



mec
MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA



Facultad de Ciencias
Universidad de la República



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

Facultad de Ciencias
Licenciatura en Ciencias Biológicas
Orientación Microbiología

**Estudio de la nodulación en una
colección de simbiontes de
Parapiptadenia rigida (Angico)**

Cintia Mareque

Tutor: Dr. Federico Battistoni
Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana Instituto
de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable"- MEC

Tribunal: Dr. Jorge Monza
Dra. Alicia Arias

Julio 2011

Agradecimientos

En primer lugar a Fede, por una excelente tutoría, la paciencia (que fue mucha), la confianza y las rapidísimas correcciones. También a Elena, por la oportunidad y las enriquecedoras correcciones. Como olvidarme de Ceci por la "tutoría" y las miles de preguntas que hice una y mas veces, y seguiré haciendo.

A los integrantes del laboratorio ex-Bioquímica del IIBCE, por las experiencias compartidas, a las nenas en especial.

Sin duda a mis padres, hermanos y demás familia por siempre estar ahí y el apoyo. A los amigos de facultad, que compartimos muuuuchísimas horas juntos. A mis amigas de siempre, por seguir insistiendo.

A Martín en especial por lo compartido, el aguante, las horas de estudios y todas las veces que me escucho y ayudo a ver desde otra perspectiva que no era tan grave.

A todos los que aportaron su granito de arena para ayudarme a finalizar esta etapa,

¡¡Muchísimas gracias!!

Índice

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO.....	2
1.1.1. Ciclo del N.....	2
1.1.2. Biodisponibilidad del nitrógeno.....	2
1.1.3. Nitrogenasa.....	3
1.1.4. Bacterias fijadoras de nitrógeno: los "beta-rizobios".....	5
1.1.5. Filogenia y transferencia horizontal de genes.....	6
1.1.6. Leguminosas.....	7
1.1.7. FBN en leguminosas arbóreas.....	8
1.2. INTERACCIÓN BACTERIAS FBN-LEGUMINOSAS.....	9
1.2.1. Diálogo molecular.....	9
1.2.2. Formación de nódulo.....	11
1.3. MODELO.....	13
1.3.1. Angico y sus bacterias simbiotes.....	13
1.4. ANTECEDENTES.....	15
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. Bacterias y medios de cultivos.....	17
3.1.1. Cepas bacterianas.....	17
3.1.2. Medios de cultivo.....	18
3.2. Extracción de ADN.....	18
3.2.1. A partir de lisado de colonia.....	18
3.2.2. A partir de cultivo en medio líquido.....	18
3.3. Estudio de la filogenia de los genes <i>nodA</i> y <i>nodC</i>	19

3.3.1. Amplificación de las secuencias codificantes	19
3.3.2. Secuenciación de los amplicones	20
3.3.3. Construcción del árbol filogenético.....	20
3.4. Ensayos de cinética de nodulación	21
3.4.1. Esterilización y germinación de semillas	21
3.4.2. Ensayos en plantas en condiciones gnotobióticas	21
3.5. Ensayo de reducción de acetileno (ARA).....	22
4. RESULTADOS.....	24
4.1. Estudio de la filogenia de los genes <i>nodA</i> y <i>nodC</i>	24
4.1.1. Amplificación de las secuencias codificantes de los genes <i>nodA</i> y <i>nodC</i>	24
4.1.2. Construcción del árbol filogenético de los genes <i>nodA</i> y <i>nodC</i>	25
4.2. Ensayos de cinética de nodulación	28
4.2.1. Esterilización y germinación de semillas	28
4.2.2. Ensayos de cinética de nodulación en plantas en condiciones gnotobióticas	29
4.3. Estudio de la capacidad FBN en vida libre	34
5. DISCUSIÓN	36
5.1. Amplificación de los genes involucrados en la nodulación: genes <i>nod</i>	36
5.2. Filogenia de los genes <i>nodA</i> y <i>nodC</i>	37
5.3. Cinética de nodulación	39
5.4. Estudios de FBN en vida libre	40
6. PERSPECTIVAS	42
7. ANEXO 1:	43
7.1. Medios de cultivo.....	43
7.1.1. Solución de micronutrientes	45
7.1.2. Solución de vitaminas	46
7.2. Buffers	46

8. BIBLIOGRAFÍA	47
-----------------------	----

Índice de Tablas

Tabla 1: Principales características y referencias de las cepas utilizadas	17
Tabla 2: Cebadores utilizados para la amplificación de los genes <i>nodA</i> y <i>nodC</i>	19
Tabla 3: Variables estudiadas en ensayo ARA	23
Tabla 4: Amplificación de los genes <i>nodA</i> y <i>nodC</i> en las cepas de la colección	25
Tabla 5: Crecimiento bacteriano característico en película en medios de cultivo semisólidos sin N	35

Índice de Figuras

Figura 1: Ciclo del nitrógeno.	3
Figura 2: Estructura de la nitrogenasa.....	4
Figura 3: Estructura general de los flavonoides y de los Factores Nod.....	9
Figura 4: Tres etapas de la simbiosis rizobio-leguminosa	11
Figura 5: Invasión de la raíz por <i>Sinorhizobium meliloti</i>	12
Figura 6: Endocitosis y diferenciación a bacteroide.....	12
Figura 7: <i>Parapiptadenia rigida</i> en distintos entornos	13
Figura 8: Características generales de <i>P. rigida</i>	14
Figura 9: Amplificación por PCR de los genes <i>nodA</i> y <i>nodC</i> en la colección de simbioses de Angico	24
Figura 10: Filogenia construida a partir de la secuencia del gen <i>nodA</i>	26
Figura 11: Filogenia construida a partir de la secuencia del gen <i>nodC</i>	27

Figura 12: Porcentaje de contaminación de las semillas utilizadas en los ensayos de cinética de nodulación	28
Figura 13: Porcentaje de contaminación discriminado por agentes de esterilización, HgCl ₂ y NaClO.....	29
Figura 14: Evaluación de la cinética de nodulación en los medios de crecimiento para plantas, Jensen y McKnight.	29
Figura 15: Efecto del medio de cultivo de las plantas sobre la cinética de nodulación en plantas de Angico por aislamientos nativos.....	30
Figura 16: Efecto del agregado de N (KNO ₃) sobre la cinética de nodulación en plantas de Angico por aislamientos nativos.....	32
Figura 17: Efecto del agregado de N (KNO ₃) sobre la cinética de nodulación de plantas de <i>M. pudica</i> inoculadas con aislamientos nativos de Angico.....	33
Figura 18: Estudio de la formación de una película de crecimiento bacteriano en medios semisólidos sin N	34
Figura 19: Estudio <i>in silico</i> del diseño de cebadores <i>nodC</i>	37

ABREVIATURAS

D.O.: Densidad Óptica

EDTA: Ácido Etilen Diamino Tetra Acético

u.f.c.: unidades formadoras de colonia

RESUMEN

Parapiptadenia rigida (angico) es una leguminosa arbórea nativa con alto potencial para la forestación debido a sus características maderables, su rápido crecimiento y contribución a la recuperación de suelos degradados. Una de las interacciones planta-bacterias promotoras del crecimiento (BPC) más estudiada es la asociación nodular rizobios-leguminosas. El nódulo es una estructura radicular formada como resultado de esta interacción, constituyendo el órgano donde se alojan las bacterias simbióticas y se lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno. Los primeros compuestos que participan en esta interacción son los flavonoides secretados por la planta e inductores de la expresión de los genes necesarios para la nodulación (genes *nod*) presentes en rizobios. Hasta hace pocos años, se consideraba que las leguminosas eran solamente noduladas por α -Proteobacterias del grupo de las Rhizobiaceae. Recientemente se demostró que miembros de las β -Proteobacterias (*Burkholderia* y *Cupriavidus*) pueden formar también nódulos fijadores de nitrógeno en leguminosas, cambiando así un dogma de hace más de 100 años. Este trabajo tubo como objetivo avanzar en el conocimiento de la interacción establecida entre estos β -rizobios y sus leguminosas hospederas. En particular, nos centramos en el estudio de la fisiología de la nodulación y la capacidad de promover el crecimiento vegetal. Para esto, en una primera instancia se estudió la cinética de nodulación en *P. rigida* y *Mimosa pudica* inoculadas con un conjunto de aislamientos nativos de β -rizobios, en condiciones gnotobióticas. Los resultados mostraron que la velocidad de nodulación variaba en función del hospedero y las variables estudiadas. En una segunda aproximación se estudiaron los genes involucrados en la nodulación utilizando técnicas moleculares, determinando la presencia de los genes *nodA* y *nodC* mediante PCR. Los amplicones obtenidos se secuenciaron y las secuencias se analizaron con herramientas bioinformáticas. Los genes *nodA* y *nodC* de las α -proteobacterias se agrupan en nodos separados en relación a las β -proteobacterias, concordando con el análisis del gen *16S rARN*, realizado en trabajos previos. Por otra parte, se determinó la capacidad de los microsimbiontes de fijar libremente el N₂ mediante ensayos de reducción del acetileno. En las condiciones estudiadas no se obtuvo reducción de acetileno.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

1.1.1. Ciclo del N

De los nutrientes fundamentales para el desarrollo vegetal, el nitrógeno es uno de los elementos más estudiado en los últimos años. El N es frecuentemente limitante del crecimiento vegetal ya que es removido del suelo en cantidades superiores al resto de los nutrientes, en donde su concentración es baja. Este compuesto es importante para la agricultura ya que incrementa los rendimientos vegetales tales como la altura, el color de la zona aérea, el tamaño y la vigorosidad. La fertilización química nitrogenada, necesaria para el óptimo crecimiento de los cultivos, conlleva problemas ambientales. Solo el 50% del fertilizante suministrado es asimilado por la planta mientras que el resto se pierde por lixiviación, contaminando cursos de aguas superficiales y capas freáticas. Por otro lado, la industria vierte aguas con elevada concentración de óxidos de N y amoníaco contaminando más aún los cursos de agua (20).

Las etapas del ciclo biogeoquímico del nitrógeno comprenden, la fijación del nitrógeno, el proceso de nitrificación y desnitrificación (Figura 1). Muchas de las reacciones redox claves de este ciclo son llevados a cabo en la naturaleza por procariotas (29, 38).

1.1.2. Biodisponibilidad del nitrógeno

Solo el 2% del N presente en el suelo, el cual se encuentra en forma mineral, es el asimilable por la planta. La fuente primaria de nitrógeno para el suelo es la atmósfera, en donde este elemento representa un 80% del total de la composición de la misma. El N₂ ingresa al ciclo de 3 maneras: a través de la fijación biológica (conversión por parte de los procariotas de N₂ a amonio); por fijación atmosférica (relámpagos y conversión fotoquímica de N₂ a nitrato); y por la fijación de N₂ a amonio por el proceso industrial de Haber-Bosh (20, 30).

De lo anteriormente expuesto se desprende la importancia de las bacterias fijadoras de nitrógeno (diazótrofos) en la asimilación de este elemento mediante el proceso denominado fijación biológica de nitrógeno (FBN) (20).

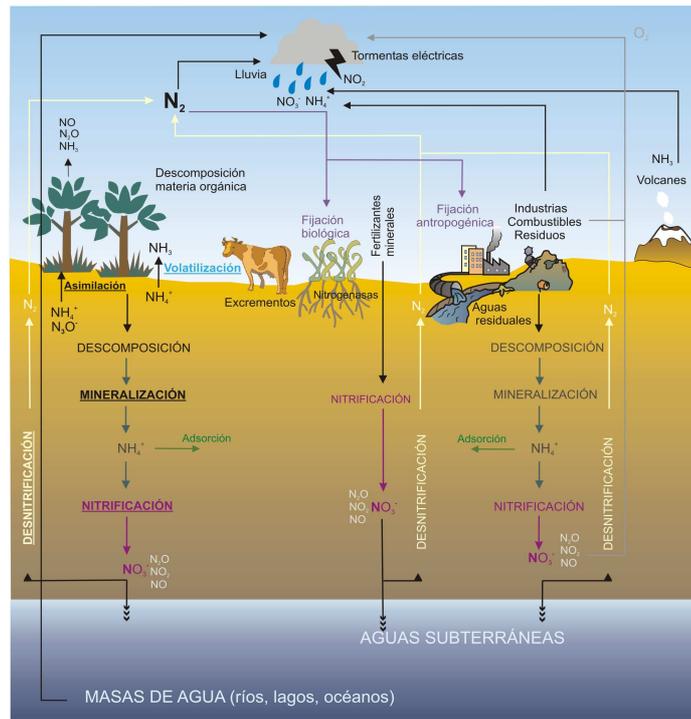


Figura 1: Ciclo del nitrógeno. Tomado de: <http://www.miliarium.com/proyectos/Nitratos/Nitrato/CicloNitrogeno.asp>

1.1.3. Nitrogenasa

La diazotrofia es exclusiva de los procariontes, proceso que se basa en el complejo enzimático de la nitrogenasa.

La nitrogenasa es un complejo de 2 componentes, una metaloenzima que cataliza la reducción de N_2 dependiente de Mg-ATP para lograr dos moléculas de NH_3 . Esta reducción catalítica de N_2 se llama fijación biológica de nitrógeno, y la estequiometría de esta reacción es la siguiente:



Los dos componentes proteicos del complejo de la nitrogenasa, que se pueden aislar uno del otro, son generalmente denominados la proteína Fe y la proteína MoFe. Estos términos hacen referencia a la composición metálica de los grupos prostéticos que contienen dentro cada componente proteico.

La proteína Fe es un homodímero codificado por el gen *nifH*, que contiene 4 átomos de Fe organizado en un grupo Fe_4S_4 , mientras que la proteína MoFe es un heterodímero codificado por los genes *nifD* (subunidad α) y *nifK* (subunidad β) y contiene 30 átomos de Fe y 2 átomos de Mo organizados en 2 pares de

metalogramos, llamados grupos P ($\text{Fe}_8\text{S}_7\text{-8}$) y cofactores FeMo (Fe_7S_9 Mo-homocitrato) (Figura 2) (38).

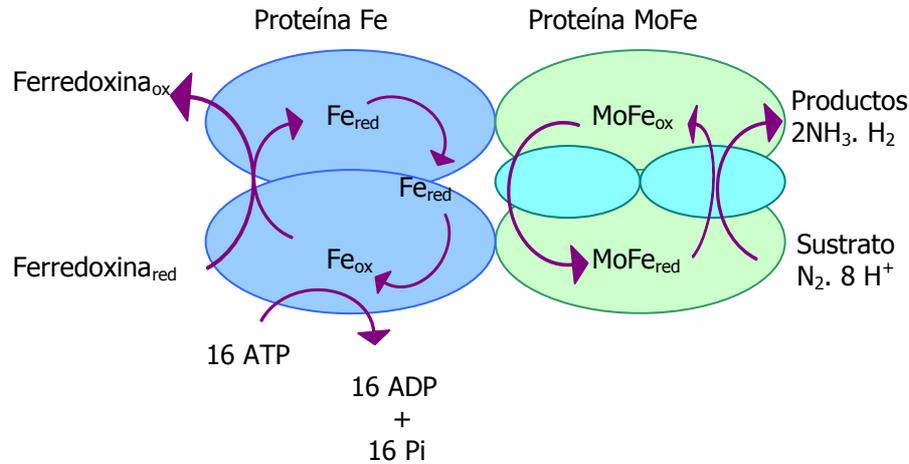


Figura 2: Estructura del complejo enzimático nitrogenasa. Adaptado de (46).

