

Tesina para optar al título de Licenciada en Bioquímica

## Descripción de nuevos rizobios asociados a leguminosas nativas



**Bach. Florencia Garabato**

Tutor: Raúl Platero

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay  
2018

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecerle a Rufo por haberme dado esta oportunidad, por dejarme formar parte de este proyecto y del grupo de investigación y por tenerme paciencia en mis momentos de ansiedad con su mejor onda.

En especial quiero agradecerle a Lau que siempre estuvo al lado mío, dándome una mano cuando la necesitaba tanto dentro como fuera del laboratorio, ayudándome a bajar a tierra, escuchándome y entendiéndome siempre. Como ya te dije varias veces te convertiste en mi “gurú espiritual”.

También quiero agradecer a todos los del lab por generar un lindo lugar de trabajo, por las charlas eternas en los almuerzos para despejar la mente y por siempre estar dispuestos a ayudar, en particular a la Rubia, a Dani que me enseñó a usar el GelCompare, a Mauri por ayudarme con los árboles y a Silvia y Karen por dejarme hacer la pasantía con ellas.

A Mati y a Lu, fieles compañeras de escritura y grandes amigas, por no dejarme decaer en los momentos de estrés máximo y por siempre tener las palabras justas y subirme el ánimo. Solo ustedes saben lo que fue este proceso y agradezco pila tenerlas a mi lado.

A mis amigas y amigos de la vida y de la facu, por tenerme paciencia, por impulsarme a siempre seguir adelante y a ver el vaso medio lleno. En especial a Ine, Bel, Vicky, Sofi y Emi, que más que amigas ya son hermanas.

A Juani, por ser mi soporte y por siempre encontrar la forma de distraerme y hacerme ver que era el “último tirón”.

Por último a mi familia, por siempre apoyarme en todos mis desafíos, con mucha paciencia y cariño y por hacerme la persona que soy.

**Muchas gracias a todos!**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
Fijación biológica de nitrógeno (FBN).....	7
Nitrogenasa.....	8
Rizobios.....	11
Leguminosas.....	12
Leguminosas en Uruguay.....	13
Mimosas.....	14
Interacción rizobio – leguminosa.....	15
Flavonoides y factores Nod.....	16
Respuesta de la planta y formación del nódulo.....	18
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
<b>Selección de cepas.....</b>	<b>28</b>
Caracterización genotípica.....	29
Obtención de lisados bacterianos.....	29
Amplificación por PCR de los genes <i>recA</i> y <i>gyrB</i> .....	29
Análisis filogenéticos.....	30
Técnica de rep-PCR.....	31
Caracterización fenotípica.....	32
Crecimiento de las cepas a distintos pH.....	32
Solubilización de fosfato inorgánico.....	33
Solubilización de potasio.....	33
Producción de sideróforos.....	33
Uso de fuentes de carbono.....	34
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
Caracterización genotípica.....	36
Técnica de rep-PCR.....	36
Análisis filogenéticos.....	38
Crecimiento de las cepas a distintos pH.....	40
Solubilización de fosfato inorgánico.....	43

Solubilización de potasio.....	43
Producción de sideróforos. ....	43
Uso de fuentes de carbono.....	45
Crecimiento en medio líquido M9. ....	45
Crecimiento en medio sólido. ....	47
Crecimiento con compuestos aromáticos como fuente de carbono.....	47
Crecimiento con el compuesto aromático Fenol en medio sólido M9.....	48
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS. ....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>57</b>
Medios de cultivo.....	57
Soluciones. ....	59
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la reacción de la nitrogenasa. ....	10
<b>Figura 2.</b> Estructura general de un flavonoide. ....	16
<b>Figura 3.</b> Estructura general de los factores Nod. ....	17
<b>Figura 4.</b> Comienzo de la infección de la raíz por los rizobios. ....	19
<b>Figura 5.</b> Ingreso de los rizobios a las células infectadas. ....	20
<b>Figura 6.</b> Corte transversal de nódulo determinado e indeterminado. ....	21
<b>Figura 7.</b> Esquemas de cortes longitudinales de un nódulo indeterminado y un nódulo determinado. ....	21
<b>Figura 8.</b> Relación filogenética 16S entre los distintos aislamientos de <i>Mimosas</i> nativas y cepas de referencia del género <i>Cupriavidus</i> . ....	25
<b>Figura 9.</b> Relación filogenética basada en el análisis de 1155 genes ortólogos de especies de <i>Cupriavidus</i> simbióticos y especies secuenciadas más cercanas. ....	26
<b>Figura 10.</b> Ejemplo de placa para ensayo de crecimiento con compuestos aromáticos. ....	35
<b>Figura 11.</b> Gel de agarosa donde se observan los perfiles de bandas obtenidos mediante Box-PCR. ....	37
<b>Figura 12.</b> Árbol filogenético construido a partir de las secuencias del gen <i>gyrB</i> . ....	39
<b>Figura 13.</b> Árbol filogenético construido a partir de las secuencias del gen <i>recA</i> . ....	39
<b>Figura 14.</b> Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de los genes <i>recA</i> y <i>gyrB</i> concatenadas. ....	40
<b>Figura 15.</b> Crecimiento de las cepas en el rango de pHs 4 a 9. ....	422
<b>Figura 16.</b> Ensayo de solubilización de potasio en medio Aleksandrov. .Error! Bookmark not defined.3	
<b>Figura 17.</b> Ensayo de solubilización de fosfato inorgánico en medio NBRIP. ....	433
<b>Figura 18.</b> Producción de sideróforos por los distintos aislamientos. ....	444
<b>Figura 19.</b> Curvas de crecimiento en medio mínimo M9 con Manitol, Citrato y Succinato como única fuente de carbono. ....	466
<b>Figura 20.</b> Crecimiento con fenol de distintas cepas. ....	499

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Hospedero y lugar de colecta de las cepas a caracterizar.....	24
<b>Tabla 2.</b> Se presentan las cepas a caracterizar en este trabajo y cuáles son las especies tipo más cercanas. ....	28
<b>Tabla 3.</b> Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para amplificar los genes <i>recA</i> y <i>gyrB</i> y para la técnica de rep-PCR.....	32
<b>Tabla 4.</b> Medida del diámetro de los halos observados en el medio CAS para las cepas productoras de sideróforos. ....	44
<b>Tabla 5.</b> Crecimiento para las 10 cepas a caracterizar y las 6 cepas tipo con distintas fuentes de carbono en medio sólido M9. ....	47
<b>Tabla 6.</b> Medidas del diámetro de los halos de crecimiento para los distintos aislamientos utilizando Benzoato, Citrato o 4-hidroxibenzoato como única fuente de carbono. ....	48
<b>Tabla 7.</b> Capacidad de los distintos aislamientos de crecer utilizando fenol como única fuente de carbono. ....	49

## RESUMEN

Los rizobios son un grupo de bacterias capaces de asociarse simbióticamente con plantas de la familia de las leguminosas. Durante esta asociación, las bacterias alojadas en nódulos en las raíces de las plantas, llevan a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno, el cual es fundamental para la incorporación de nitrógeno a los ecosistemas. De esta forma los rizobios promueven el desarrollo y crecimiento de las leguminosas sin necesidad de fertilizantes químicos nitrogenados, ofreciendo así una práctica agronómica más amigable con el medio ambiente, que no contribuye con la eutrofización de cursos de agua.

El Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, donde se realizó este trabajo, ha descrito la presencia de rizobios, pertenecientes a la subclase de las beta-proteobacterias, asociados a diversas leguminosas nativas. El análisis filogenético basado en el gen que codifica para la subunidad 16S bacteriano, mostró que muchos de estos rizobios pertenecen al género *Cupriavidus*, pero que interesantemente los mismos no se agrupan con especies previamente descritas.

