giusti, M.A.; Del Papa, M.F.; Draghi, W.O.; Lozano, M.J.; Tejerizo, G.T.; Lagares, A. (2008). Conjugal properties of the *Sinorhizobium meliloti* plasmid mobilome. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65 3: 372-382.
- Puhua, H.; Ohashi, H.; Iokawa, Y.; Remoto, T. (2010). Tribe Desmodieae. In: Wu ZY, Raven PH, Hong D.Y. (Eds), *Flora of China*. Vol. 10 (Fabaceae). Science Press, Beijing, and Mo. Bot. Gard. Press St. Louis. 262-311.
- Puppo, A.; Groten, K.; Bastian, F.; Carzaniga, R.; Soussi, M.; Lucas, M.M.; de Felipe, M.R.; Harrison, J.; Vanacker, H.; Foyer, C.H. (2005). Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *Review. New Phytol.* 165 3: 683-701.
- Rademaker, J. L.; Hoste, B.; Louws, F. J.; Kersters, K.; Swings, J.; Vauterin, L.; de Bruijn, F. J. (2000). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with

- DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 2: 665-677.
- Ramírez-Bahena, M.H.; Chahboune, R.; Peix, A.; Velázquez, E. (2013). Reclassification of *Agromonas oligotrophica* into the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium oligotrophicum* comb. nov. *International J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 1013–1016.
- Ramírez-Bahena, M.H.; Peix, A.; Rivas, R.; Camacho, M.; Rodríguez-Navarro, D.N.; Mateos, P.F.; Martínez-Molina, E.; Willems, A.; 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 8: 1929-1934.
- Raymond, J.; Siefert, J.; Staples, C.; Blankenship, R. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* 21: 541-554.
- Regensburger, B., & Hennecke, H. (1983). RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Archv. Microbiol.* 135 2: 103-109.
- Ribeiro, R.C.; Rossiello, R.P.; Macedo, R.O.; Barbieri, E.Jr. (2007). Introdução de *Desmodium* em pastagens estabelecidas de *Brachiaria humidicola*: densidade e frequência da leguminosa no consórcio. *Revista da Universidade Rural, Série Ciencia da Vida*, 27: 41-49.
- Ridzwan, A.B.D.H. & Othman, S. (1982). Establishment of *Desmodium ovalifolium* on an ultisol. *Pertanika* 5 1: 53-57.
- Rivas, R., Martens, M., De Lajudie, P., Willems, A. (2009). Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. *Syst. Appl. Microbiol.* 32(2), 101-110.
- Rivas, R.; Willems, A.; Palomo, J.L.; García-Benavides, P.; Mateos, P.F.; Martínez-Molina, E.; Gillis, M.; Velázquez, E. (2004) *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1271-1275.
- Robinson, J.B. & Bauer, W.D. (1993). Relationships between C-4 dicarboxylic acid transport and chemotaxis in *Rhizobium melilotii*. *J. Bacteriol.* 175: 2284-2291.
- Rhizobium cellulase* CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105: 7064-7069.
- Rodríguez-Navarro, D.N.; Dardanelli, M.S.; Ruíz-Saínz, J.E. (2007) Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *Review. FEMS Microbiol. Lett.* 272 2: 127-36.
- Rogel, M. A.; Ormeno-Orrillo, E.; Romero, E. M. (2011). Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* 34 2: 96-104.

- Rosenthal, A.; Coutelle, O.; Craxton, M. (1993) Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Res.* 21: 173-174.
- Rudiger, H. & Gabius, H.J. (2001) Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications, *Glycoconjugate J.* 18: 589–613.
- Ruzin, S.E. (1999). *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, New York, 322 pp.
- Saffert, R. T.; Cunningham, S. A.; Ihde, S. M.; Jobe, K. E. M.; Mandrekar, J.; Patel, R. (2011). Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol.* 49 3: 887-892.