Debido a que dicha enzima se inactiva en presencia de O_2 , se postula que las primeras nitrogenasas debieron de haberse originado antes de que la condición reductora de la atmósfera primitiva se transformara en oxigénica, por la acumulación de O_2 como producto final de la fotosíntesis bacteriana. Es así que los diazótrofos antiguos recorrieron un largo camino evolutivo desde la aparición de las primeras plantas terrestres, hace aproximadamente 400 millones de años, conviviendo en la rizósfera como epífitos o en el interior de las plantas como endófitos. Durante este largo período, las líneas diazótroficas de procariontes se diversificaron y establecieron relaciones simbióticas con algunos linajes de plantas (27).

La nitrogenasa no es completamente específica para N_2 puede reducir otros compuestos con triples enlaces, entre ellos el acetileno. La reducción de acetileno por esta enzima es un proceso de 2 electrones por el cual se produce etileno. Un ensayo comúnmente utilizado para la medida de la actividad de la misma es la reducción del gas acetileno. En este se mide la aparición del gas etileno por cromatografía de gases, siendo un ensayo económico, rápido y sensible (29, 55).

1.1.4. Bacterias fijadoras de nitrógeno: los "beta-rizobios"

La diazotrofia está acotada a una pequeña porción de especies, aproximadamente 87 especies pertenecientes a 2 géneros de archaea, 38 géneros de bacterias y 20 géneros de cianobacterias, han sido identificados como diazotrofos (52).

La interacción simbiótica entre bacterias diazotrofas y leguminosas, se ha estudiado principalmente en las bacterias del suelo perteneciente a las α -Proteobacterias y sobre todo en los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Rhizobium* (llamados genéricamente rizobios) (8). La mayoría de los rizobios se encuentran distribuidos en nueve géneros y más de 50 especies. A la fecha, se cuenta con el genoma secuenciado de siete de ellos: *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, *Bradyrhizobium* sp. ORS278, *Bradyrhizobium* sp. BTAi1, *Mesorhizobium loti* MAFF303099, *Rhizobium leguminosarum* WSM1325, *Rhizobium etli* CIAT 652, *Sinorhizobium fredii* NGR234, *Sinorhizobium medicae* WSM419 y *Sinorhizobium meliloti* 1021 (1).

Recientemente se ha reportado que las leguminosas, particularmente aquellas pertenecientes al género *Mimosa*, son también noduladas por β -Proteobacterias (llamadas "beta-rizobio") (17).

Este es el caso de *Cupriavidus taiwanensis* una β -Proteobacteria perteneciente a la familia Burkholderiaceae del orden Burkholderiales. Esta cepa fue originalmente reportada como *Ralstonia taiwanensis* o *Wautersia taiwanensis* y aislada de nódulos de *Mimosa pudica* y *Mimosa diplotricha*, siendo actualmente la única especie de este género reconocida como capaz de establecer nódulos con leguminosas (3, 13).

Asimismo algunas especies de *Burkholderia*, también pertenecientes a una subclase de β -Proteobacterias de la misma familia y orden que *Cupriavidus*, se encuentran comúnmente en el suelo y asociadas a raíces de plantas (3). En Sudáfrica, se aisló por primera vez una cepa de *Burkholderia* sp. a partir de nódulos de la leguminosa *Aspalathus carnosus* (34). La homología en la secuencia de ADN del gen ribosomal *16S rARN*, demostró su cercanía a la especie *Burkholderia kururiensis* (96,9% de identidad). Este aislamiento presentó la capacidad de establecer también simbiosis con *Macroptilium atropurpureum*, una leguminosa tropical que es considerada promiscua por su amplio rango de

hospederos, es decir, es capaz de establecer simbiosis con diversos rizobios. Por otra parte y a partir de nódulos de *Mimosa bimucronata* y *Mimosa pigra* se han aislado otras especies de *Burkholderia*, las cuales han sido nombradas: *B. caribensis*, *B. phymatum* y *B. tuberum*. Estos aislamientos son capaces de establecer nódulos efectivos en *M. pudica*, *M. diplotricha*, *M. pigra* y *M. acutishpula* (12, 14, 52).

Un caso particular es el del género *Herbaspirillum*, β -Proteobacterias pertenecientes a la familia Burkholderiaceae, orden Burkholderiales. Dentro del género *Herbaspirillum* se encuentran bacterias del suelo, diazótrofes capaces de asociarse a plantas especialmente Poaceas, a través de colonización epífita en el rizoplaneo y posterior colonización endófitas de raíces (36). Lo que diferencia este género de los géneros *Cupriavidus* y *Burkholderia*, es el hecho de poseer bacterias endófitas. El término endófito se refiere a bacterias que colonizan activamente los tejidos de las plantas y establecen asociaciones sin causarle daño a las mismas (40). Recientemente una nueva especie, *Herbaspirillum lusitanum* fue aislada a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* provenientes de suelos de Portugal (50). La secuencia completa del gen ribosomal 16S rARN reveló su cercanía con *H. seropedicae* y *H. rubrisubalbicans*. Estas especies nodulantes fueron diferenciadas de otras especies mediante ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis) y TP-RAPD (Two primer randomly amplified polymorphic DNA) (3, 50).

1.1.5. Filogenia y transferencia horizontal de genes

En el caso de la simbiosis rizobio-leguminosa, el proceso de interacción involucra varias etapas las cuales finalizan en la formación de una estructura particular en las raíces de las plantas, el nódulo, órgano simbiótico donde se lleva a cabo la FBN. En algunos rizobios muchas de las funciones simbióticas son codificadas por genes de aproximadamente 20 a 30 kilobases (kb), localizados en el plásmido Sym o simbiótico. Entre los genes simbióticos se encuentran los genes implicados en la fijación biológica de nitrógeno (*niⁿ*) y los genes implicados en la nodulación (*nod*) (16). Se postula que los genes necesarios para la nodulación de las leguminosas han sido adquiridos subsecuentemente por transferencia horizontal de genes de fuentes indefinidas, convirtiendo los saprófitos del suelo en simbioses. La

hipótesis antes mencionada ha sido comprobada al ser secuenciado el genoma de *S.meliloti* 1021 (24, 32, 45). En las β -proteobacterias se ha demostrado que los genes involucrados en la biosíntesis y el transporte de los Factores Nod (moléculas de señalización que inducen la organogénesis del nódulo), están codificados por los genes de nodulación *nod*, *nol* y *noe*. El genoma de la cepa *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424, por ejemplo, presenta 10 genes estructurales plasmídicos probablemente involucrados en la nodulación, *nodBCIJHASUQ*, así como un probable gen regulador de los mismos (*nodD*). Corriente abajo en el genoma de esta cepa se identificaron 19 genes *nif* ubicados probablemente en 5 operones, los cuales estarían involucrados en la síntesis y la funcionalidad de la nitrogenasa (*nifA*, *nifX* y *nif FHDK*) (1).

Por otro lado, al analizar la secuencia del gen *nodA* de *Burkholderia phymatum* STM815 se observó que la misma está relacionado con otra beta-rizobio, *C. taiwanensis*. Estudios filogenéticos entre *B. phymatum* STM815 y *B. tuberum* STM678 (beta-rizobio obtenido del mismo hospedero), demostraron que ésta última cepa se agrupa junto a *Methylobacterium nodulans* ORS 2060, que pertenece a los alfa-rizobio. Estos estudios demuestran la complejidad filogenética de los genes de nodulación entre beta-rizobios y alfa-rizobios (3).

Asimismo en el genoma de la cepa *B. phymatum* STM815, los genes implicados en la nodulación y la FBN también se localizan en un mismo plásmido (plásmido 2) (<http://expasy.org/sprot/hamap/BURP8.html>).

1.1.6. Leguminosas

La habilidad de establecer simbiosis con rizobios, está restringida a las leguminosas. La familia *Leguminosae* o Fabales, es una familia grande y diversa de plantas dicotiledóneas con flores que ocupa el tercer lugar en número de especies, con 650 géneros y más de 18.000 especies descritas. Esta familia comprende 3 subfamilias, *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*, las cuales contienen géneros capaces de formar nódulos radiculares. En estas tres subfamilias hay una gran variedad de porcentaje de plantas capaces de asociarse a rizobios. Tal es el caso de la subfamilia *Caesalpinioideae* la cual incluye muchos géneros no nodulantes. Esta subfamilia es la más antigua dentro de la familia de las Fabales,

por lo que se asume que la simbiosis fue favorecida en una etapa tardía de la evolución de las leguminosas (27, 51).

Los rizobios y las leguminosas han desarrollado un mecanismo complejo de intercambio de señales que permite a la bacteria específica inducir en su hospedero la formación de estructuras de invasión en los pelos radiculares por los cuales ingresarán a la planta hospedera. Como resultado de este "diálogo molecular" se forma una estructura radicular (nódulo) donde se alojan las bacterias y se lleva a cabo la FBN.

En nuestro país las asociaciones simbióticas que se han estudiado más en profundidad, por intereses agronómico y económicos, son las que se establecen entre las leguminosas forrajeras (*Medicago sativa*, *M. trunculata*, *Lotus pedunculatus*, *L. corniculatus*, *L. subbiflorus*, *Glycine max*, *Trifolium alexandrinum* L., *T. vesiculosum*, *T. repens* y *T. pratense* entre otros) y los rizobios fijadores de nitrógeno, existiendo estudios escasos sobre la interacción entre árboles fijadores de nitrógeno y sus bacterias simbiontes (21, 33, 41).

1.1.7. FBN en leguminosas arbóreas

La integración de árboles, especialmente árboles fijadores de nitrógeno (AFN), en sistemas agroforestales y silvo-pastoriles significa una importante contribución a la agricultura sustentable, recuperando y manteniendo la fertilidad del suelo. Mediante su uso se combate la erosión y desertificación y se contribuye a la generación de combustible maderero. La ventaja que presentan los AFN debido a la capacidad de FBN de los rizobios asociados, es su habilidad de establecerse en suelos deficientes en nitrógeno, siendo el nitrógeno fijado útil para los cultivos en sucesión o para los co-cultivos (15).

La importancia de estos árboles lleva a preguntarse cómo se puede maximizar u optimizar sus efectos y cómo manejar la FBN así como también la transferencia de nitrógeno a los cultivos en sucesión mencionados (15).

Los factores que afectan la FBN en árboles son variados e incluyen la edad de las plantas, el componente microbiano, la composición del suelo, la temperatura, la salinidad, el pH, los niveles de nitrógeno en el suelo y las deficiencias nutricionales de la planta (15).

1.2. INTERACCIÓN BACTERIAS FBN-LEGUMINOSAS

1.2.1. Diálogo molecular

En el denominado diálogo molecular, se atribuye a las bacterias establecer el primer contacto, movilizándose hacia la rizósfera de las leguminosas. Sin embargo la quimiotaxis y el movimiento entre los rizobios no son suficientes para que se establezca el vínculo entre ambas partes, siendo necesaria la acción de factores más sutiles. Es aquí cuando entran en juego los flavonoides. Éstos son compuestos excretados continuamente por la planta en pequeñas cantidades los cuales aumentan su excreción en presencia de los rizobios, los cuales a su vez responden a su presencia. La respuesta por parte de los rizobios, consiste en la expresión de los genes necesarios para la nodulación (*nod*), iniciándose así las primeras etapas de la formación del nódulo (8).

Flavonoides

Los flavonoides, son las únicas señales químicas bien identificadas producidas por la planta y que afectan a las bacterias simbioses (26). Estos compuestos consisten en dos anillos bencénicos unidos a través de un anillo pirano (Figura 3). Las sustituciones específicas en estos anillos producen diferentes compuestos derivados tales como flavinas, flavonas y flavononas así como también isoflavonoides, los cuales están limitados a la familia de las leguminosas. Se han identificado 4000 tipos de flavonoides diferentes en plantas vasculares, de los cuales un conjunto particular está involucrado en mediar la especificidad de las leguminosas por sus bacterias huésped (24).

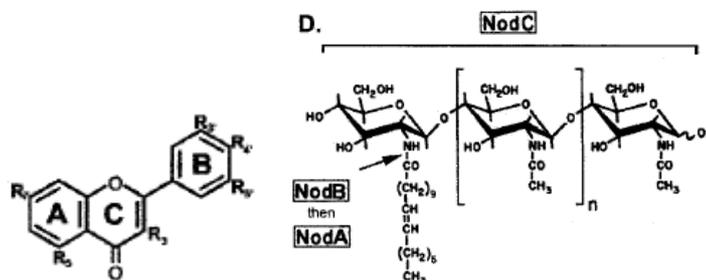


Figura 3: Estructura general de los flavonoides (izquierda) y de los Factores Nod (derecha). Tomado de (24)

La especificidad del reconocimiento de cada flavonoide por la bacteria, es lo que le permite distinguir a su hospedero particular. El flavonoide específico, no solo

induce la expresión de los genes bacterianos *nod* que codifican para la expresión de los Factores Nod, sino que también induce la quimiotaxis entre rizobios (24).

Factores Nod

Los Factores Nod consisten en un esqueleto de residuos β -1,4-N-acetil-D-glucosamina, los cuales pueden diferir en número, no solo entre especies bacterianas, sino también dentro de la misma especie. Los genes del operón *nodABC* codifican las proteínas necesarias para formar la estructura del núcleo de los factores Nod (Figura 3). Durante las distintas etapas del establecimiento de la simbiosis, los rizobios producen los factores Nod, los cuales afectan a la planta hospedera en diferentes formas: el doblamiento del pelo radicular, formación del primordio nodular y expresión de los genes tempranos de la nodulación (8,26,37).

El modelo más estudiado y el cual se describirá a continuación, es el de la interacción establecida entre alfalfa (*Medicago sativa*) y *Sinorhizobium meliloti*.

El mecanismo primario de entrada de los rizobios a las leguminosas es por invasión de los pelos radiculares. Numerosos trabajos han reportado que el proceso de infección en leguminosas puede ocurrir en diversos sitios de la planta ya sea por penetración del mucílago y las primeras capas de la pared celular y/o por roturas en la epidermis o por roturas en la superficie donde emergen las raíces (19).

En las etapas tempranas de la invasión de las raíces de alfalfa por *S. meliloti* existe un intercambio de señales características, involucradas en la regulación de los genes simbioses, en la producción de los Factores Nod y en la secreción de proteínas. Es así que los flavonoides producidos por la planta se unen a las proteínas bacterianas NodD (miembros de la familia de reguladores transcripcionales de tipo LysR), activando las mismas e induciendo la transcripción de los genes *nod* en los rizobios (25).

Por ejemplo, el flavonoide derivado de *M. sativa* estimula la unión de una forma activa de la proteína NodD1 de *S. meliloti* a un promotor "*nod-box*", activando la transcripción corriente abajo de los genes *nod*. Por el contrario, los flavonoides de hospederos no leguminosas inhiben la transcripción de estos genes en *S. meliloti* (25).

La nodulación efectiva, en la cual el rizobio entra a la planta, se diferencia en bacteroide y posteriormente el N_2 es exitosamente reducido a amonio quedando disponible para la planta, requiere de una regulación sutil de los genes inducidos por flavonoides. El proceso por el cual se logra la simbiosis efectiva entre el hospedero y la bacteria simbiote consta de varios pasos, tales como la percepción de señales, la traducción de las mismas y la respuesta a la señales (8). Este proceso depende de la regulación espacio-temporal precisa de los genes *nod* y de otros genes implicados en la simbiosis (Figura 4) (26).