En el presente trabajo nos propusimos caracterizar a nivel de especie los rizobios del género *Cupriavidus* aislados a partir de nódulos de leguminosas de distintos puntos del país. Para esto se seleccionaron 10 cepas representativas de la colección y las mismas se compararon con las especies tipo más cercanas empleando abordajes genotípicos y fenotípicos.

En base a análisis filogenéticos basados en los genes *housekeeping recA* y *gyrB* se determinó que estos aislamientos conforman dos grupos monofiléticos distintos, los cuales agrupan con la cepa tipo *C. necator* y con cepas que hasta el momento no han sido reportadas como simbiontes. A su vez las cepas caracterizadas destacaron por su capacidad de crecer en un amplio rango de pHs, producir sideróforos y utilizar numerosas fuentes de carbono incluyendo compuestos aromáticos como el benceno y fenol.

Los resultados obtenidos muestran la existencia de nuevas especies de *Cupriavidus* asociadas a leguminosas nativas. La descripción de estas nuevas especies incrementa el conocimiento sobre la diversidad y riqueza de microorganismos simbióticos en el grupo de los beta-rizobios presentes en los suelos de nuestro país.

# INTRODUCCIÓN

## Fijación biológica de nitrógeno (FBN).

El nitrógeno es uno de los elementos más abundantes en la naturaleza representando aproximadamente el 78% de la atmósfera y encontrándose en la biomasa y el suelo. En las plantas es el cuarto elemento más abundante, lo cual lo hace esencial para el crecimiento y desarrollo de las mismas, formando parte de moléculas vitales como lo son los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hormonas y clorofilas<sup>1</sup>.

Este elemento se encuentra disponible en el suelo en diferentes estados de oxidación producto de la acción de diversos microorganismos, siendo el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) las principales formas en que las plantas pueden absorberlo y asimilarlo por sí mismas<sup>2</sup>.

Sin embargo la principal entrada al pool de nitrógeno en los ecosistemas naturales es a través de la reducción del nitrógeno atmosférico hasta amonio, proceso que se conoce como fijación biológica de nitrógeno<sup>3</sup>.

Todos los organismos capaces de llevar a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno son procariontes, entre los que encontramos bacterias y arqueas<sup>3,4</sup>. Estos microorganismos son denominados diazótrofos y se encuentran ampliamente distribuidos en grupos con distintos estilos de vida y metabolismos que incluyen: anaerobios, aerobios, autótrofos, heterótrofos, metanótrofos, como células individuales o filamentos, en vida libre y en simbiosis<sup>5</sup>.

Dentro de las bacterias diazótropas encontramos 6 phyla: bacterias verdes del azufre (*Chlorobi*), cianobacterias, Gram positivas de bajo (*Firmicutes*) y alto contenido de G+C (*Actinobacteria*), *Spirochaetes* y *Proteobacteria*. siendo esta última la división bacteriana más abundante y en la cual se encuentran los rizobios<sup>5</sup>.

Los rizobios son bacterias del suelo capaces de asociarse simbióticamente con plantas de la familia de las leguminosas y excepcionalmente con una no leguminosa, *Parasponia* sp.,<sup>6,7,1</sup>. Durante esta asociación los mismos se alojan en nódulos en las raíces y tallos de las plantas donde llevan a cabo el proceso de FBN aportándole a la planta el nitrógeno necesario para su desarrollo y recibiendo a cambio compuestos carbonados.

A lo largo del siglo 20 los agricultores de alrededor del mundo han ido incorporando cada vez más la utilización de fertilizantes nitrogenados. En las últimas décadas

dichos fertilizantes han sido asociados a numerosos problemas ambientales incluyendo la eutrofización de ríos y mares, la contaminación de aguas subterráneas y la destrucción de la capa de ozono, contribuyendo al calentamiento global. Es por estas razones que la FBN y la incorporación de leguminosas a sistemas de rotación con otros cultivos ofrecen una práctica de agricultura más sustentable y amigable con el medio ambiente<sup>8</sup>.

Se estima que la cantidad de nitrógeno incorporado al suelo por año es de unas 275 millones de toneladas a nivel mundial. De esta suma, 30 millones son fijadas por causas naturales (tales como la oxidación del  $N^2$  a ácido nítrico provocada por las descargas eléctricas de las tormentas), 70 millones se deben al proceso industrial de Harber-Bosch (el cual consiste en la reducción de  $N^2$  a amonio bajo condiciones de alta temperatura y presión en presencia de un catalizador a base de hierro) y unas 175 millones de toneladas de nitrógeno son incorporadas a los ecosistemas mediante FBN. La utilización de este recurso natural para adquirir nitrógeno, disminuye la pérdida de este elemento en el suelo, así como el uso de fertilizantes químicos y el consecuente gasto de compuestos orgánicos altamente energéticos como el petróleo, necesarios para la producción de los mismos<sup>9,10</sup>.

## **Nitrogenasa.**

Dentro de las células procariotas, la reducción de la molécula de dinitrógeno ( $N_2$ ) es llevada a cabo por el complejo enzimático de la nitrogenasa, que con un gasto de 16 ATPs por molécula de  $N_2$  lleva a cabo uno de los procesos metabólicos con mayor demanda de energía<sup>4</sup>.

La nitrogenasa es un complejo enzimático formado por dos componentes: la MoFe Proteína (también llamada dinitrogenasa o componente I) y la Fe Proteína (también llamada dinitrogenasa reductasa o componente II). La Fe proteína es un  $\gamma_2$  homodímero, codificado por el gen *nifH*, que contiene 4 átomos de Fe organizados en un grupo  $Fe_2S_4$  y la MoFe proteína es un  $\alpha_2\beta_2$  heterotetrámero, codificado por los genes *nifD* (que codifica para la subunidad  $\alpha$ ) y *nifK* (que codifica para la subunidad  $\beta$ ), la cual contiene dos grupos metálicos: el cofactor hierro-molibdeno (FeMo-co) que provee el sitio activo para la unión y reducción del sustrato y un grupo de hierro involucrado en la transferencia de electrones desde la Fe proteína hasta el FeMo-co.<sup>11,12</sup>

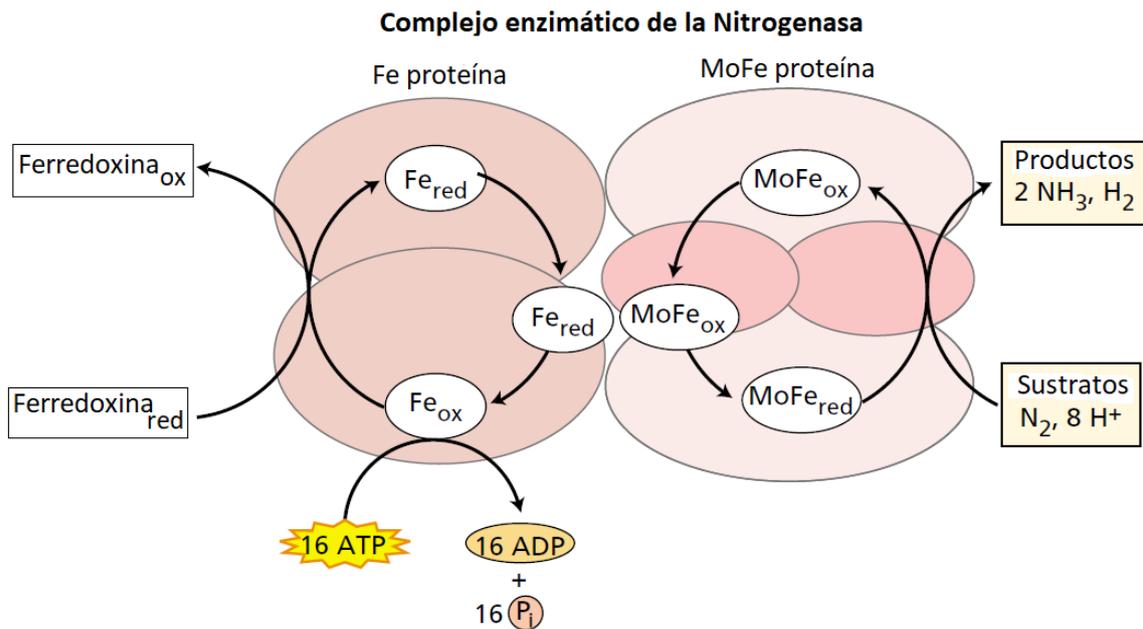
La reducción del N<sub>2</sub> por la nitrogenasa requiere un dador de electrones, magnesio, ATP y una concentración sumamente baja de oxígeno debido a que sus componentes son muy sensibles al mismo, inactivándose irreversiblemente en su presencia.<sup>1</sup>