- Sahlman, K. & Fåhraeus, G. (1963). An electron microscope study of root-hair infection by *Rhizobium*. *Microbiol.* 33 3: 425-427.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol.Evol.* 4 4: 406-425.
- Sánchez-Juanes, F.; Ferreira, L.; de la Vega, P.A.; Valverde, A.; Barrios, M.L.; Rivas, R.; Mateos, P.F.; Martínez-Molina, E.; González-Buitrago, J.M.; Trujillo, M.E. (2013) MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of *Bradyrhizobium* species: application to the identification of *Lupinus* nodulating strains. *Syst. Appl. Microbiol.* 36 8: 565-71.
- Sanpedro, D; Vogel, O.; Celsler, R. (2004). Suplementación de vacunos en pastizales naturales. Sitio Argentino de Producción Animal. Serie Técnica N° 34. www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica.
- Santos, L. C.; Venturini, M. T.; de Moraes Pinheiro, C.; Gross, E. (2014). Growth and mineral composition of tropical forage legumes inoculated with rhizobia. *Braz. J aAgric.-Revista de Agricultura*, 89 3: 252-262.
- Sarr, P. S.; Araki, S.; Begoude, D. A.; Yemefack, M.; Manga, G. A.; Yamakawa, T.; Htwe, A. Z. (2016). Phylogeny and nitrogen fixation potential of *Bradyrhizobium* species isolated from the legume cover crop *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth. in Eastern Cameroon. *Soil Sci. Plant Nutr.* 62 1: 13-19.
- Sarr, P. S.; Yamakawa, T.; Fujimoto, S.; Saeki, Y.; Thao, H. T.; Myint, A. K. (2009). Phylogenetic diversity and symbiotic effectiveness of root-nodulating bacteria associated with cowpea in the south-west area of Japan. *Microbes Environ.* 24 2: 105-112.

- Scandaliaris, M; Moninelli, M.L.; Lovey, R.J.; Perissé, P. (2013) Caracterización morfoanatómica de fruto, semilla y plántula de *Desmodium incanum* DC. (Fabaceae: Faboideae: Desmodieae) *Arnaldoa* 20 1: 45 - 58.
- Schlueter, P.M. & Harris, S.A. (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes* 6 2: 569-72.
- Schubert, B.G. (1980). Flora of Panama. Part V, Fascicle 5. Family 83. Leguminosae, Subfamily Papilionoidae (Conclusion). 18. *Desmodium* Ann. Miss. Bot. Gard . 67 : 622-662.
- Schwalbert, R. I.; Maldaner, J.; Schwalbert, R. I. A.; da Silva, L. O. S.; Steffen, G. P. K.; Steffen, R. B. (2016). Optimization of culture media for *Desmodium incanum* micropropagation. *Afr. J Agric. Res.*11 12: 1062-1070.
- Shamseldin, A.; Abdelkhalek, A.; Sadowsky, M. J. (2017). Recent changes to the classification of symbiotic, nitrogen-fixing, legume-associating bacteria: a review. *Symbiosis*, 71 2: 91-109.
- Sheokand, S.; Dudeja, S.S.; Swaraj, K. (2012). Nitrogen fixation in tropical environments—Adaptive responses and benefits. *Res. Crops.* 13 2: 743-753.
- Shetta, N. D.; Al-Shaharani, T. S.; Abdel-Aal, M. (2011). Identification and characterization of Rhizobium associated with woody legume trees grown under Saudi Arabia condition. *Am Eurasian J Agric. Environ. Sci.* 10 3: 410-418.
- Silva, F.; de Meyer, S.; Simoes-Araujo, J.L.; da Costa Barbé, T.; Xavier, G.R.; O'Hara, G.; Ardley, J.K.; Rumjanek, M.G.; Willems, A.; 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 7: 2358-2363.
- Silva, N.C.; Franke, L.B.; Nabinger, C.; Barreto, R. (2001). Produção e particao da biomassa de *Desmodium incanum* em resposta a aplicacao de fósforo. *Pesqu. Agropec. Bras.* Brasília, 36, 3: 541-548.