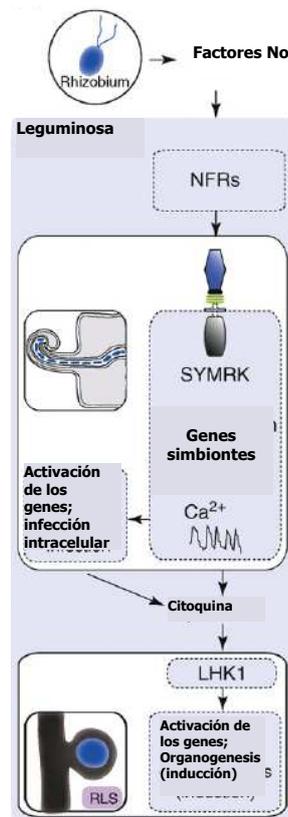


Figura 4: Tres etapas de la simbiosis rizobio-leguminosa: el reconocimiento simbiote-hospedero, respuestas de la epidermis: infección intracelular y respuesta cortical: organogénesis. **NFRs**, Receptores de factores Nod; **SYMRK**, Receptores de simbiosis-like kinasa; **LHK1L**, Kinasa histidinica de *Lotus japonicus* y **RLS**, Simbiosis Rizobio-leguminosa. Adaptado de (29).

1.2.2. Formación de nódulo

Como consecuencia del intercambio de señales, las bacterias quedan atrapadas en la punta de los pelos radiculares por la formación de un rulo en el mismo. Dichas bacterias se introducen progresivamente en la membrana celular de los pelos radiculares, resultando en la invasión de los tejidos de la planta formándose el "hilo de infección". El extremo del hilo de infección es una zona de síntesis continua de membrana nueva. Como resultado, la infección progresa por la

proliferación bacteriana en el extremo del hilo de infección y por la inducción sostenida de síntesis de la membrana en dicho hilo (Figura 5). Si el hilo de infección llega a una célula epidérmica, se funde con la pared distal de la misma, ingresando al espacio intercelular entre la célula epidérmica y la capa de células subyacentes (25).

Posteriormente, se produce la invaginación y el crecimiento en el extremo (similar a lo observado al principio de la infección). Como consecuencia, el hilo de infección con bacterias en su interior es propagado hacia el interior de la raíz. La ulterior bifurcación del hilo de infección permite aumentar el número de sitios, asegurándose de esta manera que un número suficiente de células sean colonizadas (22).

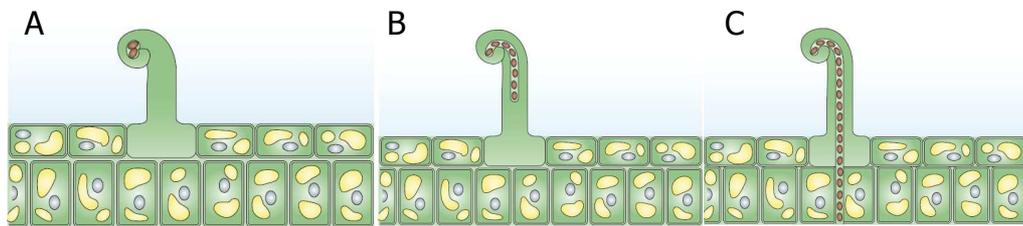


Figura 5: Invasión de la raíz por *Sinorhizobium meliloti*. **A:** Inicio del hilo de infección. **B:** Extensión del hilo de infección. **C:** Penetración del hilo de infección. Adaptado de (25).

Una vez que las bacterias están dentro de las membranas de la célula huésped, se diferencian a bacteroides, forma bacteriana que no se divide y la cual es capaz de fijar nitrógeno (Figura 6). En este proceso están involucrados tanto los factores bacterianos como los del hospedero (25).

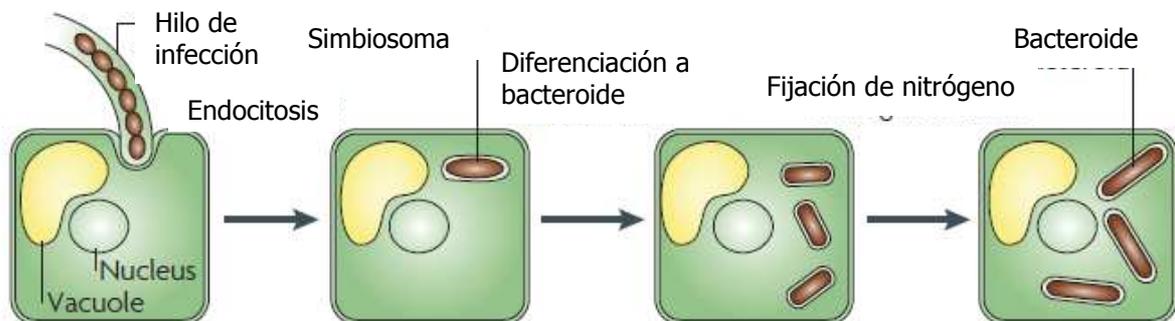


Figura 6: Endocitosis y diferenciación a bacteroide. Adaptado de (25).

1.3. MODELO

1.3.1. *Angico y sus bacterias simbiotas*

Parapiptadenia rigida (Angico) pertenece a la Familia Leguminosae, Mimosoideae. El prefijo *Para* en griego significa similar a *Piptadenia* (otro género de leguminosas). El género *Parapiptadenia* posee 3 especies en Sudamérica tropical y subtropical. En particular, *P. rigida* es una especie característica de bosques tropicales y subtropicales de Paraguay, noreste de Argentina, centro y sur de Brasil y noroeste del Uruguay (35).

En Uruguay, es un árbol característico de los bosques de quebrada y ribereños en los departamentos de Rivera y Artigas, con escasa presencia y grandes dimensiones (Figura 7). Ocupa generalmente las zonas más bajas y húmedas de estos bosques formando parte del estrato superior del dosel (9).



Figura 7: *Parapiptadenia rigida* en distintos entornos. A la izquierda en ciudad y a la derecha en rodal

Los Angicos, son árboles de gran porte, de hasta 25 metros de altura y 80-90 centímetros de diámetro a la altura de pecho, tronco recto con corteza persistente rugosa, negruzca-grisácea. Su follaje es persistente y verde oscuro. Las inflorescencias son amarillentas dispuestas en espigas axilares, cilíndricas, de 3-5 centímetros de largo y su fruto una legumbre de 10-12 centímetros de largo (Figura 8) (9).

Este árbol, presenta anillos de crecimiento poco marcados, porosidad difusa, poros pequeños a medianos. Su tronco presenta una textura fina y homogénea, conteniendo fibras muy cortas, juntas y entrelazadas, de contorno poligonal y pared gruesa (de 0,8 a 1,1 milímetros de largo por 10 m de diámetro) (39).



Figura 8: Características generales de *P. rigida*. De izquierda a derecha: semillas de Angico, hojas bipinnadas e inflorescencia, tronco característico y nódulos obtenidos en ensayos de plantas

Se propone al Angico como un cultivo multipropósito, dado que sus usos y beneficios son variados. Su madera es de gran valor comercial, semidura, compacta, pesada (peso específico: $0,975\text{Kg/dm}^3$) siendo apta para diversos usos. Brinda superficies lisas, toma bien barnices y pinturas, se emplea en carpintería rural, aberturas, postes, tejuelas, chapas decorativas, parquetes y durmientes de vías férreas. Como leña es muy apreciada por su poder calórico y escaso humo. Su corteza tiene uso medicinal en afecciones broncos pulmonares y otras de origen respiratorio, para el lavado de úlceras y heridas, siendo utilizado para buches en caso de inflamaciones de encía y garganta (49). Por su producción de taninos es utilizada para curtir cueros mientras que la producción de goma puede reemplazar a la goma arábiga. Como se mencionó anteriormente, en nuestro país no existe un uso paisajístico de este árbol, a diferencia de Brasil, donde se utiliza como árbol ornamental en plazas, calles y carreteras. Para el ganado, la utilidad es tanto como forraje, así como sombra y abrigo. Asimismo es recomendado para la recuperación ambiental de áreas degradadas (reforestación). Esto ha sido reportado especialmente en Brasil, por tratarse de una especie nativa que enriquece el suelo a través de la FBN y por tratarse de una especie pionera (49).

1.4. ANTECEDENTES

El presente trabajo se enmarca dentro de una de las líneas de investigación del Laboratorio de Bioquímica y Genómica Microbiana focalizada en el estudio de bacterias promotoras del crecimiento (BPC) de Angico.

En el laboratorio se cuenta con una colección de bacterias aisladas de nódulos de Angico colectados en diferentes zonas de nuestro país. Dicha colección fue caracterizada microbiológica y molecularmente (48).

Por amplificación y secuenciación del gen estructural de la nitrogenasa (*nifH*), se seleccionaron los posibles aislamientos fijadores de nitrógeno. Asimismo, se amplificó el gen codificante para la subunidad *16S* rARN y mediante su análisis, se identificaron aislamientos pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus*. A partir del análisis genético, los aislamientos pertenecientes al género *Burkholderia* se agruparon en dos subgrupos mientras que los pertenecientes al género *Cupriavidus* lo hicieron en un único grupo.

Dichos aislamientos fueron también caracterizados mediante ERIC-PCR y RFLP confirmándose los grupos anteriormente identificados mediante la secuenciación del gen *16S* rARN.

Con el fin de estudiar la respuesta del Angico a la inoculación por estas bacterias, se realizaron ensayos de invernáculo y campo, seleccionándose cepas bacterianas capaces de sobrevivir en un ensayo llevado a cabo en solarío utilizando como soporte arena-vermiculita. En el ensayo de invernáculo se utilizaron las cepas: *Burkholderia* sp. 5v22, *Burkholderia* sp. 3R, *Burkholderia* sp. 4.13, *Burkholderia* sp. 3.13, *Burkholderia* sp. 10.1, *Burkholderia* sp. 9.4, *Burkholderia* sp. 6a11, *Burkholderia* sp. 7a32, *Cupriavidus* sp. 5v12, *Cupriavidus* sp. 5.5 y una mezcla (mix) de las 10 cepas bacterianas anteriormente mencionadas.

Asimismo, se realizaron ensayos de respuesta a la inoculación bacteriana en campo. Los mismos se realizaron en 4 departamentos del país, Montevideo, Lavalleja, Treinta y Tres y Rivera, utilizándose las cepas *Burkholderia* sp. 4.13, y *Cupriavidus* sp. 5v12, seleccionadas en los ensayos de invernáculos mencionados. Los ensayos de campo se encuentran en etapa de evaluación.

2. OBJETIVOS

Como objetivo general el presente trabajo se propone avanzar en el estudio de la interacción Angico-rizobio para así comprender las bases bioquímicas y moleculares de dicho proceso, área de investigación en la cual se dispone de escasa información.

Como objetivos específicos se plantea:

- 1- Realizar estudios filogenéticos de los genes de nodulación (*nodA* y *nodC*) en la colección de simbioses de Angico.

- 2- Estudiar la cinética de nodulación de aislamientos seleccionados a partir de dicha colección en plantas de *P. rigida* y *M. pudica* en condiciones de laboratorio.

- 3- Estudiar la capacidad de fijar el nitrógeno en vida libre por dichos aislamientos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Bacterias y medios de cultivos

3.1.1. Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas en este trabajo se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1: Principales características y referencias de las cepas utilizadas

Cepa	Característica	Referencia
<i>Burkholderia</i> sp. 1A	Aislamiento nativo de nódulos de plantas de Angico. β -proteobacteria, presencia del gen <i>nifH</i>	Proyectos INIA-FPTA 216 y PDT 6703
<i>Burkholderia</i> sp. 3.11		
<i>Burkholderia</i> sp. 3.13		
<i>Burkholderia</i> sp. 3R		
<i>Burkholderia</i> sp. 4.3		
<i>Burkholderia</i> sp. 4.5		
<i>Burkholderia</i> sp. 4.13		
<i>Burkholderia</i> sp. 5v22		
<i>Burkholderia</i> sp. 6a11		
<i>Burkholderia</i> sp. 7a32		
<i>Burkholderia</i> sp. 9.4		
<i>Burkholderia</i> sp. 10.1		
<i>Burkholderia</i> sp. 10.6		
<i>Cupriavidus</i> sp. 5.4		
<i>Cupriavidus</i> sp. 5.5		
<i>Cupriavidus</i> sp. 5v12		
<i>Cupriavidus</i> sp. 5.1D		
<i>Rhizobium</i> sp. T6.3	Aislamiento nativo de nódulos de plantas de Angico. α -proteobacteria, presencia del gen <i>nifH</i>	
<i>Rhizobium</i> sp. 33.1		
<i>B. phymatum</i> STM815	Se dispone de la secuencia genómica completa http://expasy.org/sprot/hamap/BURP8.html	(52)
<i>C. taiwanensis</i> LMG19424	Se dispone de la secuencia genómica completa http://expasy.org/sprot/hamap/CUPTR.html	(14)
BR 827	Recomendadas como inoculante para Angico en Brasil	EMBRAPA*
BR 9002		
<i>S. meliloti</i> 1021	Derivado Sm ^R de la cepa SU47. Se dispone de la secuencia genómica completa http://sequence.toulouse.inra.fr/meliloti.html	(23, 31)

*EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuarias. Cepas proporcionadas por S. Farias.

3.1.2. Medios de cultivo

Las cepas de *Burkholderia* y *Cupriavidus* fueron crecidas en los siguientes medios de cultivo: YEM (54), JMV (4), JNFb (4) y BMGM (18).

En los ensayos de cinética de nodulación, las plantas de *P. rigida* y *M. pudica* se crecieron en los medios Jensen (54) y McKnight (31).

La composición de los medios mencionados se muestra en el Anexo 1.

3.2. Extracción de ADN

3.2.1. A partir de lisado de colonia

Usando este método se ensayaron 2 aproximaciones.

En la primera, una colonia de la cepa de interés crecida en placas conteniendo medio sólido YEM, se resuspendió en 1 ml de NaCl 1M estéril. La suspensión obtenida se centrifugó 4 minutos a 5.900 g, descartándose el sobrenadante, repitiéndose el lavado una vez más. El pellet obtenido se lavó una vez con 1 ml de Tris 10 mM EDTA 1M (T₁₀E₁), centrifugándose 4 minutos a 5.900 g descartándose nuevamente el sobrenadante. Finalmente el pellet se resuspendió en 100 µL de T₁₀E₁, incubándose primero 20 minutos a 100 °C seguido de 20 minutos a -20 °C. Como suspensión de trabajo se utilizaron los 100 µL resultantes.

En la segunda aproximación ensayada, una colonia de la cepa de interés crecida en placas conteniendo medio sólido YEM, se resuspendió en 100 µL de H₂O extra pura estéril. La suspensión se centrifugó a 15.600 g por 2 minutos descartándose el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 100 µL de NaOH 0,05 M y se incubó 4 minutos a 100 °C seguidos de 2 minutos en hielo. A la suspensión se le agregó 900 µL de H₂O extra pura estéril centrifugándose a 15.600 g por 2 minutos. Se utilizó como suspensión de trabajo los 700 µL superiores.

3.2.2. A partir de cultivo en medio líquido

Las cepas de interés se crecieron en medio de cultivo líquido rico YEM hasta alcanzar una D.O.₆₂₀ de 1.0. Tres ml de cultivo bacteriano se centrifugaron 2 veces, durante 10 minutos a 800 g. El pellet obtenido se lavó 1 vez con 1,5 mL de NaCl 1 M y 1 vez con Tris 10 mM EDTA 25 M (T₁₀E₂₅) resuspendiéndose finalmente en 0,7 ml de T₁₀E₂₅. En cada caso la suspensión se centrifugó 10 minutos a 800 g.