La MoFe proteína contiene el sitio activo donde se une el nitrógeno, mientras que la Fe proteína cede electrones a esta en una reacción acoplada con la hidrólisis de Mg-ATP (el ATP debe estar unido a Mg porque de lo contrario actúa como inhibidor). Esta reacción también involucra la reducción de dos protones para formar H<sub>2</sub>, por lo cual se necesitan 8 protones, 8 electrones y la hidrólisis de 16 Mg-ATP para llevar a cabo la reducción de una molécula de N<sub>2</sub> como se muestra en la **Ecuación 1**. El hecho por el cual la nitrogenasa genera H<sub>2</sub> durante la reacción aún no es bien entendido<sup>3,11,13</sup>.



**Ecuación 1.** Estequiometría de la reacción catalizada por la nitrogenasa.

La Fe-proteína solo es capaz de transferir un electrón a la MoFe proteína a la vez, hidrolizándose 2 moléculas de MgATP en cada ciclo. Una vez que esto ocurre la Fe-proteína oxidada se disocia y otra Ferroproteína reducida toma su lugar. La Fe-proteína debe asociarse y disociarse de la FeMo proteína por lo menos 8 veces para de esta forma acumular suficientes electrones y lograr la completa reducción del N<sub>2</sub> y de un protón. Luego de que la Fe-proteína cede un electrón (por lo cual se oxida) y se disocia, esta es reactivada siendo reducida por un dador de electrones que puede ser la ferredoxina o la flavodoxina **Figura 1**.



**Figura 1.** Esquema de la reacción de la nitrogenasa. El principal dador de electrones es la ferredoxina, la cual reduce a la Fe-proteína, luego esta es capaz de reducir a la MoFe-proteína y finalmente esta última enlaza y reduce el  $N_2$ . La unión e hidrólisis de ATP a la Fe-proteína causa un cambio conformacional en la misma que facilita las reacciones redox. Tomado de.<sup>14</sup>

A pesar de que la nitrogenasa descrita anteriormente es la más común en la naturaleza y la más eficiente energéticamente, existen también nitrogenasas que emplean otros metales como cofactores. Estas son la V-nitrogenasa (que utiliza vanadio como cofactor) y la Fe-nitrogenasa (que utiliza solamente hierro como cofactor), las cuales son codificadas por los genes *vnf* y *anf* respectivamente y se conocen como nitrogenasa alternativas<sup>15</sup>.

Los tres tipos de nitrogenasa no se encuentran igualmente distribuidas en la naturaleza. Mientras que todos los diazotrofos conocidos presentan por lo menos a la Mo-nitrogenasa, algunos también pueden producir a la Fe-nitrogenasa, la V-nitrogenasa o ambas<sup>16</sup>. Como ejemplo de esto, organismos como *Azotobacter variabilis* contienen los tres tipos de la enzima, otros como *Rhodobacter capsulatus* y *Rhodospirillum rubrum* presentan sólo la forma canónica (Mo-nitrogenasa) y la variable Fe-nitrogenasa, mientras que organismos como *Anabeana variabilis* contienen adicionalmente a la V-nitrogenasa. Finalmente la mayoría de los rizobios y otros organismos como *Klebsiella pneumoniae* poseen solamente a la Mo-nitrogenasa<sup>15</sup>.

Estas enzimas son reactivas frente al mismo rango de sustratos, observándose, sin embargo, algunas diferencias en las actividades catalíticas. Por ejemplo las tres nitrogenasas son capaces de reducir acetileno a etileno, pero la V-nitrogenasa y la Fe-nitrogenasa forman durante esta reducción un pequeño porcentaje (3%) de etano. La formación de etano a partir de acetileno se puede usar, por lo tanto, como un test diagnóstico de la presencia de nitrogenasas alternativas<sup>17</sup>.

Debido a su baja eficiencia comparada con la Mo-nitrogenasa, estas nitrogenasas alternativas son típicamente consideradas como enzimas de respaldo, usadas solamente cuando Mo no se encuentra disponible. Sin embargo las condiciones exactas bajo las cuales estas enzimas son utilizadas en el ambiente no se conocen en la mayoría de los casos<sup>16</sup>.

## Rizobios.

Uno de los grupos de organismos diazotófos mas estudiado es el de los rizobios. Los rizobios son bacterias del suelo, Gram negativas, con morfología normalmente bacilar y no formadores de esporas. Són móviles gracias a la presencia de un flagelo polar o subpolar o por dos a seis flagelos peritricos. En su mayoría presentan un metabolismo aerobio heterótrofo y son capaces de utilizar gran variedad de azúcares como fuente de carbono, sus colonias generalmente tienen un aspecto mucilaginoso<sup>1,18</sup>.

Una de la características que definen a los rizobios, es su capacidad de formar asociaciones simbióticas con leguminosas. Durante esta asociación simbiótica, las bacterias promueven, en la planta hospedera, la formación de órganos especializados llamados nódulos, en donde se alojan y llevan a cabo la FBN. Estas estructuras especializadas se desarrollan principalmente en el cortex radicular, aunque en el caso de algunas plantas como por ejemplo *Sesbania rostrata*<sup>19</sup> y *Aeschynomene spp*<sup>20</sup>., se observan también en el tallo<sup>5</sup>. Dentro del nódulo las bacterias reciben compuestos carbonados y otros nutrientes de la planta generandose un ambiente propicio para la FBN<sup>21</sup>. Los rizobios a cambio le aportan amonio a la planta, el cual es incorporado en distintas rutas metabólicas para la formación de proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas y otras moléculas esenciales para su crecimiento y desarrollo.

Según análisis filogenéticos basados en el gen *rrs*, el cual codifica para el ARN de la subunidad ribosomal menor (ARNr 16S), los rizobios se agrupan dentro de la división Proteobacteria. Su capacidad de establecer simbiosis con las leguminosas ha sido descrita principalmente en las  $\alpha$ -proteobacterias donde se encuentran distribuidos en los géneros: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium* y *Devosia*<sup>5,6</sup>. Sin embargo recientemente se han identificado cepas nodulantes de leguminosas dentro de las  $\beta$ -proteobacterias pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus*<sup>22,21</sup>. Estas cepas fueron descritas por primera vez en 2001 por Chen y colaboradores quienes clasificaron aislamientos obtenidos de nódulos de *Mimosa pudica* y *Mimosa diplotricha* como la especie novedosa *Ralstonia taiwanensis*, describiendo la primer  $\beta$ -proteobacteria capaz de formar nódulos en leguminosa y fijar nitrógeno<sup>23</sup>. Posteriormente el género *Ralstonia* fue renombrado como *Cupriavidus*, por lo que *Ralstonia taiwanensis*, pasó a llamarse *Cupriavidus taiwanensis*<sup>24</sup>. En paralelo, también en 2001, Moulin y colaboradores reportaron dos cepas nodulantes de leguminosas pertenecientes al género *Burkholderia*<sup>22</sup>, las cuales luego fueron denominadas como *Burkholderia tuberum* y *Burkholderia phymatum*<sup>25</sup>.