- Simms, S.E. & Taylor, D.L. (2002). Partner Choice in Nitrogen-Fixation Mutualisms of Legumes and Rhizobia. *Integ. Comp. Biol.* 42: 369-380.
- Singleton, P.W.; Swaify, S.A.; Bohlool, B.B. (1982). Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Appl. Env. Microbiol.* Washington, 44 4: 884 – 890.
- Skerman, P.J.; Cameron, D.G.; Riveros, F. (1988) Tropical forage legumes. FAO Plant production and protection series No. 2. (FAO: Rome).

- Skerman, P.J.; Cameron, D.G.; Riveros, F. (1991). Leguminosas Prateses Tropicales. In: Leguminosas Forrajeras Tropicales. FAO: Producción y Protección vegetal. N°2 Roma. 707 pp.
- Somasegaran, P. & Hoben, H.J. (2012). Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology. S. S. & B. Media., ed.
- Somasegaran, P. & Hoben, H.J. (1994) Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology. Springer-Verlag Eds., New York, p. 450.
- Somasegaran, P. & Hoben, H. J. (1985). Methods in legume-*Rhizobium* technology. NifTAL Project and MIRCEN.
- Sprent, J.I. (2009). Legume nodulation a global perspective. Wiley-Blackwell: Chichester, UK
- Sprent, J.I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist* 174: 11-25.
- Stoodley, P.; Saber, K.; Davies, D.G.; Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev. Microbiol.* 56: 187-209.
- Streeter, J.G. (2003). Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *J. Appl. Microbiol.* 95: 484-491.
- Streeter, J.G. (2003). Effects of drought on nitrogen fixation in soybean root nodules. *Plant Cell Environ.* 26: 1199-1204.
- Subramanian, S.; Stacey, G.; Yu, O. (2007). Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends Plant Sci.* 12: 282-285.
- Sullivan, J.T.; Patrick, H.N.; Lowther, W.L.; Scott, D.B.; Ronson, C.W. (1995). Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8885-8889.
- Taiwo, L.B.; Nworgu, F.C.; Adatayo, O.B. (1999). Effect of *Bradyrhizobium* inoculation and phosphorus fertilization on growth, nitrogen fixation and yield of promiscuously nodulating soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) *Trop. Soil. Crop. Res.* 18: 169-177. En: Simms, E.L. & D. L. Taylor. 2002. Partner Choice in Nitrogen-Fixation Mutualisms of Legumes and Rhizobia. *Integ. Comp. Biol.*, 42: 369-380.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.

- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10 3: 512-526.
- Tang, M.; Menéndez, M.; Gazó, J.; Ramírez, P.; Guevara, R. (1992). Selección de cepas efectivas de rizobio en cilindros con suelo no disturbado en leguminosas tropicales. II. Suelo pardo sin carbonatos. *Pastos y Forrajes*, 15. 2: 132-136.
- Tang, M.; Menéndez, J.; F. Ramírez, F.; Guevara, R. (1990) Estudio de la modulación natural de leguminosas tropicales. II Matanzas y Camagüey. *Pastos y Forrajes*. 13 3: 1-5.
- Tarré, R.; Macedo, R.; Cantarutti, R.B.; De Rezende, C.P.; Pereira, J.M.; Ferreira, E.; Alves, B.J.R.; Urquiaga, S.; Boddey, R.M. (2001) The effect of the presence of a forage legume on nitrogen and carbon levels in soils under *Brachiaria* pastures in the Atlantic forest region of the South of Bahia, Brazil. *Plant Soil* 234 1: 15–26.
- Thies, J. E.; Bohlool, B.B.; Singleton, P.W. (1991). Subgroups of the cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea*, and *Macroptilium atropurpureum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 1540-1545.