A la suspensión obtenida se le agregó 100 µL de lisozima (2 mg/mL) y 30 µL de ARNasa A (10 µg/mL), previamente incubada a 100 °C, mezclándose por inversión. Posteriormente se incubó durante 30 minutos a 37 °C para luego agregarle 20 µL de proteinasa K (20 mg/mL) y 100 µL de Sarkosil 12% (p/v). La suspensión obtenida se incubó durante 1 hora a 37 °C realizándose 2 extracciones con igual volumen de fenol. Entre ambas extracciones se centrifugó la primera vez durante 10 minutos y la segunda durante 5 minutos a 13.300 g. A la fase acuosa obtenida se le realizaron 2 extracciones con igual volumen de cloroformo (CHCl₃). Finalmente el ADN se precipitó con 1/10 volúmenes de acetato de amonio (NaAc) 0,33M y 0,6 volúmenes de isopropanol (C₃H₈O) incubándose a -20 °C. Al otro día la suspensión se centrifugó durante 5 minutos a 9.200 g, lavándose 2 veces con 1mL de EtOH 70%.

El pellet obtenido se secó al vacío utilizando una speedvack LABCONCO durante 10 minutos, resuspendiéndose finalmente en 100 µL de T₁₀E₁.

3.3. Estudio de la filogenia de los genes *nodA* y *nodC*

3.3.1. Amplificación de las secuencias codificantes

Los cebadores utilizados para la amplificación de los genes *nodA* y *nodC* son los listados en la tabla 2.

Tabla 2: Cebadores utilizados para la amplificación de los genes *nodA* y *nodC*

Secuencia nucleotídica	Gen a amplificar	Producto esperado (kb)	Género	Ref.
5'-CRGTGGARGGTBYGYTGGGA-3' fw 5'-TCAYARCTCDGGBCCGTTBCG-3' rev	<i>nodA</i>	550	<i>Burkholderia</i>	Moulin <i>et al</i> 2007, comunicación personal
5'-GATCTTGAAGCTCTCCGACCATTT-3 fw 5'-GTTTCGATTGTTTCGCCGCTTG'-3' rev	<i>nodA</i>	532	<i>Cupriavidus</i>	(2)
5'-CTCAATGTACACARNGCRTA-3 fw 5'-GAYATGGARTAYTGGYT'-3 rev	<i>nodC</i>	461	<i>Burkholderia</i>	(17)
5'-GTCACGCACGTAGAGGGCAAACA-3' fw 5'-GGCCGCAATCAACACGACTTCT-3' rev	<i>nodC</i>	915	<i>Cupriavidus</i>	Este trabajo

La mezcla de reacción para un volumen final de 50 µL fue la siguiente: 5 µL de Buffer de reacción de PCR 10X (ver composición en Anexo 1), 3 µL de MgCl₂ 25 mM, 5 µL de dNTPs 2,0 mM, 2,0 µL de cada cebador, 2,0 µL de BSA 0,1%, 0,4 µL de Taq polimerasa (5U µL⁻¹), 4 µL del lisado de colonia y H₂O c.s.p. 50 µL. Para

las reacciones de amplificación de los genes *nodA* y *nodC* el programa fue el mismo variando las temperaturas de hibridación de acuerdo a los cebadores empleados, siendo el siguiente: un primer ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos para la hibridación de cebadores y 1 minuto a 72 °C, con un ciclo final de elongación de 5 minutos a 72 °C. Para la amplificación del gen *nodA* la temperatura de hibridación de los cebadores fue de 60 °C y 58 °C, para el género *Burkholderia* y *Cupriavidus* respectivamente. La temperatura de hibridación para la amplificación de gen *nodC* fue 49 °C y 61 °C respectivamente.

El producto de amplificación se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,9% (p/v) en buffer Tris-Acético-EDTA (TAE), (Anexo 1), a 100 V durante 1 hora. Posteriormente se tiñó con Bromuro de Etidio y se visualizó al exponer el gel a luz U.V.

3.3.2. Secuenciación de los amplicones

La banda correspondiente al amplicón buscado, se purificó de gel mediante el kit comercial MO BIO Laboratories, Inc. enviándose el producto obtenido a Macrogen Inc, Korea para su secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x (2010) (<http://www.DnaBaser.com>) y comparadas mediante Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3.3.3. Construcción del árbol filogenético

A partir de la información obtenida del NCBI, se construyó un árbol filogenético para esclarecer las relaciones existentes entre las cepas en estudio y entre ellas con especies de las α - y β - proteobacterias. Los árboles filogenéticos se construyeron con el programa Mega4 (47). Se utilizó el método Neighbour Joining y el modelo de sustitución de 2 parámetros, con un Bootstrap de 1000 réplicas (43, 44).

3.4. Ensayos de cinética de nodulación

3.4.1. Esterilización y germinación de semillas

Las semillas se obtuvieron del departamento de Artigas, Bella Unión, en salidas de campo previas a este trabajo, 2007-2008 (48).

En este trabajo se evaluaron 2 métodos de esterilización los cuales emplean diferentes agentes: ión mercurio (Hg^{+2}) e hipoclorito (HClO). Los parámetros que se tuvieron en cuenta en la evaluación de la metodología a emplear fueron la capacidad para la esterilización superficial de las semillas así como la supervivencia de las mismas.

En el primer método, las semillas se enjuagaron con EtOH 95 % (v/v) y 1 minuto adicional con agua destilada estéril. Posteriormente se las incubó 2,5 minutos con una solución de $HgCl_2$ 9,2 mM en HCl 0,1 N enjuagándose con 6 lavados de agua destilada estéril, e incubándose una hora en el último lavado realizado (6).

En el segundo tratamiento, las semillas se enjuagaron con EtOH 70% (v/v) por 1 minuto. Posteriormente se las incubó durante 15 minutos en una solución de NaClO 5% (v/v), enjuagándose con 12 lavados de agua destilada estéril. Finalmente las semillas se dejaron reposar 1 hora en agua destilada estéril (53).

En ambos casos las semillas así tratadas se dejaron germinando en placas de petri conteniendo agar-agua 80% (p/v) durante 48 horas en la oscuridad a 30°C hasta su germinación.

3.4.2. Ensayos en plantas en condiciones gnotobióticas

Este ensayo se realizó con la finalidad de determinar la cinética de nodulación de las cepas de interés en 2 hospederos.

En el primer ensayo se utilizó como hospedero a *P. rigida* (Angico) y las cepas ensayadas fueron *Cupriavidus* sp 5.5, *Cupriavidus* sp 5v12, *Burkholderia* sp 9.4, *Burkholderia* sp 4.13, BR 8.27 y *Rhizobium* sp. T6.3. La elección de las mismas se basó en que fueron las mismas cepas que se utilizaron en los ensayos de campo. Se utilizaron tubos de planta conteniendo 20 ml de medio sólido Jensen y McKnight. En el mismo, también fueron evaluados los diferentes métodos de esterilización mencionados.

En un segundo ensayo, se estudió la cinética de nodulación en el hospedero *P. rigida* con las siguientes cepas: *Cupriavidus* sp. 5.5, *Cupriavidus* sp. 5v12,

Burkholderia sp. 9.4, *Burkholderia* sp. 4.13, *B. phymatum* STM815 y *C. taiwanensis* LMG19424. En esta oportunidad se utilizó un único método de esterilización (el cual utiliza HgCl_2 como agente esterilizante) y un medio de cultivo para planta (Jensen) con y sin el agregado de nitrógeno en forma de KNO_3 0,05 % (p/v) (54).

En el tercer ensayo, se determinó la cinética de nodulación en el hospedero *M. pudica* con las siguientes cepas, *Cupriavidus* sp 5.5, *Cupriavidus* sp 5v12, *Burkholderia* sp 9.4 y *Burkholderia* sp 4.13. En este caso se utilizó el medio sólido Jensen con y sin el agregado de KNO_3 0,05% (p/v) como fuente de nitrógeno y como método de esterilización el que emplea como agente el HgCl_2 .

En todos los casos una vez germinadas las semillas, los brotes se transfirieron a los tubos de planta (una plántula por tubo) y se inocularon con suspensiones de aproximadamente 1×10^7 u.f.c. de las cepas de interés a los 4 días de iniciado el ensayo, reinoculándose a los 30 días.

Como control negativo, se agregó a las plantas 1 ml de agua destilada estéril y como control positivo, 1 ml de KNO_3 0,05 % (p/v).

Cuando fue necesario, las plántulas se regaron con 1 ml de medio Jensen o McKnight sin nitrógeno, según correspondiera. Los ensayos se crecieron a 25 °C con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

La aparición de nódulos se determinó cada 7 días, durante 103 (primer ensayo) y 71 días (segundo ensayo) en el caso que se estudió el hospedero *P. rigida*. Por otra parte, cuando se evaluó la cinética de nodulación en *M. pudica* (tercer ensayo) se determinó la aparición de nódulos todos los días durante 12 días. En todos los ensayos se realizaron 6 repeticiones por condición.

3.5. Ensayo de reducción de acetileno (ARA)

Con el fin de determinar la capacidad de los aislamientos seleccionados de fijar en vida libre el nitrógeno, se realizó el ensayo de reducción del acetileno (ARA). Dado que la nitrogenasa es capaz de romper triples enlaces se determina la actividad de la misma al reducir el acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4). En este trabajo se estudiaron distintas variables tales como: diferentes modos de inocular el medio, composiciones de los mismos (con o sin el agregado de 5% (p/v) de extracto de levadura, E.L.), así como el procesamiento de las células previo a la inoculación de los cultivo.

Las variables evaluadas fueron las que se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 3: Variables estudiadas en ensayo ARA

Medios de cultivo	Ensayado:	JMV	JNFb	BMGM
	Suplementado con 5% (p/v) E.L.:	Si		No
Inoculación	Lavado de células previo:	Si		No
	Tipo:	Superficial	Incluida	Ansa recta

Para cada condición se utilizó como control negativo, *S. meliloti* 1021 y como controles positivos *Azospirillum brasilensis* Sp7 y *B. phymatum* STM815, reportada como fijadora en vida libre (17). Como cepa de referencia se utilizó la cepa *C. taiwanensis* LMG19424, incapaz de crecer en medio semisólido sin nitrógeno, ni fijar biológicamente el nitrógeno en vida libre (17).

Una vez elegida la metodología a seguir, se ensayaron las siguientes cepas: *Burkholderia* sp. 1A, *Burkholderia* sp. 4.13, *Burkholderia* sp. 3.13, *Burkholderia* sp. 6a11, *Burkholderia* sp. 9.4, *Burkholderia* sp. 5v22, *Cupriavidus* sp. 5.4, *Cupriavidus* sp. 5.5, *Cupriavidus* sp. 5.1D.

Las cepas fueron crecidas en tubos de ensayo de 15 ml, conteniendo 5 ml de medio de cultivo semisólido sin nitrógeno con tapón de polifón, el cual permitió el intercambio gaseoso. En los mismos se inocularon 1×10^7 u.f.c. de las cepas de interés previamente crecidas en medio líquido YEM (54), incubándose posteriormente a 30 °C durante 5 días hasta la visualización del crecimiento en película característico. El ensayo de actividad fue realizado solo a las cepas formadoras de película. Previo al análisis, los tapones se cambiaron por unos de goma los cuales impiden el intercambio gaseoso, inyectando acetileno en una cantidad equivalente al 10 % de la atmósfera libre en el vial. Los tubos fueron incubados durante 1, 24 y 48 horas a 30 °C.

El cromatógrafo de gases utilizado para la separación de los componentes gaseosos de la muestra y su posterior detección y registro fue un Hewlett Packard 5890. La columna se programó en 60 °C, el detector a 120 °C y el inyector a 90 °C (10). El software utilizado fue CLASS-GC10, registrándose la aparición del pico

de etileno. La muestra utilizada en cada caso fue de 1 ml de la fase gaseosa de los tubos de ensayo.

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de la filogenia de los genes *nodA* y *nodC*

4.1.1. Amplificación de las secuencias codificantes de los genes *nodA* y *nodC*

La presencia de los genes implicados en la nodulación, amplificados mediante PCR se visualizó en gel de agarosa 0,9 % (p/v) con tinción de Bromuro de etidio (Figura 9).

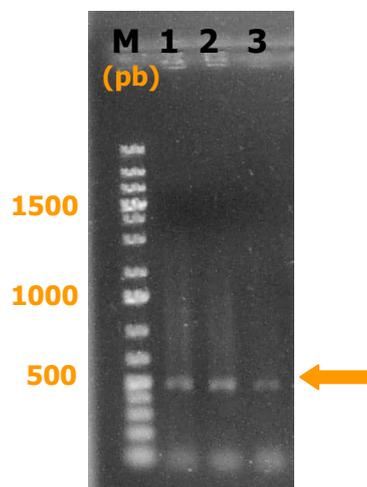


Figura 9: Amplificación por PCR del gen *nodA* en la colección de simbiontes de Angico. Electroforesis en gel de agarosa 0.9% (p/v). El marcador utilizado fue Gene Ruler 1kb DNA Ladder plus (carril M). La banda señalada corresponde a 500 pares de bases. Productos de PCR obtenidos a partir de las cepas de la colección **1**, *Cupriavidus* sp. 5.4; **2**, *Cupriavidus* sp. 5.5 y **3**, *Cupriavidus* sp. 5.1D.

De las cepas listadas en la tabla 1, la presencia del gen *nodA* se confirmó en 9 aislamientos mientras que la presencia del gen *nodC* en 8.

Como se observa en la figura 9, el tamaño de la banda coincidió con el tamaño esperado según trabajos anteriores en que utilizan estos juegos de cebadores (2, 17). En esta figura se observan algunos de los productos obtenidos luego de la amplificación de las cepas listadas en la tabla 1.

En la tabla 4 se muestran los resultados de las reacciones de PCR para los genes de nodulación en las cepas de la colección estudiadas.

Tabla 4: Amplificación de los genes *nodA* y *nodC* en las cepas de la colección

Cepa	<i>nodA</i>	<i>nodC</i>
<i>Burkholderia</i> sp. 3.13	+	+
<i>Burkholderia</i> sp. 3R	+	+
<i>Burkholderia</i> sp. 4.5	+	-
<i>Burkholderia</i> sp. 4.13	+	+
<i>Burkholderia</i> sp. 5v22	+	+
<i>Burkholderia</i> sp. 6a11	-	+
<i>Burkholderia</i> sp. 7a32	-	+
<i>Burkholderia</i> sp. 9.4	+	-
<i>Cupriavidus</i> sp. 5.4	+	-
<i>Cupriavidus</i> sp. 5.1D	+	-
<i>Rhizobium</i> sp. T6.3	-	+
<i>B. phymatum</i> STM815	+	+
<i>C. taiwanensis</i> LMG19424	+	+

4.1.2. Construcción del árbol filogenético de los genes *nodA* y *nodC*

Una vez obtenidas las secuencias de los amplicones, las mismas fueron editadas con el programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x y comparadas con la base de datos del NCBI mediante el algoritmo BLAST. El árbol filogenético que se muestra en la figura 10 es el obtenido luego del análisis del gen *nodA* con el programa Mega 4.

Los resultados del análisis filogenético del gen *nodA* concuerdan con los obtenidos con los genes *16S* rARN y *nifH* de las cepas de la colección en estudio (48).

De acuerdo al análisis filogenético correspondiente al gen *16S* rARN realizado anteriormente en nuestro laboratorio, se había observado que las bacterias pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus* se agrupan como era de esperar, junto con otras β - proteobacterias y separado de las α -proteobacterias. A su vez, las bacterias pertenecientes al género *Burkholderia* formaban 2 subgrupos, no así las pertenecientes al género *Cupriavidus* (48).