## Leguminosas.

Las leguminosas son un gran grupo de plantas angiospermas que se encuentran en todos los continentes y son capaces de crecer en ambientes terrestres y acuáticos muy diversos, bajo diferentes condiciones edáficas y climáticas. Desde el punto de vista evolutivo parece que África fue el primer sitio de origen desde donde se dispersaron hacia Sudamérica y Asia<sup>26</sup>.

Las leguminosas se agrupan en la familia *Fabaceae*, una familia de distribución cosmopolita que incluye 727 géneros y 19.325 especies, lo que la convierte en la tercera familia con mayor riqueza de especies con flor luego de *Orchidaceae* y *Asteraceae*<sup>27</sup>. *Fabaceae* contiene 3 subfamilias: *Faboideae* (o *Papilionoideae*), *Mimosoideae* y *Caesalpinoideae* (según la clasificación actual, aunque aplicando técnicas moleculares esta clasificación está siendo revisada por lo que podría cambiar en el futuro cercano).

La subfamilia *Faboideae* (*Papilionoideae*), se destaca debido a que las semillas y legumbres de muchas de sus especies son alimentos esenciales para el hombre y el ganado (poroto, maní, soja, habas, etc). Esta subfamilia con más de 12.000 especies descritas hasta el momento, es la más extensa de las tres y presenta una amplia distribución geográfica, encontrándose mayoritariamente en zonas cálidas<sup>26</sup>. La amplia mayoría de las especies analizadas dentro de esta subfamilia son capaces de formar asociaciones simbióticas con rizobios.

La subfamilia *Mimosoideae* se distribuye principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, aunque también penetran en las templadas y excepcionalmente en las frías. Contiene más de 50 géneros, siendo *Acacia*, *Mimosa* e *Inga* los principales, integrados por aproximadamente 1200, 400 y 350 especies respectivamente. Gran parte de estas especies tienen uso forestal u ornamental y muy pocas uso forrajero o como alimento para el hombre<sup>28</sup>. La presencia de nódulos en esta subfamilia también es muy frecuente.

En cuanto a *Caesalpinoideae*, esta subfamilia abunda en los trópicos y regiones subtropicales, presenta especies en su mayoría leñosas, predominantemente de tipo arbustivo y árboles. Son utilizadas como fuentes de laxantes comerciales, taninos, tinturas y se comercializan por su madera dura<sup>28</sup>. Por su parte en esta subfamilia, es poco común la formación de asociaciones simbióticas con rizobios.

Las leguminosas constituyen el segundo alimento más importante para el hombre, una combinación de leguminosas y cereales contiene todos los aminoácidos esenciales para una nutrición adecuada, siendo la soja, garbanzo, arveja, lenteja, el frijol, haba o maní la principal fuente de proteína junto con los cereales en muchos países en desarrollo. También forman parte de la dieta mediterránea y algunas se consumen luego de la fermentación microbiana como probióticos<sup>29,27</sup>.

Además estas plantas tienen un rol beneficioso en los sistemas de cultivo gracias a su capacidad de asociarse con rizobios y por lo tanto fijar nitrógeno en sus raíces, reduciendo los costos de energía y mejorando las condiciones físicas y la biodiversidad del suelo. Dados los recursos limitados de la energía fósil y la creciente preocupación sobre la salud ambiental, el potencial de las leguminosas en su rol como fuente de nitrógeno en los sistemas de cultivo es cada vez más explotado<sup>30</sup>.

Se ha estudiado la capacidad de nodular de unas 3400 especies aproximadamente representando a un 57% de los géneros de leguminosas. Según estos estudios, el porcentaje de especies susceptibles a ser noduladas varía mucho entre las distintas subfamilias de las *Fabaceae*, siendo aproximadamente de un 25% en *Caesalpinioideae*, 90% en *Mimosoideae* y 97% en *Faboideae*<sup>1,7</sup>. La presencia y ausencia de especies nodulantes en las tres subfamilias indica que la nodulación surgió varias veces en la evolución de las leguminosas y que se ha perdido en algunos linajes<sup>5</sup>.

## **Leguminosas en Uruguay.**

En Uruguay se estima que el total de la flora está compuesta por aproximadamente 2300 especies, de las cuales un 10% corresponden a leguminosas.

El género más abundante dentro de las *Mimosoideae* en Uruguay es *Mimosa* con aproximadamente 48 entidades, las cuales se distribuyen principalmente en el hábitat serrano y ribereño. En el primero, las especies forman matorrales densos en el bosque y sus bordes mientras que en el hábitat ribereño, típico de las costas de ríos y arroyos, se desarrollan en forma de arbustos y árboles pequeños erectos o semierectos, con follaje más delicado y legumbres y/o semillas adaptadas al traslado mediante corrientes de agua<sup>26</sup>.

En cuanto a la subfamilia *Caesalpinioideae*, en nuestro país se han contabilizado 10 géneros con 28 entidades taxonómicas siendo *Senna*, *Caesalpinia* y *Chamaescrista* los géneros con mayor número de especies.

Finalmente 56 géneros pertenecen a la subfamilia *Faboideae* (*Papilionoideae*) con 201 especies (130 nativas y 71 adventicias y cultivadas). Considerando especies y variedades, son 232 el total de entidades taxonómicas encontradas<sup>26</sup>.

## **Mimosas.**

Recientemente la subfamilia *Mimosoideae* ha sido foco de atención debido a que, en muchos casos, las bacterias aisladas de sus nódulos pertenecen a las  $\beta$ -proteobacterias<sup>6</sup>. Se ha reportado que especies pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus* nodulan principalmente leguminosas de esta subfamilia, particularmente se ha descrito la coexistencia de especies de ambos géneros en nódulos de distintas especies de *Mimosas* en diferentes continentes<sup>29</sup>.

En particular el género *Mimosa* es capaz de asociarse simbióticamente tanto con rizobios pertenecientes a las  $\alpha$ -proteobacterias como a las  $\beta$ -proteobacterias. La mayoría de las especies de este género se encuentran distribuidas en América, siendo las regiones centrales de Brasil y México, así como las regiones sub-tropicales de Sudamérica los principales centros de diversificación<sup>31</sup>. Se ha postulado que la preferencia de las *Mimosas* a ser noduladas por rizobios pertenecientes a alfa o beta proteobacterias podría depender de la ubicación geográfica, del ambiente y de su taxonomía<sup>31</sup>. La mayoría de las especies presentes en los biomas de Cerrado y Caatinga en Brasil se encuentran noduladas por rizobios del género *Burkholderia*, mientras que en México predominan las asociaciones simbióticas con  $\alpha$ -proteobacterias, particularmente con los géneros *Rhizobium* y *Ensifer*<sup>32,33</sup>.

En Uruguay estudios recientes han reportado que muchos de los microsimbiontes de las *Mimosas* de nuestro territorio pertenecen al género *Cupriavidus*, aunque también se han reportado especies de *Mimosas* noduladas por *Burkholderia*<sup>31</sup>. Se ha sugerido que la preferencia de las *Mimosas* de nuestro país por el género *Cupriavidus*, así como, la aparente ausencia de estos simbioses dentro de los centros de diversificación de las mismas en Brasil y México, está relacionada con las características del suelo. Algunos estudios han mostrado que en suelos neutro-alcalinos, *Mimosa pudica* es preferentemente nodulada por *C. taiwanensis*, mientras que los simbioses del género *Burkholderia* predominan en suelos ácidos<sup>31</sup>. También se ha reportado que las especies de *Cupriavidus* compiten mejor en suelos muy fértiles (con alto contenido de N)<sup>34</sup>. Sin embargo un estudio realizado en nuestro país, en la Sierra del Abra de Zabaleta, demostró que las mimosas nativas de dicho lugar, donde el pH del suelo es ligeramente ácido (cercano a 6.0), son noduladas