- Thomas-Oates, J.; Bereszcak, J.; Edwards, E.; Gill, A.; Noreen, S.; Zhou, J.C.; Chen, M.Z.; Miao, L.H.; Xie, F.L.; Yang, J.K.; Zhou, Q. (2003). A catalogue of molecular, physiological and symbiotic properties of soybean-nodulating rhizobial strains from different soybean cropping areas of China. *Syst. Appl. Microbiol.* 26 3: 453-465.
- Thompson, J. D.; D.; Higgins, D.J.; Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Thrall, P.H.; Bever, J.D.; Slattery, J.F. (2008). Rhizobial mediation of Acacia adaptation to soil salinity: evidence of underlying trade-offs and tests of expected pattern. *J. Ecol.* pp. 1365-2745.
- Tiemann, T.T.; Franco, L.H.; Peters, M.; Frossard, E.; Kreuzer, M.; Lascano, C.E.; Hess, H.-D. (2009) Effect of season, soil type and fertilizer on the biomass production and chemical composition of five tropical shrub legumes with forage potential. *Grass Forage Sci.* 64 3: 255-65.
- Torres Tejerizo, G.; Rogel, M.A.; Ormeño-Orrillo, E.; Althabegoiti, M.J.; Nilsson, J.F.; Niehaus, K.; Schlüter, A.; Pühler, A.; Del Papa, M.F.; Lagares, A.; Martínez-Romero,

- E.; Pistorio, M. (2016) *Rhizobium favelukesii* sp. nov., isolated from the root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L). *Int J Syst. Evol. Microbiol.* 66 11: 4451-4457.
- Trujillo, M. E.; Willens, A.; Abril, A.; Planchuelo, A.; Rivas, R.; Ludeña, D.; Mateos, P.F.; Martínez-Molina, E. (2005) Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupine* sp. nov., *Appl. Env. Microbiol.* 71: 1318–1327.
- Van Berkum, P.; Leibold, J.M.; Eardly, B.D. (2006). Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsch and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.) *Syst. Appl. Microbiol.* 29 3: 207-15.
- Van Rhijn, P.; Goldberg, R.B.; Hirsch, A.M. (1998). *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell* 10:1233 - 1250.
- Vance CP. (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources.* *Plant physiol.* 127: 390-397.
- Vance, C.P.; Uhde-Stone, C.; Allan, D.L. (2003). Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157: 423-47.
- Vanderlinde, E. M.; Harrison, J. J.; Muszyński, A.; Carlson, R. W.; Turner, R. J.; Yost, C. K. (2010). Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841. *FEMS Microbiol. Ecol.* 71 3: 327-340.
- Vanni, R. O. (2008). Tribu Desmodieae. En: Zuloaga, F. O.; O. Morrone & M. J. Belgrano (eds.). 23622392. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). *Monographs in Syst. Bot. The Mo. Bot. Gard. Press, St. Louis, U.S.A*
- Vanni, R.O. (2001). El género *Desmodium* (*Leguminosae, Desmodieae*) en Argentina. *Darviniana* 39 3-4: 255-285.
- Vasey, E.A.; Ghisi, O.M.M.A.; Valarini, M.J.; Otsuk, I.P.; Cadelli, M.A.; Sanchez, M.J. F.; Beisman, D.A. (1997) Early growth and native nodulation of leguminous shrub and tree species in Brazil. *Trop. Grass.* 31: 40-48.
- Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupski, J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to DNA fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19:6823-6831.

- Versalovic, J.; Schneider, M.; De Bruijn, F.; Lupski, J. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40.
- Vinardell, J.M.; Fedorova, E.; Cebolla, A.; Kevei, Z.; Horvath, G.; Kelemen, Z.; Tarayre, S.; Roudier, F.; Mergaert, P.; Kondorosi, A.; Kondorosi, E. (2003). Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell.* 15 9: 2093-105.
- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. IBP Handbook No 15. Blackwell scientific Publications, Oxford, United Kingdom. 164pp.