En un análisis similar pero a partir de la secuencia del gen *nifH*, se había observado que los géneros *Cupriavidus* y *Burkholderia* también se separan en 2 clusters, no observándose la formación de dos subgrupos entre las cepas de *Burkholderia* analizadas (48).

En este trabajo, cuando se analizaron los genes *nodA* y *nodC* se observó que las secuencias provenientes de las cepas de *Cupriavidus* y de *Burkholderia* se agrupan

junto con las β -proteobacterias, quedando separadas de las α -proteobacterias (Figuras 10 y 11).

En el árbol filogenético construido a partir de la secuenciación del gen *nodA*, el nodo que define a los β - rizobios se apoya en un bootstrap de 94, mientras que las ramas del género *Burkholderia* y del género *Cupriavidus*, lo hacen con un bootstrap de 100 y 64 respectivamente (Figura 10). La pertenencia de estas secuencias al grupo de las β -proteobacterias está respaldada estadísticamente por un bootstrap de 94, indicando la pertenencia a un grupo real (44).

En este trabajo se amplificó, secuenció y analizó también la secuencia correspondiente al gen *nodA* de la cepa de referencia *C. taiwanensis* LMG19424 (color celeste en el árbol filogenético). Como se observa en la figura 10, las secuencias provenientes de las dos cepas analizadas de *Cupriavidus* se agruparon junto a la cepa de referencia. Por otra parte, las secuencias provenientes de las seis cepas pertenecientes al género *Burkholderia* analizadas compartieron el nodo con *B. phymatum* STM815 con un respaldo por bootstrap de 64, indicando un estrecho vínculo entre estas secuencias.

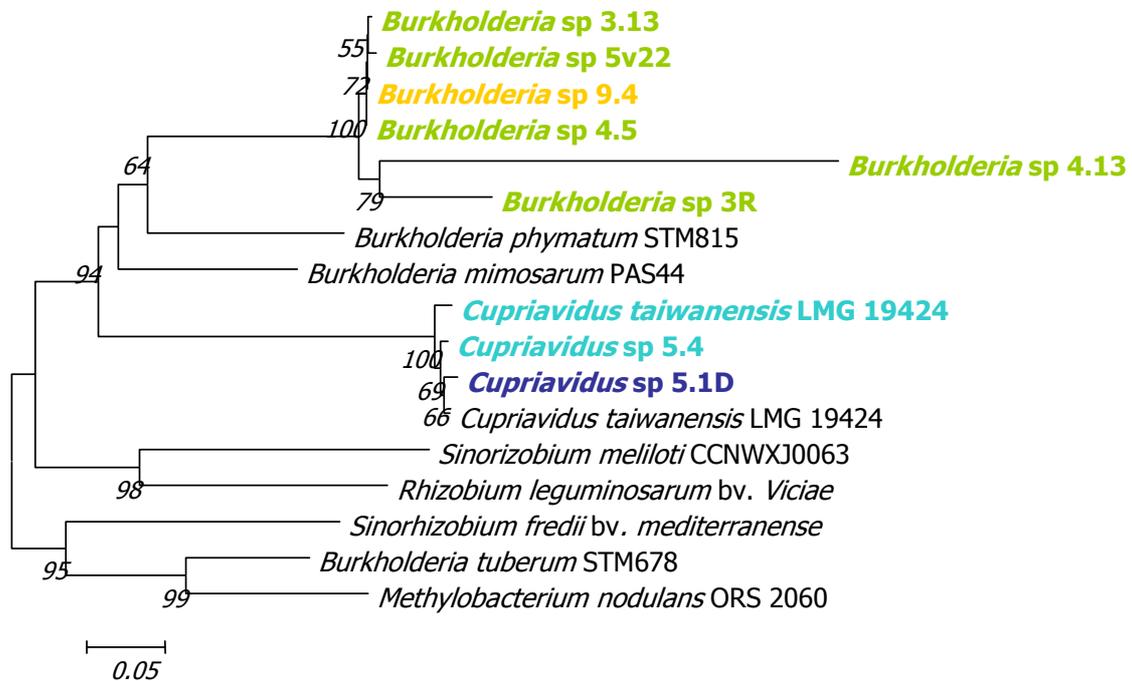


Figura 10: Filogenia construida a partir de la secuencia del gen *nodA*. Las secuencias se analizaron por Neighbour Joining y como modelo de sustitución se utilizó Kimura 2 parámetros. Los genes indicados en color, corresponden a los aislamientos obtenidos en este proyecto. El indicado en color celeste es la cepa referencia que se amplificó, secuenció e incluyó en el análisis filogenético. Se utilizó un bootstrap de 1000 réplicas.

Los distintos colores, mostrados en la figura 10, determinan los grupos formados según la filogenia obtenida por el análisis del gen *16S* rARN.

Los 2 sub-grupos de las cepas de *Burkholderia* formados al analizar el gen *16S* rARN no están igualmente representados. De los 2 sub-grupos, 1 esta representados por 5 cepas, mientras que el restante por una única cepa. Esto puede deberse a diferencias en su secuencia nucleotídica de este gen.

En la figura 11 se observa la filogenia a partir de la secuencia del gen *nodC* obtenida mediante el uso del programa Mega 4.

En el caso del género *Cupriavidus*, de 4 cepas analizadas, luego de varios intentos de amplificación no se logró obtener ningún amplicón. Solo fue posible amplificar el gen correspondiente a la cepa de referencia *C. taiwanensis* LMG19424, obteniéndose una banda de 600 pares de bases. Dicho amplicón se secuenció y analizó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos, agrupándose con un bootstrap de 100, junto a la cepa de referencia depositada en el banco de datos, resultado que valida la metodología empleada (Figura 11).

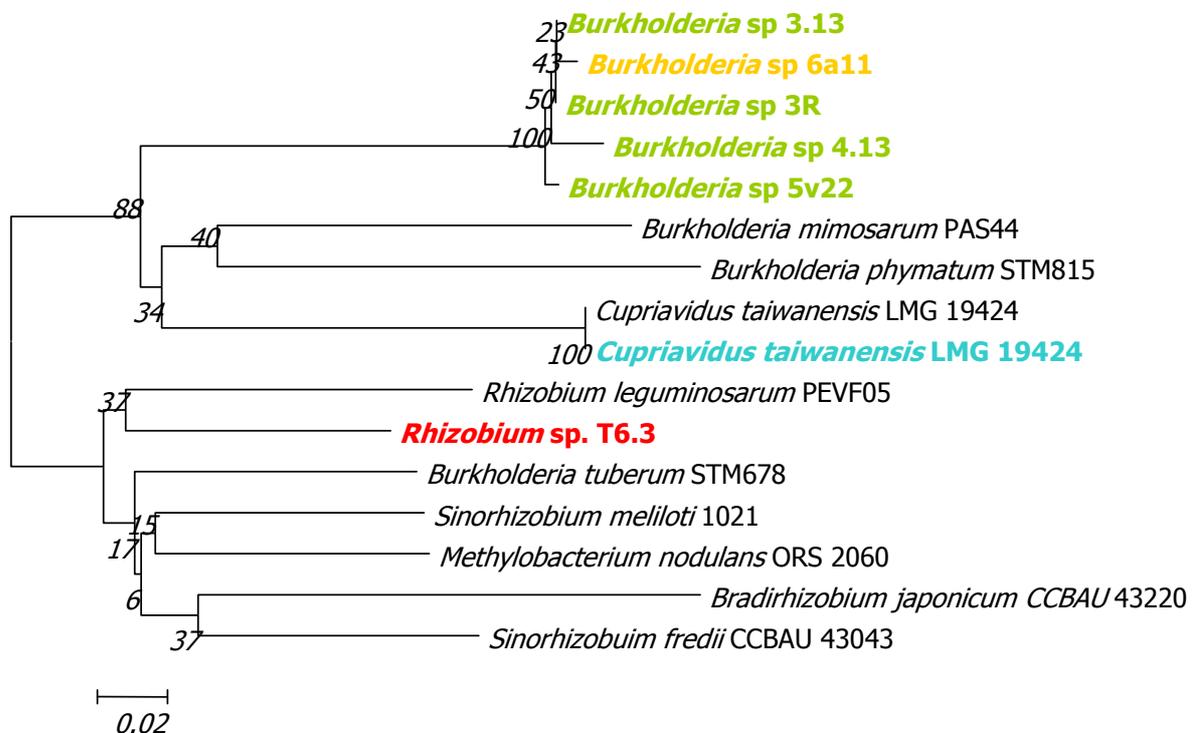


Figura 11: Filogenia construida a partir de la secuencia del gen *nodC*. Las secuencias se analizaron por Neighbour Joining y como modelo de sustitución se utilizó Kimura 2 parámetros. Los genes indicados en color, corresponden a los aislamientos obtenidos en este proyecto. El indicado en color celeste es la cepa referencia que se amplificó, secuenció e incluyó en el análisis filogenético. Se utilizó un bootstrap de 1000 réplicas.

Por otra parte se logró amplificar el gen *nodC* de 9 cepas de la colección. Los análisis demostraron que las bacterias pertenecientes al grupo *Burkholderia* forman un único grupo entre ellas dentro de las β - proteobacterias, al igual que sucedía con el árbol filogenético obtenido a partir del gen *nodA*.

En este análisis fue posible amplificar la secuencia correspondiente al gen *nodC* de la cepa *Rhizobium* sp. T6.3 la cual se agrupó junto con las α - proteobacterias y en el mismo nodo que la cepa de referencia *R. leguminosarum* PEVF05.

Los distintos colores, mostrados en la figura 11, determinan los grupos formados según la filogenia obtenida por el análisis del gen *16S* rARN.

Como sucedió con el análisis del gen *nodA*, los 2 subgrupos de *Burkholderia* no están igual representados.

4.2. Ensayos de cinética de nodulación

4.2.1. Esterilización y germinación de semillas

La finalidad de este ensayo fue determinar la efectividad de los métodos de esterilización estudiados y si los mismos afectan la germinación de las semillas. Para ello fueron evaluadas dos metodologías de esterilización diferentes, las cuales utilizan como agentes esterilizantes $HgCl_2$ o $NaClO$.

En la figura 12, se muestra el porcentaje de contaminación total. El total de plantas ensayadas fue de 166, de las cuales 14 resultaron contaminadas.

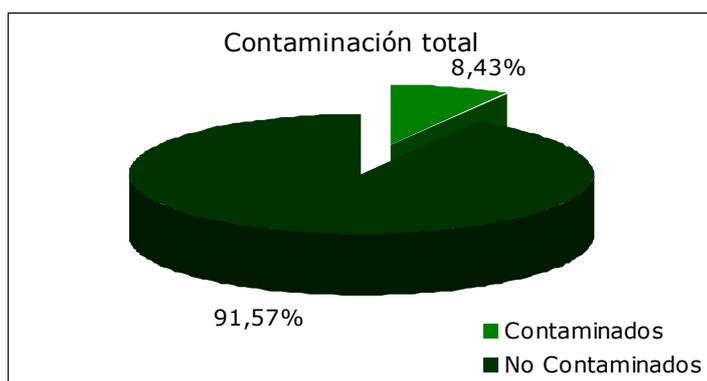


Figura 12: Porcentaje de contaminación de las semillas utilizadas en los ensayos de cinética de nodulación

De las 14 plantas que presentaron contaminación, un 42,86 % (6 plantas) provenían del uso de $HgCl_2$ como agente de esterilización, mientras que el 57,14 % (8 plantas) del empleo de $NaClO$ como agente esterilizante (figura 13).

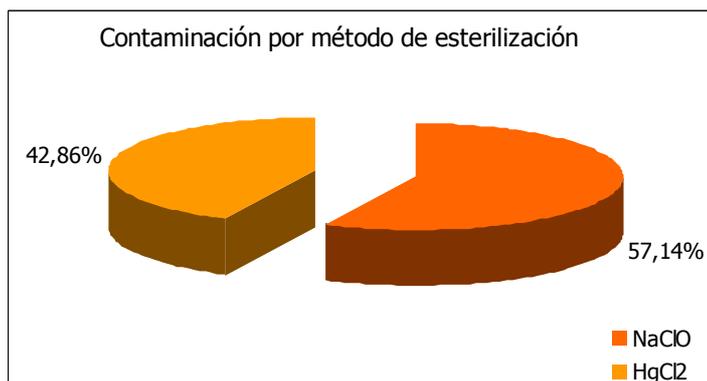


Figura 13: Porcentaje de contaminación discriminado por agentes de esterilización, HgCl₂ y NaClO.

Los resultados no indicarían una clara diferencia entre el empleo de uno u otro de los agentes ensayados. Teniendo en cuenta la leve diferencia obtenida, en los ensayos restantes se empleó HgCl₂ como agente de esterilización.

4.2.2. Ensayos de cinética de nodulación en plantas en condiciones gnotobióticas

En un primer ensayo se evaluó la cinética de nodulación de las cepas bacterianas durante 103 días en relación a los medios de cultivos para plantas utilizados (Jensen y McKnight) (Figura 14).



Figura 14: Evaluación de la cinética de nodulación en los medios de crecimiento para plantas Jensen y McKnight.

De las seis cepas ensayadas, *Burkholderia* sp. 4.13, *Cupriavidus* sp. 5v12, *Rhizobium* sp. T6.3 y BR 8.27 (Figura 15A, C, E y F respectivamente) mostraron mayor velocidad de nodulación en plantas crecidas en medio Jensen. Las cepas *Burkholderia* sp. 9.4 y *Cupriavidus* sp. 5.5 presentaron una velocidad similar en los 2 medios ensayados (Figura 15B y D respectivamente).