exclusivamente por *Cupriavidus*. Además estudios del contenido de materia orgánica, nitrógeno, fosfato y potasio, indicaron que este suelo tiene un índice de fertilidad media, con concentraciones de nutrientes menores a las que favorecen a *Cupriavidus* en la nodulación de *Mimosa* spp. en ensayos de competencia (según lo reportado<sup>34</sup>)<sup>31</sup>. Todo esto sugiere que el pH y la fertilidad del suelo no son los principales factores involucrados en la preferencia de las *Mimosas* de nuestro país por el género *Cupriavidus*. Un factor que sí puede estar involucrado en esta selección es el contenido de metales pesados en el suelo, en particular, el género *Cupriavidus* es conocido por su tolerancia a los mismos, tales como, Cu, Zn, Pb, Cd y Ni<sup>24</sup>, de hecho el estudio en Sierra del Abra de Zabaleta reportó que el suelo contiene concentraciones considerables de Zn, Cu, Co, Ni y Fe sugiriendo que el contenido de metales es un factor involucrado en la alta incidencia de *Cupriavidus* en esta región del país<sup>31</sup>. Finalmente otro factor que afecta considerablemente la selección de los simbiontes por las *Mimosas* spp. uruguayas, es la taxonomía del hospedero. En estudios de inoculación cruzada se ha evidenciado la preferencia de las *Mimosas* nativas por cepas de *Cupriavidus* sobre *Burkholderia*<sup>31,35</sup>. Esto lleva a la conclusión de que las *Mimosas* nativas de nuestro país han seleccionado como simbiontes especies de *Cupriavidus*, obteniéndose asociaciones altamente específicas, patrón que también se ha observado en *Mimosas* de Brasil y México pero con simbiontes de los géneros *Burkholderia* y *Rhizobium/Ensifer* respectivamente y que esto podría deberse a la historia co-evolutiva de la planta con los simbiontes locales<sup>31,32,33</sup>.

## **Interacción rizobio – leguminosa.**

Los rizobios tienen dos formas de vida que difieren en su morfología y metabolismo. En el suelo y en las etapas iniciales de la colonización e infección de la raíz se los encuentra en vida libre como saprófitos, mientras que en el interior de los nódulos se diferencian a bacteroides. Entre las diferencias más destacadas, en vida libre estas bacterias son bacilos móviles que no pueden fijar N<sub>2</sub> y utilizan gran variedad de fuentes de carbono, en cambio los bacteroides tienen formas irregulares, son inmóviles, capaces de fijar N<sub>2</sub> y sólo pueden utilizar ácidos dicarboxílicos como succinato y malato como fuente de C<sup>36</sup>.

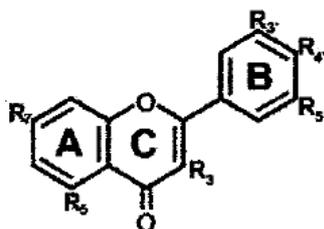
La simbiosis entre leguminosas y rizobios no es obligatoria. Sin embargo bajo condiciones limitantes de nitrógeno, los simbiontes se buscan uno a otro mediante un elaborado intercambio de señales. Esta señalización y el subsecuente proceso de infección involucran la activación de genes específicos tanto en el hospedero como en el microsimbionte<sup>14</sup>.

Los exudados de las raíces de las plantas (aminoácidos, proteínas, azúcares, carbohidratos complejos, flavonoides, alcoholes, vitaminas y ácidos orgánicos) producen cambios en la composición química del suelo, generando un ambiente enriquecido en nutrientes que puede promover el crecimiento de las poblaciones microbianas del suelo y su quimiotaxis positiva hacia la raíz. Para que el proceso de infección pueda dar inicio, los rizobios no sólo deben colonizar la rizósfera, sino también unirse a la raíz. Este proceso de adsorción depende de múltiples factores tanto de la bacteria (polisacáridos y proteínas superficiales, microfibrillas de celulosa, fimbrias), la planta (exudados radiculares, estructura de la superficie radicular) y el ambiente (pH, temperatura, cationes divalentes, humedad, presencia de otros microorganismos competidores)<sup>36</sup>.

## Flavonoides y factores Nod.

Dentro de los compuestos exudados por las raíces de las leguminosas, algunos flavonoides y betaínas son capaces de inducir en el rizobio los genes responsables de la nodulación, llamados genes *nod*.

Se han identificado más de 4000 flavonoides diferentes en plantas vasculares, de los cuales un conjunto particular está involucrado en mediar la especificidad hospedero-microsimbionte. Todos los flavonoides consisten en dos anillos de benceno unidos mediante un anillo heterocíclico de pirano o pirona, **Figura 2**. Sustituciones específicas sobre el anillo producen flavonoles, flavonas, flavononas, así como isoflavonoides. La especificidad en el reconocimiento de cada flavonoide por la bacteria, es lo que le permite distinguir a su hospedero particular. Estos flavonoides específicos no solo inducen la expresión de los genes *nod* sino también la quimiotaxis<sup>37,7</sup>.

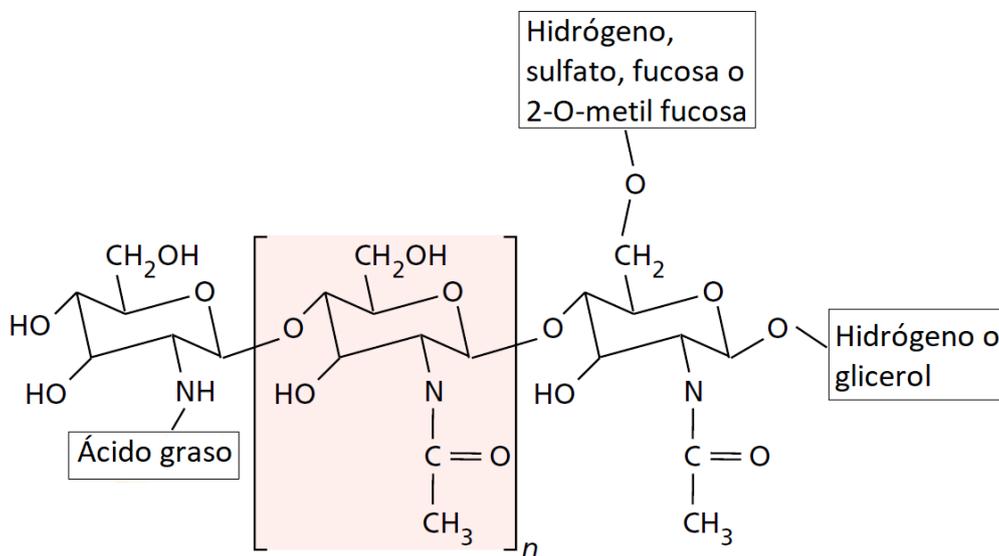


**Figura 2.** Estructura general de un flavonoide. A y B: anillos de benceno; C: anillo heterocíclico de pirano o pirona. Cambios en los grupos R producen flavonoles, flavonas, flavononas o isoflavonoides. Tomado de <sup>7</sup>.

Los flavonoides interactúan con el producto del gen *nodD*, un regulador del tipo LysR. Esta interacción causa un cambio conformacional en la proteína NodD, la cual induce la transcripción de los otros genes *nod*, uniéndose a una secuencia altamente

conservada, llamada *caja nod*, presente de la región promotora de todos los operones *nod* (excepto en el promotor de *nodD*)<sup>14,37</sup>.

Los genes *nod* codifican para aproximadamente 25 proteínas requeridas para la síntesis y exportación de los factores Nod por la bacteria. Los factores Nod son lipi-oligosacáridos, consisten en un tetra o pentasacárido de N-acetil-β-D-glucosamina sustituido en el C2 de su extremo no reductor por una cadena de ácido graso insaturado. Además puede contener otros sustituyentes en diversos carbonos tanto de su extremo reductor como de su extremo no reductor (**Figura 3**). Las distintas especies de rizobios producen diferentes factores Nod, que se distinguen por el grado de saturación de la cadena de ácido graso y los sustituyentes que presentan en sus extremos. Cada factor Nod es activo en el correspondiente tipo de leguminosa<sup>37,36,7</sup>.