- Vinuesa, P.; León-Barrios, M.; Silva, C.; Willems, A.; Jarabo-Lorenzo, A.; Pérez-Galdona, R.; Werner, D.; Martínez-Romero, E. (2005 a) *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 a* and *Bradyrhizobium genospecies b'*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 569–575.
- Vitousek, P.M.; Menge, D.N.; Reed, S.C.; Cleveland, C.C. (2013). Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philos. T R Soc. B:* 368 1621: 20130119.
- Vlassak, K. M. E.; Luyten, C.; Verreth, P.; van Rhijn, T.; Bisseling, J.; Vanderleyden (1998). The *Rhizobium* sp. BR816 *nodO* Gene Can Function as a Determinant for Nodulation of *Leucaena leucocephala*, *Phaseolus vulgaris*, and *Trifolium repens* by a Diversity of *Rhizobium* spp. *Mol. Plant Microbe In.* 11 5: 383-392.
- Wagner, S.C. (2011). Biological nitrogen fixation. *Nat. Educ. Knowl* 2: 14.
- Walkley, A. & Black, I.A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Sci.* 63: 251–263.
- Wang, E. & Martínez-Romero, E. (2000). Phylogeny of root and stem nodule bacteria associated with legumes. En: *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process*. Triplet, E. ed. Horizon Scientific Press. Madison, Wisconsin. 177-186.
- Wang, J.Y.; Wang, R.; Zhang, Y.M.; Liu, H.C.; Chen, W.F.; Wang, E.T.; Sui1, X.H. ; Chen, W.X. (2013). *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. *In. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 616–624.

- Wang, R.; Chang, Y.L.; Zheng, W.T.; Zhang, D.; Zhang, X.X.; Sui, X.H.; Wang, E.T.; Hu, J.Q.; Zhang, L.Y.; Chen, W.X. (2013). *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. Syst. Appl. Microbiol. 36 2: 101-105.
- Wasternack, C. & Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in Annals of Botany. Review. Ann Bot. 111 6:1021-58.
- Waterer, J.G. & Vessey, J.K. (1993). Effect of low static nitrate concentrations on mineral nitrogen uptake, nodulation, and nitrogen fixation in field pea. J Plant Nutr. Winnipeg, 16: 1775-1789.
- Webster, N. S.; Luter, H. M.; Soo, R. M.; Botté, E. S.; Simister, R. L.; Abdo, D.; Whalan, S. (2013). Same, same but different: symbiotic bacterial associations in GBR sponges. Front Microbiol. 3 444.
- Wei, G.H.; Yang, X.Y.; Zhang, Z.X.; Yang, Y.Z.; Lindstrom, K. (2008). Strain *Mesorhizobium* sp. CCNWGX035; A stress tolerant isolate from *Glycyrrhiza glabra* displaying a wide host range of nodulation. Pedosphere. 18 1: 102-112.
- Weidner, S.; Arnold, W.; Puhler, A. (1996) Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rDNA genes. Appl. Environ. Microbiol. 62: 766-771.
- Weir, B. S. (2012). The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>.
- Weisburg, W. G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J.. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173:697-703.
- Welker, M. & Moore, E. R. B. (2011) Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. Syst. Appl. Microbiol. 34:2-11.
- Willems, A.; Coopman, R; Gillis, M. (2001) Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 111-117.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids. Res. 18: 6531-6535.
- Woomer, P; Singleton, P.W.; Bohlool, B.B. (1988). Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. Appl. Environ. Microbiol. 54 5: 1112-1116.

- Xavier, G.R.; Martins, L.M.; Rumjanek, N.G.; Neves, M.C.P. (2007) Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição in vitro. *Caatinga*. 20:1-9.
- Xu, K.W.; Zou, L.; Penttinen, P.; Zeng, X.; Liu, M.; Zhao, K.; Chen, C.; Chen, Y.X.; Zhang, X. (2016). Diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Desmodium* spp. in Panxi, Sichuan, China. *Syst. Appl. Microbiol.* 39 1: 33-40.