Estudio de la nodulación en una de simbioses de *Parapiptadenia rigida* (Angico)

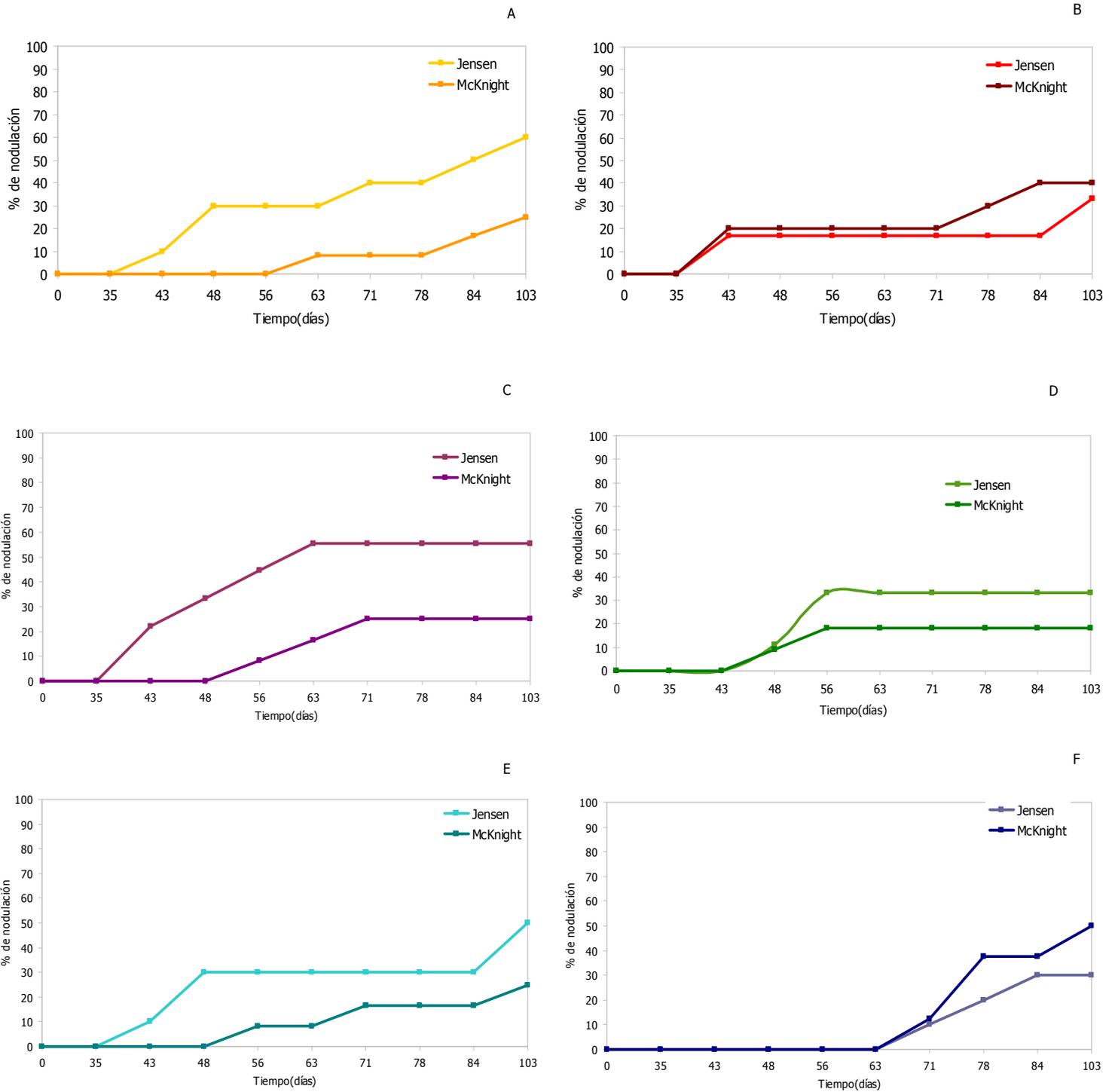


Figura 15: Efecto del medio de cultivo de las plantas sobre cinética de nodulación de plantas de Angico por aislamientos nativos. La misma fue expresada como el número de plantas de *P. rigida* noduladas en relación al número de plantas total. **A:** *Burkholderia* sp. 4.13; **B:** *Burkholderia* sp. 9.4; **C:** *Cupriavidus* sp. 5v12; **D:** *Cupriavidus* sp. 5.5; **E:** *Rhizobium* sp. T6.3; **F,** BR 8.27.

Teniendo en cuenta estos resultados, el medio de cultivo seleccionado para los siguientes ensayos fue Jensen.

Con el fin de determinar la influencia del N (en forma de KNO_3) en la cinética de nodulación de *P. rigida*, se evaluó la aparición de nódulos en el hospedero con o sin el agregado de este compuesto. En la figura 16 se muestra la evaluación de la cinética de nodulación durante 71 días de las cepas seleccionadas.

Es importante resaltar que en este ensayo, el porcentaje de plantas noduladas a los 71 días de inoculadas fue mayor que el obtenido en el primer ensayo. Una posible explicación es que las semillas utilizadas fueron recolectadas y a los pocos días utilizadas en los ensayos, mientras que en los ensayos anteriores las semillas se mantuvieron en frío varios meses.

Los resultados mostraron que en el caso de las cepas pertenecientes al género *Burkholderia*, el agregado de KNO_3 inhibió la nodulación (Figura 16A y B). Sin embargo para las cepas pertenecientes al género *Cupriavidus* (Figura 16C y D), el agregado de N solo retardó la nodulación observándose que en los medios sin el agregado de N los nódulos aparecieron a los 27 días de la inoculación mientras que con el agregado de KNO_3 la aparición de los primeros nódulos fue a los 48 días. Asimismo el número total de nódulos no fue diferente entre las condiciones ensayadas cuando las plantas fueron inoculadas con cepas del género *Cupriavidus*. Los controles utilizados, *B. phymatum* STM815 y *C. taiwanensis* LMG19424 (Figura 16E y F respectivamente), se comportaron de manera similar que los aislamientos de *Burkholderia* ensayados no detectándose nódulos en presencia de KNO_3 .

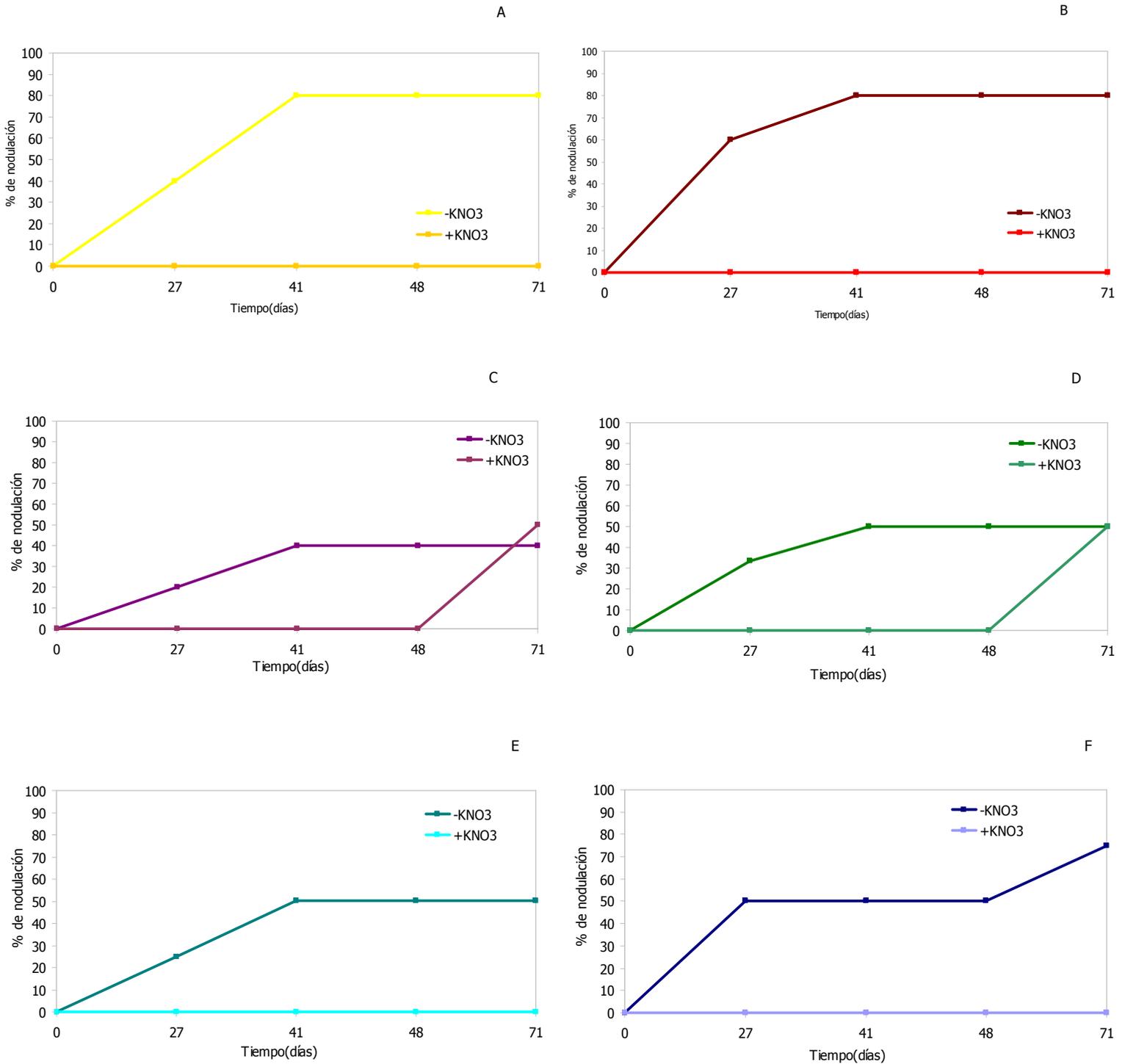


Figura16: Efecto de l agregado de N (KNO_3) en la cinética de nodulación de plantas de Angico por aislamientos nativos. La cinetica de nodulación se expresó como el número de plantas de *P. rigida* noduladas en relación al número de plantas total. **A:** *Burkholderia* sp. 4.13; **B:** *Burkholderia* sp. 9.4; **C:** *Cupriavidus* sp. 5v12; **D:** *Cupriavidus* sp. 5.5; **E:** *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424; **F:** *Burkholderia phymatum* STM815.

Cuando se estudió el efecto del agregado de KNO_3 en la cinética de nodulación, en el hospedero *M. pudica*, la cinética de nodulación por parte de las bacterias difirió al obtenido cuando se utilizó *P. rigida* como hospedero, se observó que todas las cepas formaron nódulos al quinto día luego de la inoculación con y sin agregado de N, con excepción de la cepa *Cupriavidus* sp. 5.5 (Figura 17). Para el caso de este hospedero las bacterias pertenecientes al género *Burkholderia* fueron capaces de formar nódulos aún en presencia de N, el número de plantas noduladas por *Burkholderia* sp. 4.13 fue el mismo que sin agregado KNO_3 (Figura 17A). Asimismo la cepa *Burkholderia* sp. 9.4 también fue capaz de nodular en presencia de KNO_3 , aunque la velocidad de aparición de los primeros nódulos fue más lenta y el número total de plantas noduladas fue menor en este caso (Figura 17B).

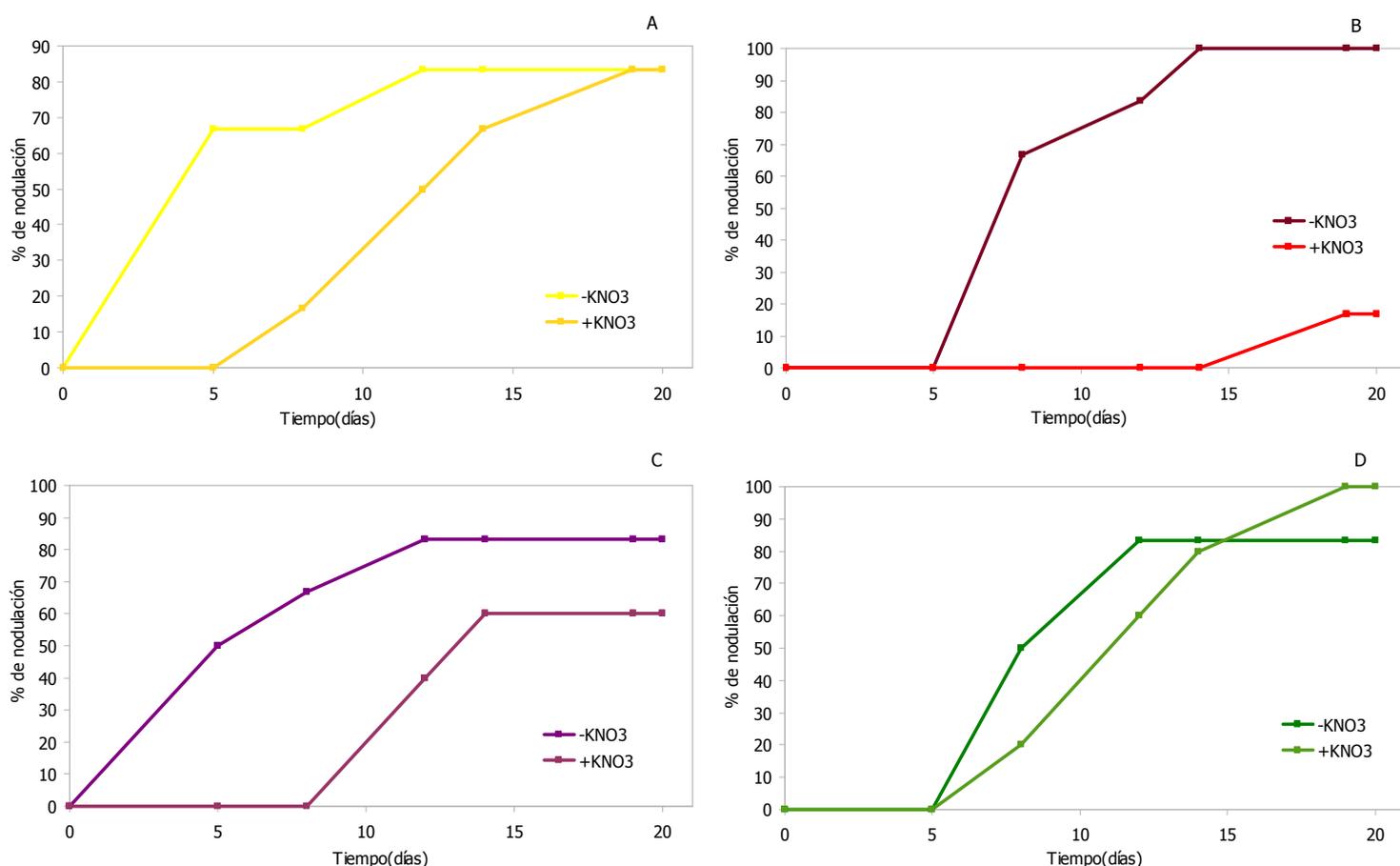


Figura 17: Efecto del agregado de N (KNO_3) en la cinética de nodulación de plantas de *M. pudica* inoculadas con aislamientos nativos de Angico. La cinética fue expresada como el número de plantas de *M. pudica* que presentaron nódulos en relación al número de plantas total. **A:** *Burkholderia* sp. 4.13; **B:** *Burkholderia* sp. 9.4; **C:** *Cupriavidus* sp. 5v12; **D:** *Cupriavidus* sp. 5.5.

Las cepas pertenecientes al género *Cupriavidus* se comportaron de manera similar en ambos hospederos ya que la nodulación no fue inhibida por la presencia de KNO_3 en ninguno de los dos hospederos (Figura 17C y D). Es interesante resaltar que cuando se empleó *M. pudica* como planta hospedera y *Cupriavidus* sp. 5.5 como inoculante, se obtuvieron más nódulos en presencia de KNO_3 que en ausencia (Figura 17 D).

4.3. Estudio de la capacidad FBN en vida libre

Con la finalidad de determinar si los aislamientos estudiados son capaces de fijar biológicamente el nitrógeno en vida libre, la actividad nitrogenasa se determinó mediante el ensayo de reducción del acetileno (ARA). Para esto, se ensayaron diferentes variables en el medio de cultivo así como en la manera de inocular las cepas, con la finalidad de obtener un crecimiento bacteriano en forma de película en medios semisólidos sin N, característicos de bacterias diazótrofes (Figura 18). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el medio de cultivo semisólido utilizado para los ensayos de ARA fue JMV-N suplementado con 0,05 g/l de extracto de levadura. A las cepas que presentaron crecimiento característico en forma de película, se les realizó el ensayo de ARA por cromatografía en fase gaseosa, según lo descrito anteriormente.