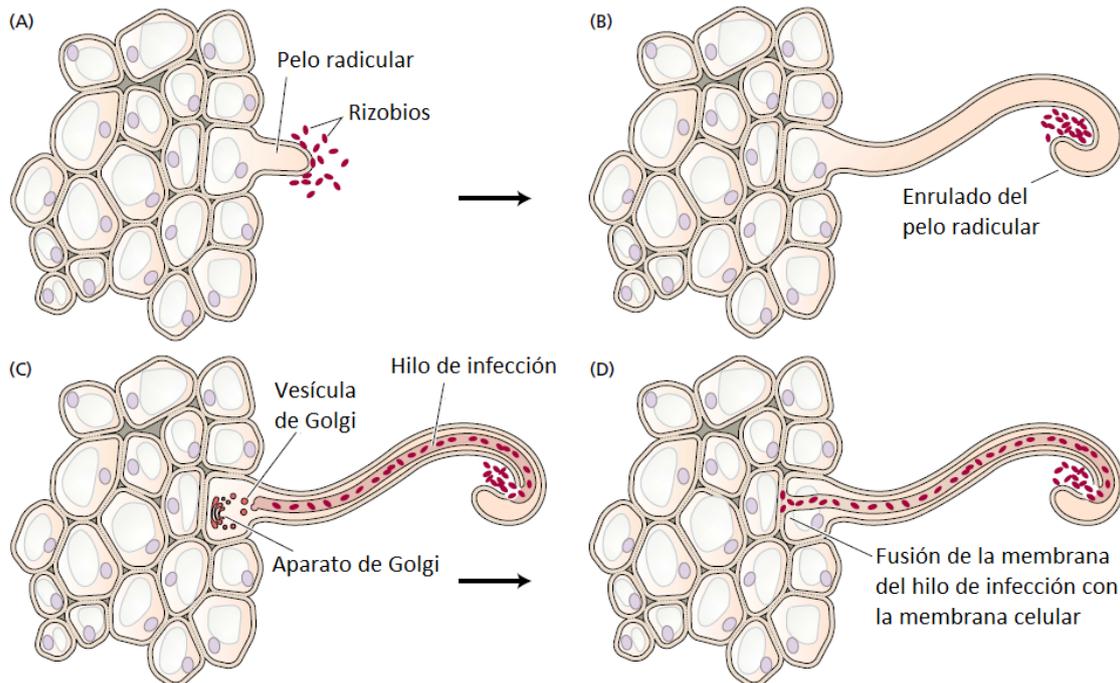
**Figura 3.** Estructura general de los factores Nod (adaptado de <sup>14</sup>). La cadena de ácido graso generalmente tiene 16 a 18 carbonos y el número de repeticiones de la sección central (n) es de 2 o 3 típicamente<sup>38</sup>.

Los genes *nod* son clasificados como comunes y específicos. Los primeros (*nodA*, *nodB* y *nodC*) se encuentran en todos los rizobios y su función es la biosíntesis y el ensamblaje de las unidades de N-acetil-β-D-glucosamina y la unión de la cadena de ácido graso, mientras que los genes *nod* específicos difieren entre las distintas especies de rizobios y codifican para enzimas que catalizan el agregado de los diferentes sustituyentes en los extremos del factor Nod<sup>14,36</sup>.

## Respuesta de la planta y formación del nódulo.

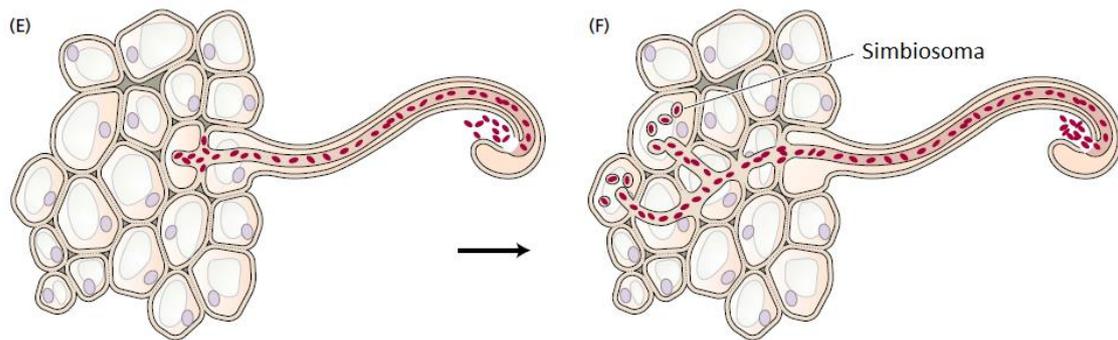
Los factores Nod inician muchos de los cambios en el desarrollo observados en la planta huésped durante el proceso de nodulación. Estos cambios incluyen la deformación de los pelos radiculares, la despolarización de la membrana, oscilaciones del calcio intracelular y la división de las células corticales de la raíz<sup>36</sup>. Se ha identificado una serie de genes que se expresan en la planta solamente en respuesta a los factores Nod, la expresión de los mismos se da preferentemente en los nódulos y las proteínas nódulo-específicas que codifican, reciben el nombre de nodulinas. La función de las nodulinas aún es objeto de investigación, algunas se expresan a las pocas horas luego de la percepción del factor Nod (nodulinas tempranas) mientras que otras lo hacen cuando el proceso de diferenciación del nódulo ya es muy avanzado (nodulinas tardías)<sup>6,39</sup>.

Concomitantemente con la diferenciación y desarrollo del nódulo, los rizobios deben infectar la raíz. Este proceso se inicia con el enrollado del pelo radicular, quedando así, las bacterias (que estaban adheridas en su superficie) atrapadas en la curvatura interior del mismo, por medio del cual penetran formando lo que se denomina como hilo de infección. Este hilo de infección se forma por la degradación de la pared celular del pelo radicular y crece en sentido longitudinal (como una extensión de la membrana plasmática que se produce por la fusión de vesículas membranosas derivadas del aparato de Golgi) hasta alcanzar las células subcorticales de la raíz donde se está formando el nódulo (**Figura 4**). Los rizobios dentro del hilo crecen y se dividen manteniendo este túbulo lleno de bacterias<sup>40,36,14</sup>.



**Figura 4.** Comienzo de la infección de la raíz por los rizobios (adaptado de <sup>14</sup>). A: Rizobios adheridos a la superficie del pelo radicular; B: enrollado del pelo y "captura" de las bacterias en su interior; C: Degradación de la pared celular y formación del hilo de infección; D: fusión de las membranas hilo de infección-membrana celular previo a la entrada de las bacterias a la célula.

La etapa final del proceso de infección es la invasión de las células corticales del nódulo en formación por parte de los rizobios y la diferenciación de los mismos en bacteroides. Los rizobios ingresan al citoplasma de las células infectadas mediante un proceso similar a la endocitosis quedando envueltos por una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidal, una vez que esto ocurre las bacterias pueden dividirse algunas veces antes de diferenciarse. Los grupos de bacteroides envueltos en una membrana peribacteroidal forman cuerpos distinguibles en el citoplasma de las células infectadas, que reciben el nombre de simbiosomas y en ellos es donde ocurre la fijación de  $N_2$  (**Figura 5**) <sup>36,41</sup>.