- Xu, L.M.; Ge, C.; Cui, Z.; Li, J.; Fan, H. (1995) *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 706–711.
- Xueqin, M.A.; Zheng, Ch.; Hu, Ch.; Rahman, K.; Qin, L. (2011). The genus *Desmodium* (*Fabaceae*)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 138 2: 314-332.
- Yadav, A.; Singh, A.L.; Kumar, A.; Singh, A.K.; Pandey, K.D. and Singh, M. (2015) Rhizobium-legumes symbiosis and effects of environmental stresses in the simbiosis. *Microbes in soil and their agriculture prospects* Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY 11788-3619, USA Editor: K.K. Choudhary 12pp.
- Yan, J.; Han, X. Z.; Ji, Z. J.; Li, Y.; Wang, E. T.; Xie, Z. H.; Chen, W. F. (2014). Abundance and diversity of soybean-nodulating rhizobia in black soil are impacted by land use and crop management. *Appl. Environm. Microbiol.* 80 17: 5394–5402.
- Yao, Y; Sui, X.H.; Zhang, X.X.; Wang, E.T.; Chen, W.X. (2015). *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov. and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov. , isolated from effective nodules of *Erythrophleum fordii*. In. *J.Syst. Evol. Microbiol.* pII: ijs.0.000183.
- Yao, Z.Y.; Kan, F.L.; Wang, E.T.; Chen, W.X. (2002) Characterization of rhizobia that nodulate legume species within the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 2219-2230.
- Young, J.P.W.; Downer, H.L.; Eardly, B.D. (1991). Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by Polymerase Chain Reaction-based secuencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* 173: 2271-2277.
- Young, J.M.; Kuykendall, L.D.; Martínez-Romero, E.; Kerr, A.; Sawada, H. (2001) A 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: 89103.

- Youseif, S.H.; Fayrouz, H.; El-Megeed, A.; Ageez, A.; Mohamed, Z.K.; Shamseldin, A.; Saleh, S.A. (2014). Phenotypic characteristics and genetic diversity of rhizobia nodulating soybean in Egyptian soils. *Eur. J Soil Biol.* 60: 34-43.
- Yu, X.; Cloutier, S.; Tambong, J.T.; Bromfield, E.S.P. (2014). *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., a symbiotic nitrogen fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada. In. *J Syst. Evol. Microbiol.* 64: 3202-3207.
- Zahran, H.H. (1991). Conditions for successful Rhizobium-legume symbiosis in saline environments. *Biol. Fertil. Soils* 12: 73–80.
- 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.
- Zhang, J.; Subramanian, S.; Zhang, Y.; Yu, O. (2007). Flavone synthases from *Medicago truncatula* are flavanone-2-hydroxylases and are important for nodulation. *Plant Physiol.* 144: 741-751.
- Zhang, Y.M.; Li, Y.Jr.; Chen, W.F.; Wang, E.T.; Sui, X.H.; Li, Q.Q.; Zhang, Y.Z.; Zhou, Y.G.; Chen, W.X. (2012) *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. *Int. J Syst. Evol. Microbiol.* 62: 1951-1957.
- Zilli, J.E.; Baraúna, A.C.; da Silva, K.; de Meyer, S.E.; Farias, E.N.; Kaminski, P.E., da Costa, I.B.; Ardley, J.K.; Willems, A.; Camacho, N.N.; Dourado Fdos, S.; O'Hara, G. (2014). *Bradyrhizobium neotropicale* sp. nov., isolated from effective nodules of *Centrolobium paraense*. In. *J Syst. Evol. Microbiol.* 64 12: 3950-3957.
- Zuloaga, F. & Morrone, O. (1999). Catálogo de Plantas Vasculares de la República Argentina. Volumen 2. Mo Bot. Garden Press. 621pp.