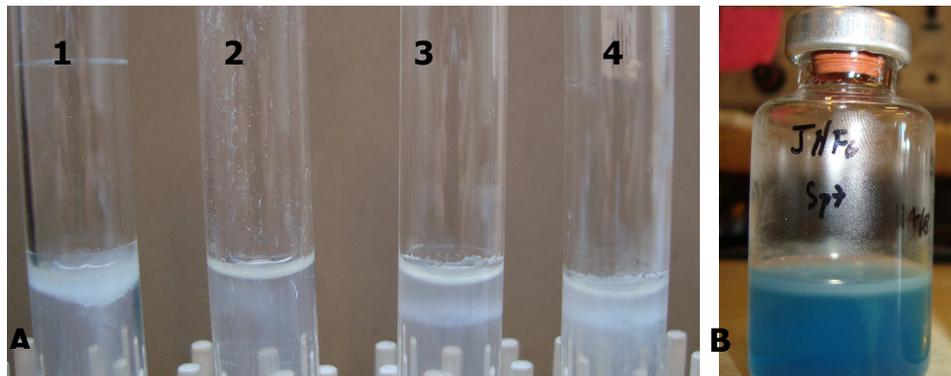


Figura 18: Estudio del crecimiento bacteriano en medios semisólidos sin N. **A:** tubos de ensayos utilizados para determinar en que condiciones se obtenía el mejor crecimiento. Cada tubo de ensayo conteniendo medio de cultivo JMV se inoculó con una única cepa. **1:** *A. brasilensis* Sp7; **2:** *S.meliloti* 1021; **3:** *Burkholderia* sp. 4.13 y **4:** *Burkholderia* sp. 5v22. **B:** crecimiento en vial mostrado y la película característica de la cepa control *A.brasilensis* Sp7.

De las cepas ensayadas que presentaron un crecimiento característico en película, en medio semisólido sin N, la única que produjo aparición de etileno en el ensayo de ARA fue el control positivo, *A. brasilensis* Sp7. En las restantes cepas evaluadas

solamente se observó el pico correspondiente a acetileno, lo que indica que no hubo reducción de acetileno a etileno y por lo tanto no habría actividad nitrogenosa detectable en las condiciones ensayadas.

Las variables ensayadas y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Crecimiento bacteriano característico en película en medios de cultivo semisólidos sin N

Medio		Tratamiento del inóculo	Forma de inoculación	Cepa			
				Sp7	1021	4.13	5V22
JMV	Con E.L.	Con lavado	Inoculación superficial	Si*	No**	No	Si
			Inoculación incluida	Si	No	No	Si
			Ansa recta	No	No	No	No
		Sin Lavado	Inoculación superficial	Si	No	No	Si
			Inoculación incluida	Si	No	Si	Si
			Ansa recta	No	No	Si	Si
	Sin E.L.	Con Lavado	Inoculación superficial	Si	No	No	Si
			Inoculación incluida	Si	No	No	No
			Ansa recta	No	No	No	No
		Sin Lavado	Inoculación superficial	Si	No	Si	Si
			Inoculación incluida	Si	No	Si	Si
			Ansa recta	No	No	No	No
JNFb	Con E.L.	Con lavado	Inoculación superficial	No	No	No	No
			Inoculación incluida	Si	No	No	No
			Ansa recta	No	No	No	No
		Sin Lavado	Inoculación superficial	Si	Si	Si	Si
			Inoculación incluida	No	No	Si	Si
			Ansa recta	Si	No	No	No
	Sin E.L.	Con Lavado	Inoculación superficial	No	No	No	No
			Inoculación incluida	No	No	No	No
			Ansa recta	No	No	No	No
		Sin Lavado	Inoculación superficial	No	No	No	No
			Inoculación incluida	No	No	No	No
			Ansa recta	No	No	No	No
BMGM	Con E.L.	Con lavado	Inoculación superficial	Si	No	No	Si
			Inoculación incluida	No	No	No	No
			Ansa recta	No	No	No	No
		Sin Lavado	Inoculación superficial	Si	No	No	No
			Inoculación incluida	No	No	No	No
			Ansa recta	No	No	No	No
	Sin E.L.	Con Lavado	Inoculación superficial	Si	No	No	No
			Inoculación incluida	No	No	No	No
			Ansa recta	No	No	No	No
		Sin Lavado	Inoculación superficial	Si	No	No	No
			Inoculación incluida	No	No	No	No
			Ansa recta	No	No	No	No

*Si: se observa formación de película. **No: no se detecta formación de película.

Sp7: *A. brasilensis* Sp7; **1021:** *S. meliloti* 1021; **4.13:** *Burkholderia* sp. 4.13; **5v22:** *Burkholderia* sp. 5v22.

5. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue avanzar en el estudio de la interacción Angico-rizobios mediante el estudio del fenotipo de nodulación de una colección de simbioses de Angico.

5.1. Amplificación de los genes involucrados en la nodulación: genes *nod*

Para la amplificación de los genes *nodA* y *nodC* mediante reacciones de PCR se emplearon cebadores específicos diseñados en éste y otros trabajos (2, 17). En la tabla 4 se resumen los resultados obtenidos.

Como se mostró anteriormente, el gen *nodA* se logró amplificar en algunas de las cepas de la colección, siendo su producto de PCR secuenciado. En algunos casos se obtuvo un fragmento de tamaño similar al esperado, pero la secuencia resultante no coincidía con la esperada para el gen *nodA*. El que se haya amplificado un segmento del tamaño aproximado al esperado para estos genes, se debe a la existencia en el genoma de las bacterias estudiadas de una secuencia que presenta homología con el gen buscado. En los casos en los que no se obtuvo producto de amplificación, podrían deberse a que las secuencias de los genes *nodA* en estas cepas son muy divergentes con respecto al gen a partir del cual se diseñaron los cebadores.

Como se mencionó anteriormente, no fue posible la amplificación del gen *nodC* en ninguna cepa de la colección perteneciente al género *Cupriavidus*. Sin embargo se logró amplificar este gen en la cepa de referencia, *C. taiwanensis* LMG19424. Los cebadores utilizados fueron diseñados en este trabajo utilizando como molde el gen *nodC* de *C. taiwanensis* LMG19424, esperándose una banda teórica de 915 pares de bases (Tabla 4). El amplicón obtenido para esta cepa fue de 600 pb el cual fue secuenciado. Estudios de homología utilizando la herramienta BLAST del NCBI demostraron que en 433 pb la identidad fue 100% con el gen *nodC* depositado en el banco de datos, (código de acceso EU386154). De esta manera se confirmó que ese amplicón se correspondía al gen *nodC*, aunque su tamaño no fuera el esperado.

En la figura 19, se muestra el estudio *in silico* del lugar en que se unen los cebadores diseñados utilizando como molde el gen *nodC* de *C. taiwanensis*

LMG19424, así como el producto de amplificación esperado de 915 pb. En este esquema se muestra que el cebador 5' se une a la hebra líder en la base 341 mientras que en la hebra complementaria el cebador 3' se une en la base 1257, dando así un producto teórico de amplificación, de 915 pares de bases.



Figura 19: Estudio *in silico* del diseño de cebadores *nodC*. Se muestran los cebadores diseñados en este trabajo para el gen *nodC* y su secuencia blanco en *C. taiwanensis* LMG19424 (código de acceso EU386154) depositado en el NCBI. Esquema logrado con el programa Artemis (42).

El que se haya obtenido un producto de 600 pares de bases en la reacción de PCR puede explicarse por la presencia de otras secuencias de unión al cebador, ya sea en la hebra líder o en la complementaria, aunque las únicas regiones complementarias a los cebadores mostrados en la figura 19 fueron las únicas detectadas utilizando el Programa Mega4.

Dado que no fué posible amplificar el gen *nodC* a partir de las cepas pertenecientes al género *Cupriavidus* presentes en la colección se puede pensar que el gen *nodC* de éstas, diverge de la cepa de referencia. Hay que tener en cuenta que sólo se dispone de una única cepa de β -rizobio del género *Cupriavidus* (*C. taiwanensis* LMG19424) de secuencia conocida, por lo que una comparación robusta no es posible.

5.2. Filogenia de los genes *nodA* y *nodC*

En esta parte del trabajo se propuso como objetivo el inferir las relaciones filogenéticas entre las cepas de la colección y las cepas depositadas en el banco de datos a partir de las secuencias obtenidas de los genes *nodA* y *nodC*. Para esto se utilizó el programa Mega 4, se analizó por Neighbour Joining y como modelo de sustitución se utilizó Kimura 2 parámetros.

Dada la diversidad de secuencias depositadas en el banco de datos, no fue posible la obtención de árboles filogenéticos para ambos genes con las mismas cepas bacterianas. El hecho de contar con árboles idénticos en cepas, ya sea depositadas

en el banco de datos, así como pertenecientes a la colección, hubiese aportado un análisis más exhaustivo.

Diversos trabajos apoyan la existencia de un clado muy ramificado en los genes de nodulación que incluye exclusivamente a las β -proteobacteria, sugiriendo que los β -rizobios tienen una historia evolutiva antigua e independiente y que no han surgido de recientes transferencias horizontales de genes desde los α -rizobios (7). Del árbol filogenético obtenido en el trabajo de Adam y colaboradores (2007) se desprende que el clado *Cupriavidus* anida dentro de un conjunto de cepas de *Burkholderia* indígenas de América del Sur (2). Por esto se plantea que *Cupriavidus* adquirió los genes de nodulación y los genes que codifican para la enzima nitrogenasa por transferencia horizontal de genes de las *Burkholderia* y no de las α -proteobacterias nodulantes; evento que probablemente haya ocurrido en América tropical (2, 5). En este trabajo, las cepas *Cupriavidus* se agrupan junto a las cepas de *Burkholderia* en un mismo nodo pero no dentro de un mismo grupo como lo reportado, planteando así que las cepas de *Cupriavidus* aisladas en trabajos previos y estudiados en este trabajo divergen de las aisladas en Costa Rica (2).

La presencia en α - y β -rizobios de genes *nodABC* similares y filogenéticamente relacionados, apoya fuertemente la hipótesis de un origen único para los genes *nod*. Sin embargo no está claro si un único evento es el responsable de la diversificación de los genes de nodulación de una subclase a la otra o si fueron varios eventos que ocurrieron entre las dos subclases (12).

En este trabajo se demostró una vez más, que los genes analizados provenientes de las cepas de *Burkholderia* y *Cupriavidus* forman un clado distinto al de las α -proteobacterias. Esta afirmación está apoyada estadísticamente ya que los bootstrap obtenidos en ambos árboles filogenéticos son mayores a 70 (44). En el caso del nodo que separa las α -proteobacterias de las β -proteobacterias en las filogenias correspondientes a los genes *nodA* y *nodC* los bootstraps son de 94 y 88 respectivamente.

A su vez, en lo referente a la agrupación entre géneros, las cepas pertenecientes a un mismo género se agruparon entre ellas con un respaldo de bootstrap de 100. Este trabajo aporta más evidencia a la teoría que plantea que las β -

proteobacterias no han adquirido los genes de nodulación por transferencia horizontal de genes desde las α -proteobacterias, ya que forman grupos robustamente distintos a las mismas.

5.3. Cinética de nodulación

Uno de los objetivos particulares planteados fue el estudio de la cinética de nodulación de aislamientos de Angico en dos hospederos, *P. rigida* y *M. pudica* bajo distintas condiciones, medios de cultivo, agentes distintos de esterilización y la presencia de nitrógeno en forma de KNO_3 en el medio de cultivo.

Resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la cinética de nodulación varió según el hospedero y la presencia o ausencia de KNO_3 en el medio de cultivo de plantas.

En el caso de Angico, la cantidad de plantas noduladas en relación al número totales de plantas fue menor en relación a *M. pudica*. A su vez la velocidad de nodulación es más lenta, y disminuyó más aún en presencia de KNO_3 . En el experimento sin presencia de KNO_3 , el primer nódulo se observó a los 27 días mientras que en el segundo experimento (con presencia de KNO_3) a los 48 días, en el caso de las bacterias pertenecientes al género *Cupriavidus*. La aparición del primer nódulo en las bacterias pertenecientes a las *Burkholderia* fue a los 27 días al igual que las cepas referencias ensayadas, mientras que en presencia de KNO_3 no se observó la aparición de nódulos. Estos resultados fueron los esperados teniendo en cuenta que la fijación biológica de nitrógeno en AFN es inhibida por nitrógeno inorgánico (15). Es interesante resaltar que las únicas cepas que establecieron simbiosis en presencia de KNO_3 en Angico, fueron las pertenecientes al género *Cupriavidus*.

Cuando se empleó *M. pudica* como planta hospedera se observó que todas las cepas bacterianas eran capaces de formar mayor número de nódulos y que el total de plantas noduladas también era mayor. Esto podría significar que *M. pudica* es más eficiente al momento de establecer una asociación simbiótica con este grupo de bacterias

En el experimento en el cual se agregó KNO_3 , la nodulación fue mas lenta en las cepas *Burkholderia* sp. 9.4 (primer nódulo a los 19 días) y *Cupriavidus* sp. 5V12 (primer nódulo a los 8 días). En el caso de las cepas *Burkholderia* sp. 4.13 y

Cupriavidus sp. 5.5 el primer nódulo se observó a los 5 días de la inoculación y el número de nódulos obtenido fue el mismo que sin agregado de KNO_3 . En el caso de *Burkholderia* sp. 4.13 alcanzó la misma cantidad de nódulos pero en un tiempo mayor (Figura 17). Es así que, bacterias que no establecieron simbiosis en presencia de KNO_3 con un hospedero lo lograron con otro, siendo que en presencia de nitrógeno inorgánico la nodulación es inhibida (15).

Según trabajos previos, las cepas del género *Burkholderia* son los simbioses principales de las Mimosas en Brasil y las del género *Cupriavidus* son los principales simbioses de estas plantas en Taiwan (7, 11).

Con miras a la formulación de un bioinoculante para la forestación con angico, sería de vital importancia estudios de nodulación en presencia de nitrógeno a nivel de campo. Asimismo son necesarios más ensayos en invernáculo así como en campo para determinar los efectos de la fertilización nitrogenada en la nodulación. A su vez, en el caso de detectarse nodulación efectiva, determinar si el nódulo realmente está fijando nitrógeno.

5.4. Estudios de FBN en vida libre

Las cepas de interés se crecieron en medios de cultivo semisólido sin N con la finalidad de detectar aislamientos formadores de una película de crecimiento. Este tipo de crecimiento se observó en las cepas mostradas en la tabla 5. Los resultados obtenidos muestran que ninguno de los aislamientos fija N_2 en vida libre en las condiciones ensayadas, aplicando la metodología del ensayo de reducción de acetileno (ARA).

Esto puede deberse a que el crecimiento en medio semisólido libre de N en forma de película característica, no implica por sí mismo la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en vida libre (17).

Para evaluar la capacidad de estas cepas para reducir el acetileno se debe continuar poniendo a punto la técnica y determinar el efecto de diversas variables, tales como el medio de cultivo, el uso de diferentes fuentes de carbono (mas precisamente las que afectan la FBN) así como los tiempos de crecimiento e incubación con el gas acetileno y el agregado de cofactores de la enzima nitrogenasa, como el molibdeno. En este trabajo se empleó un medio de cultivo donde se había obtenido un buen crecimiento bacteriano. Una posible variación

sería cambiar las concentraciones de extracto de levadura del medio, ya que en trabajos previos se obtuvieron valores de etileno detectables con el agregado de 0,02 g/l de extracto de levadura (17).

Interesante es el hecho de que *A. brasilensis* Sp7, fue capaz de reducir el acetileno en las condiciones ensayada pero no así la cepa de *B. phymatum* STM815, en la cual se había documentado su habilidad de fijar nitrógeno en vida libre (17). Esto remarca la necesidad de lograr reproducir las condiciones requeridas para que al menos la cepa de *B. phymatum* de referencia pueda fijar nitrógeno en vida libre.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas a tener en cuenta para continuar con el estudio, se plantea:

- 1) Avanzar en las condiciones a emplear en el ensayo de reducción de acetileno
- 2) Realizar un nuevo diseño de los cebadores utilizados para amplificar los genes *nodA* y *nodC*.