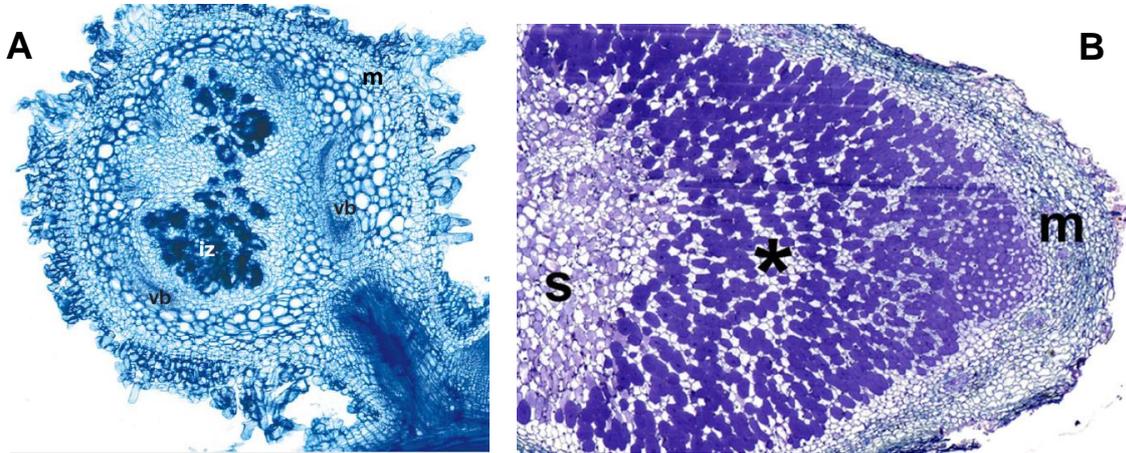
**Figura 5.** Ingreso de los rizobios a las células infectadas (adaptado de <sup>14</sup>). E: endocitosis de las bacterias; F: simbiosomas en células infectadas.

Existen dos tipos generales de nódulos inducidos por rizobios: determinados e indeterminados. Estos presentan diferencias en la vascularización, persistencia del meristema en el nódulo y el desarrollo de los bacteroides. Aun no se conoce por qué se forman dos tipos de nódulos, pero sí se ha demostrado que la formación de uno u otro tipo de nódulo depende de programas de desarrollo de la planta y no de la bacteria, pues se ha visto que una misma especie de rizobio puede dar origen a nódulos determinados o indeterminados en distintas especies de leguminosas<sup>36,37</sup>.

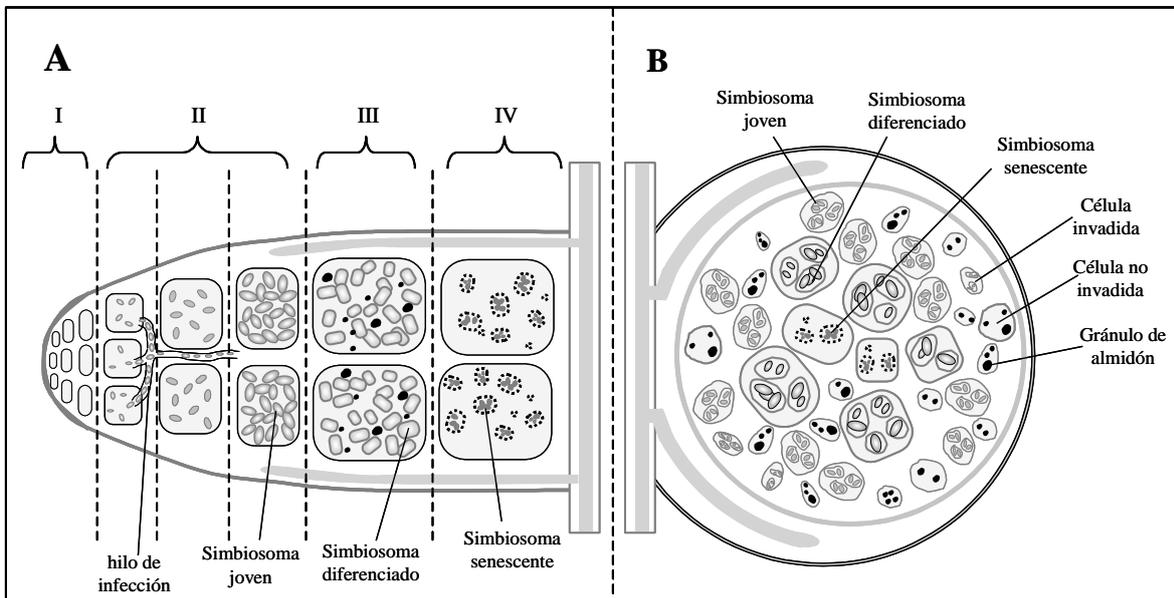
Los nódulos indeterminados, como los de la arveja y trébol, presentan actividad meristemática persistente que continuamente genera nuevas células que son infectadas por los rizobios residentes del nódulo por lo que adquieren una forma alargada cuando están maduros (**Figura 6B** y **Figura 7A**). En este proceso de infección y diferenciación, las bacterias pueden dividirse algunas veces luego de ser rodeadas por la membrana peribacteroidal, por lo cual es común observar la presencia de más de un bacteroide por simbiosoma.

En cambio, los nódulos determinados como los de la soja, poroto y *Lotus* no presentan un meristema persistente y usualmente son redondeados (**Figura 6A** y **Figura 7B**). No parece que haya división de las bacterias una vez envueltas por la membrana peribacteroidal, sin embargo en ocasiones se observan simbiosomas con más de un bacteroide, que pueden provenir de fusiones de simbiosomas.

También se observan diferencias en el metabolismo del carbono por parte de los bacteroides, una de las diferencias más marcadas es la gran acumulación de poli-β-hidroxibutirato (PHB) en los nódulos determinados y su ausencia en los indeterminados <sup>36,37,42</sup>.



**Figura 6.** Corte transversal de nódulo determinado (tomado de <sup>22</sup>) e indeterminado (tomado de <sup>31</sup>) teñidos con azul de toluidina. A: nódulo determinado de *Macropitilium atropurpureum*; vb: región periférica con haces vasculares; iz: células de la región central infectadas con bacteroides; m: meristema. B: nódulo indeterminado de *M. schleidenii*; m: meristema; (\*): células infectadas con bacteroides; s: tejido senescente.



**Figura 7.** Esquemas de cortes longitudinales de un nódulo indeterminado (A) y un nódulo determinado (B). (tomado de <sup>36</sup>). A: en nódulos indeterminados se pueden distinguir 4 zonas, I: región meristemática; II: simbiosomas en diferenciación; III: simbiosomas fijadores de N<sub>2</sub>; IV: zona senescente. B: nódulo determinado con forma redondeada, en el cual se distingue una región periférica y una región central donde se alojan los simbiosomas en los distintos estados de diferenciación.

La planta hospedera ejerce un control sobre la supervivencia de los bacteroides en el simbiosoma y debe proveer soporte nutricional y un ambiente micro-aerobico necesario para la FBN. Mediante mecanismos aún no del todo elucidados, la planta puede regular la cantidad de nódulos que pueden formarse. Las leguminosas pueden obtener el nitrógeno tanto del suelo como de la FBN. Si la disponibilidad de este elemento (principalmente en forma de nitrato) es adecuada, se inhibe la nodulación y la infección rizobiana. Incluso en condiciones donde la fijación simbiótica de  $N_2$  es necesaria, la leguminosa controla el número de nódulos totales que le permita obtener una buena provisión de nitrógeno. Esto se debe a que la FBN es más costosa energéticamente que la asimilación del nitrato del suelo, por lo que tanto los nódulos poco efectivos en la fijación de  $N_2$  como el exceso de nódulos significan un costo energético que podrían debilitarla si se generaran indiscriminadamente<sup>42,36</sup>.

Las leguminosas además son capaces de regular la permeabilidad a gases de sus nódulos, de forma de mantener un nivel de oxígeno suficiente para suplir las necesidades respiratorias de los bacteroides pero que sea lo suficientemente bajo para evitar la inactivación de la nitrogenasa. Para esto, los nódulos contienen una hemoproteína capaz de unir oxígeno, llamada leghemoglobina, la misma está presente en altas concentraciones en el citoplasma de las células infectadas y le otorga un color rosado al interior de los nódulos maduros. La planta hospedera produce la porción globina de la leghemoglobina en respuesta a la infección bacteriana, mientras que los rizobios producen la porción hemo<sup>14</sup>. Esta proteína tiene una gran afinidad por el oxígeno y su función es transportarlo hasta los bacteroides. Al estar el oxígeno unido a la leghemoglobina se evita que el mismo interfiera con la actividad de la nitrogenasa<sup>43</sup>.