Con respecto al ensayo de reducción de acetileno, habría que poner a punto las condiciones de cultivo donde se detecte actividad de la nitrogenasa empleando cepas bacterianas pertenecientes al mismo género que las de la colección en las cuales se haya demostrado previamente su capacidad de fijar nitrógeno en vida libre como por ej. *B. phymatum*, *B. tuberum* STM678, *B. tropica* Ppe8, *B. unamae* MTI641, *B. vietnamiensis* TVV75 y *Burkholderia* sp. M130 (17).

Con respecto al diseño de cebadores, un paso a seguir sería un estudio de las nuevas secuencias depositadas en el banco de datos provenientes de ambos géneros bacterianos. Una vez seleccionadas las secuencias, mediante estudios *in silico*, diseñar nuevos cebadores. Amplificar por PCR las cepas bacterianas en las cuales no fue posible la amplificación anteriormente, secuenciar y realizar estudios filogenéticos de las mismas.

En el ensayo de cinética de nodulación se evaluó la aparición de nódulos. Sin embargo, de esta manera no se puede asegurar que la fijación biológica de nitrógeno esté sucediendo efectivamente dentro del nódulo. Una aproximación indirecta para determinar la capacidad de fijar el nitrógeno sería por medio de la habilidad de promover el crecimiento vegetal, como por ejemplo determinando las medidas de altura de tallo y diámetro o por análisis del peso seco de la zona aérea y radicular de plantas inoculadas con las cepas estudiadas en relación a plantas testigos sin inocular. Una aproximación directa para evaluar la FBN, sería mediante el ensayo de reducción de acetileno en muestras de nódulos. Otra aproximación directa implicaría el uso de microscopia de fluorescencia y técnicas moleculares como por ejemplo anticuerpos que se unan a la nitrogenasa o el empleo de cepa bacterianas marcadas con un gen reportero fusionado al gen estructural de la enzima nitrogenasa de forma de detectar su presencia dentro del nódulo.

7. ANEXO 1:

7.1. Medios de cultivo

Para las cepas de *Burkholderia* y *Cupriavidus* se utilizaron los siguientes medios de cultivo: YEM, JMV, JNFb y BMGM.

Medio YEM

K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10,0 g
Extracto de levadura	0,5 g
Agua c.s.p. 1000 ml	

El pH se ajustó a 6,8- 7,0. Para la preparación de todos los medios se utilizó agua desionizada de resistividad superior a 17,5 MΩ/cm. Para solidificar los medios, se utilizó agar a una concentración de 18 g/l.

La esterilización de los mismos se realizó a 121 °C durante 20 minutos.

Medio JMV

Manitol	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,6 g
KH ₂ PO ₄	1,8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,015 g
FeCl ₃	0,034 g
Solución micronutrientes	2,0 ml
Vitamina	1,0 mL
Extracto de levadura	0,05 g
Agua c.s.p. 1000 ml	

El pH se ajustó a 6,0. Para solidificar el medio, se utilizó agar a una concentración de 1,6 g/l.

Medio JNFb

Acido málico	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,6 g
KH ₂ PO ₄	1,8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,015 g
FeCl ₃	0,034 g
Solucion micronutrientes	2,0 mL
Vitamina	1,0 mL
Extracto de levadura	0,05 g
KOH	4,5 g
Agua c.s.p. 1000 ml	

El pH se ajustó a 6,0 con KOH 1%. Para solidificar el medio, se utilizó agar a una concentración de 1,7 g/l.

Medio BMGM

Acido málico	2,0 g
Glucosa	2,0 g
Manitol	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,002 g
FeCl ₃	0,01 g
Extracto de levadura	0,05 g
Agua c.s.p. 1000 ml	

Se ajustó el pH a 6,0. Para solidificar el medio, se utilizó agar a una concentración de 2,3 g/l.

En los ensayos de cinética de nodulación, las plantas de *P. rigida* y *M. pudica* fueron crecidas en los medios de cultivo: Jensen y McKnight

Medio Jensen

CaHPO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃	0,01 g
Solución de micronutrientes	1 ml
Agua c.s.p. 1000 ml	

Se ajustó el pH a 6,0. Para solidificar el medio, se utilizó agar a una concentración de 16 g/l.

Medio McKnight

KH ₂ PO ₄	0,2 g
CaSO ₄ .2H ₂ O	1,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
KCl	0,3 g
FeCl ₃	0,14 g
Solución de micronutrientes	1,0 ml
Agua c.s.p. 1000 ml	

Se ajustó el pH a 6,0. Para solidificar el medio, se utilizó agar a una concentración de 16 g/l.

7.1.1. Solución de micronutrientes

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ .H ₂ O	2,08 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22 g
MoO ₃ .H ₂ O	0,09 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08 g
Agua c.s.p. 1000ml	

7.1.2. Solución de vitaminas

Biotina	0,010 g
Pyrodoxal-HCl	0,020 g
Agua c.s.p 1000 ml	

7.2. Buffers

Taq Buffer con KCl 10X

Componente	Concentración
Tris-HCl (pH 8,8 a 25 °C)	100 mM
KCl	500 mM
Nonidet P40	0,8% (v/v)

Tris-Acético-EDTA (TAE) 1X

Componente	Concentración
Tris-Acetato	0,04 M
EDTA	0,001 M

8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Amadou C., G. Pascal, S. Mangenot, M. Glew, C. Bontemps, D. Capela, S. Carrère, S. Cruveiller, C. Dossat, A. Lajus, M. Marchetti, V. Poinot, Z. Rouy, B. Servin, M. Saad, C. Schenowitz, V. Barbe, J. Batut, C. Médigue, and C. Masson-Boivin.** 2008. Genome sequence of the β -rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. *Genome Research* **18**:1472-1483.
2. **Andam C. P., S. J. Mondo, and M. A. Parker.** 2007. Monophyly of *nodA* and *nifH* Genes across Texan and Costa Rican Populations of *Cupriavidus* Nodule Symbionts. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:4686-4690.
3. **Balachandar D., P. Raja, K. Kumar, and S. P. Sundaram.** 2007. Non-rhizobial nodulation in legumes. *Biotechnology and Molecular Biology Review* **2**:049-057.
4. **Baldani V. L. D.** 1996. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonizaçãoe infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Tese de Doutorado. UFRRJ, Seropédica.
5. **Barrett C. F., and M. A. Parker.** 2006. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. Nodule Bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:1198-1206.
6. **Battistoni F., R. Platero, F. Noya, A. Arias, and E. Fabiano.** 2002. Intracellular Fe content influences nodulation competitiveness of *Sinorhizobium meliloti* strains as inocula of alfalfa. *Soil Biology & Biochemistry* **34**:593-597.
7. **Bontemps C., G. Elliott, M. Simon, F. Dos Reis, E. Gross, R. Lawton, N. Neto, M. Loureiro, S. De Faria, J. Sprent, James E., and P. Young.** 2010. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Molecular Ecology* **19**:44-52.

8. **Broughton W. J., S. Jabbouri, and X. Perret.** 2000. Keys to Symbiotic Harmony. *Journal of Bacteriology* **182**:5641-5652.
9. **Brussa C. A., and J. A. Grela.** 2007. Flora Arbórea del Uruguay con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó. COFUSA, Rivera, Uruguay.
10. **Capone D. G.** 1993. Determination of nitrogenase activity in aquatic samples using the acetylene reduction procedure. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*.
11. **Chen W. M., S. Laevens, T. M. Lee, T. Coenye, P. De Vos, M. Mergeay, and P. Vandamme.** 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**:1729-1735.
12. **Chen W.-ming, S. M. D. Faria, R. M. Pitard, J. L. Simo, A. R. Prescott, G. N. Elliott, J. I. Sprent, J. P. W. Young, and E. K. James.** 2005. Proof that *Burkholderia* Strains Form Effective Symbioses with Legumes: a Study of Novel *Mimosa*-Nodulating Strains from South America. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:7461-7471.
13. **Chen W.-M., E. K. James, J.-H. Chou, S.-Y. Sheu, S.-Z. Yang, and J. I. Sprent.** 2005. β -Rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. *New Phytologist* **168**:661-675.
14. **Chen W.-ming, L. Moulin, C. Bontemps, and P. Vandamme.** 2003. Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by beta-Proteobacteria Is Widespread in Nature. *Journal of Bacteriology* **185**:7266-7272.
15. **Danso S. K. A., G. D. Bowen, and N. Sanginga.** 1992. Biological nitrogen fixation in trees in agro-ecosystems. *Plant and Soil* **141**:177-196.
16. **Djordjevic M. A., W. Zurkowski, J. Shine, and B. G. Rolfe.** 1983. Sym Plasmid Transfer to Various Symbiotic Mutants of *Rhizobium trifolij*, *R. leguminosarum*, and *R. meliloti*. *Journal of Bacteriology* **156**:1035-1045.

17. **Elliott G. N., W. Chen, J. Chou, H. Wang, S. Sheu, L. Perin, V. M. Reis, L. Moulin, M. F. Simon, C. Bontemps, J. M. Sutherland, R. Bessi, S. M. De Faria, M. J. Trinick, A. R. Prescott, J. I. Sprent, and E. K. James.** 2007. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen- fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. *New Phytologist* **173**:168-180.

18. **Estrada-de Los Santos P., R. Bustillos-Cristales, and J. Caballero-Mellado.** 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:2790-2798.

19. **Evans H. J., and R. H. Burris.** 1992. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years, p. 1-42. *In* G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (ed.), *Biological nitrogen fixation*.

Chapman & Hall, New York. 20. **Frioni L.** 1999. Procesos microbianos. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

21. **Frioni L., Rodríguez A. and Meerhoff M.** 2001 Differentiation of rhizobia isolated from native legume trees in Uruguay. *Applied Soil Ecology* **16**: 275-282.

22. **Gage D. J.** 2004. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *American Society of Microbiology* **68**:280-300.

23. **Galibert F., T. M. Finan, S. R. Long, A. Pühler, P. Abola, F. Ampe, F. Barloy-Hubler, M. J. Barnett, A. Becker, P. Boistard, G. Bothe, M. Boutry, L. Bowser, J. Buhrmester, E. Cadieu, D. Capela, P. Chain, A. Cowie, R. W. Davis, S. Dréano, N. A. Federspiel, R. F. Fisher, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, B. Golding, J. Gouzy, M. Gurjal, I. Hernandez-Lucas, A. Hong, L. Huizar, R. W. Hyman, T. Jones, D. Kahn, M. L. Kahn, S. Kalman, D. H. Keating, E. Kiss, C. Komp, V. Lelaure, D. Masuy, C. Palm, M. C. Peck, T. M. Pohl, D. Portetelle, B. Purnelle, U. Ramsperger, R. Surzycki, P. Thébault, M. Vandenbol, F.-J. Vorhölter, S. Weidner, D. H. Wells, K. Wong, K.-C.**

- Yeh, and J. Batut.** 2001. The Composite Genome of the Legume Symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**:668-672.
24. **Hirsch A. M., M. R. Lum, and J. A. Downie.** 2001. What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? *American Society of Plant Biologist* **127**:1484-1492.
25. **Jones K. M., H. Kobayashi, B. W. Davies, M. E. Taga, and G. C. Walker.** 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews* **5**:619-632.
26. **Kobayashi H., and W. J. Broughton.** 2008. Fine-tuning of symbiotic genes in rhizobia: flavonoid signal transduction cascade, p. 117-152. *In* M. Dilworth (ed.), *Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*. Springer Science and Business Media B.V.
27. **Lloret L., and E. Martínez-Romero.** 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **47**:43-60.
28. **Madigan M, Martinko J.** 2002. *Brock Biology of Microorganisms* (10 th ed.). Prentice Hall.
29. **Markmann K., and M. Parniske.** 2009. Evolution of root endosymbiosis with bacteria: how novel are nodules? *Trends in Plant Science* 77-86.
30. **Marschner H.** 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. London: Academic Press, 889 pp.
31. **McKnight T.** 1949. Efficiency of isolates of *Rhizobium* in the cow pea group, with proposed additions to this group. *Queensland Journal of Agricultural Science* **6**:61-76.
32. **Meade H. M., and E. R. Singer.** 1977. Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **74**:2076-8.

33. **Milnitsky F., Frioni L. and Agius F.** 1997. Characterization of rhizobia that nodulate native legume trees from Uruguay. *Soil Biology and Biochemistry*. **29**: 989-992.
34. **Moulin L., A. Munive, B. Dreyfus, and C. Boivin-Masson.** 2001. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**:948-950.
35. **Muñoz J., P. Ross, and P. Cracco.** 2007. Flora Indígena del Uruguay. Árboles y Arbustos Ornamentales. Editorial Hemisfero Sur.
36. **Olivares F., E. James, J. Baldani, and J. Dobereiner.** 1997. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant sugarcane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist* **135**:723- 737.
37. **Perret X., C. Staehelin, and W. J. Broughton.** 2000. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Society* **64**:180-201.
38. **Peters J. W., K. Fisher, and D. R. Dean.** 1995. Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annual Review of Microbiology* **49**:335-366.
39. **Rivera S. M., and M. S. Lenton.** 1999. La xilología y las propiedades mecánicas de cinco maderas nativas argentinas. *Quebracho* **7**:72-78.
40. **Rosenblueth M., and E. Martínez-Romero.** 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant Microbe Interactions* **19**:827-837.
41. **Rodríguez Blanco A., Csukasi F., Abreu C. and Sicardi M.** 2008. Characterization of rhizobia from *Sesbania* species native to seasonally wetland areas in Uruguay. *Biology and fertility of soils*. **44**: 925-932.
42. **Rutherford K., J. Parkhill, J. Crook, T. Horsnell, P. Rice, M. Rajandream, and B. Barrell.** 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)* **16**:944-5.

43. **Saitou N., and M. Nei.** 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology Evolution* **4**:406-425.
44. **Soltis P. S., and D. E. Soltis.** 2003. Applying the Bootstrap in Phylogeny Reconstruction. *Statistical Science* **18**:256-267.
45. **Sullivan J. T., and C. W. Ronson.** 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:5145-5149.
46. **Taiz L., and E. Zeiger.** 2006. *Fisiología Vegetal Tercera Ed.* Editorial Publicaciones de la Universitat Jaume I Castelló.
47. **Tamura K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology Evolution* **24**:1596-1599.
48. **Taulé C.** 2008. Búsqueda e identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno simbiontes de *Parapiptadenia rigida* (angico). Tesina de Grado. UdelaR, Montevideo.
49. **Ulibarri E. A., E. V. Gómez Sosa, A. M. Cialdella, R. H. Fortunato, and D. Bazzano.** 2002. *Leguminosas nativas y exóticas. L.O.L.A Literature of Latin America*, Buenos Aires, Argentina.
50. **Valverde A., E. Velázquez, C. Gutiérrez, E. Cervantes, A. Ventosa, and J.-M. Igual.** 2003. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**:1979-1983.
51. **Van Rhijn P., and J. Vanderleyden.** 1995. The rizobium-Plant Symbiosis. *Microbiological Reviews* **59**:124-142.
52. **Vandamme P., J. Goris, W.-ming Chen, P. de Vos, and A. Willems.** 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov.,

Nodulate the Roots of Tropical Legumes. Systematic and Applied Microbiology **25**:507-512.

53. **Vargas Do Nascimento P. K., E. T. Henz Franco, and E. Garcia Frassetto.** 2007. Desinfestação e Germinação in vitro de Sementes de *Parapiptadenia rigida* Bentham (Brenam). Revista Brasileira de Biociências **5**:141-143.

54. **Vincent J. M.** 1970. A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria. I.B.P. Handbook N° 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

55. **Zahran H. H.** 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Society **63**:968-989.