## ANTECEDENTES.

El Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), centra sus líneas de investigación en el estudio de bacterias del suelo, especialmente en aquellas con potencial para el mejoramiento del crecimiento de las plantas.

Desde un comienzo, dada la escasa información existente sobre rizobacterias nativas, los estudios se focalizaron en profundizar el conocimiento sobre las mismas. Así surgieron trabajos como la caracterización de aislamientos nativos de rizobios nodulantes de trébol y lotus<sup>44,45</sup> (estudio que se llevó a cabo conjuntamente con el Laboratorio de Ecología Microbiana (LEM) del IIBCE y la cátedra de Bioquímica de la Facultad de Agronomía, UDELAR) y el estudio de las bacterias simbióticas de plantas, *Sinorhizobium meliloti* y *Herbaspirillum seropedicae* y sus estrategias empleadas para mantener la homeostasis de hierro y otros metales<sup>46,47,48</sup>. También se realizó el aislamiento y caracterización de bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal asociadas a cultivos comerciales tales como arroz, caña de azúcar, sorgo, canola y festuca<sup>49,50,51</sup>.

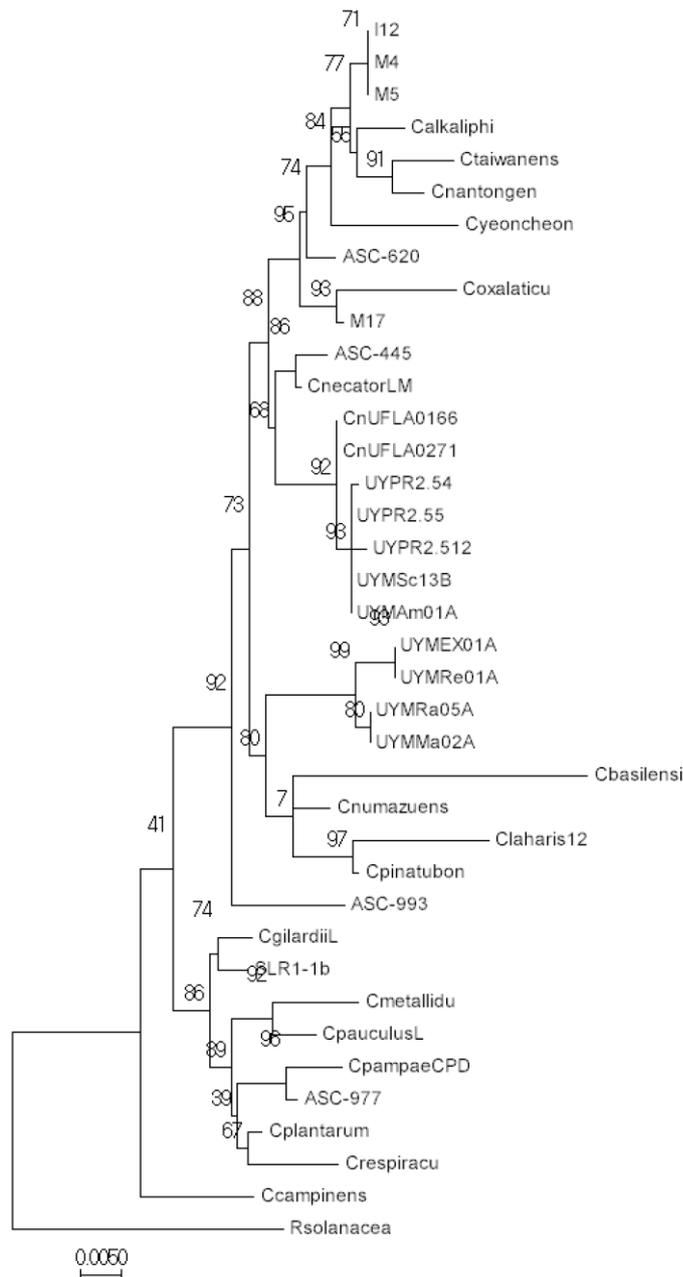
Más recientemente se ha comenzado un relevamiento de los rizobios asociados a diversas leguminosas nativas, buscando en particular rizobios pertenecientes a las beta-proteobacterias. Este relevamiento se centró en especies pertenecientes a la subfamilia *Mimosoideae*, en su mayoría dentro del género *Mimosa* pero también en otras especies nativas como la leguminosa arbórea *Parapiptadenia rigida*. Actualmente se cuenta con una colección compuesta por más de 50 aislamientos obtenidos a partir de nódulos de 10 especies de *Mimosas* nativas<sup>18,52,53,54,31</sup>.

En el presente trabajo se seleccionaron diversos aislamientos obtenidos a partir de nódulos colectados de raíces de leguminosas nativas creciendo en forma natural en distintos puntos del país (**Tabla 1**). En base al gen que codifica para la subunidad 16S del ribosoma bacteriano se determinó que estos rizobios pertenecen al género *Cupriavidus* dentro de la subclase de las beta-proteobacterias. Los análisis filogenéticos mostraron que los mismos no se agrupan con la especie de rizobio *Cupriavidus taiwanensis*, sino que forman dos grupos filogenéticamente separados relacionados con especies de *Cupriavidus* definidas por cepas tipo que no tienen un estilo de vida simbiótico (**Figura 8**). Este resultado se sustenta además en un análisis basado en genes ortólogos utilizando la información de secuencia de todo el genoma de las cepas UYPR2.512 y UYMMa02A cuyos genomas han sido secuenciados (De

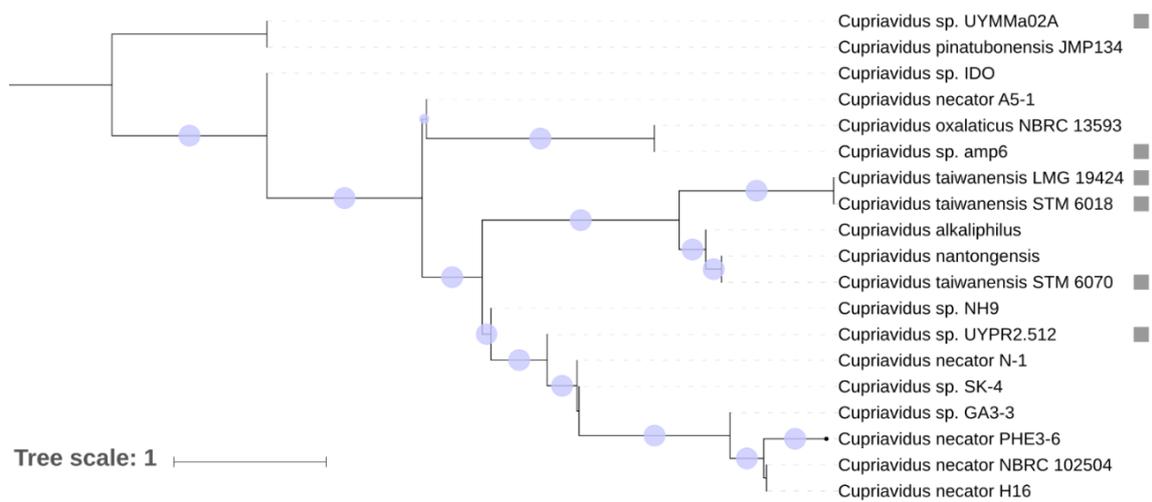
Meyer et al., 2015 y Iriarte et al., 2016)<sup>55,56</sup> corroborándose la separación entre ambas (Figura 9).

**Tabla 1.** Hospedero y lugar de colecta de las cepas a caracterizar. Los aislamientos se nombraron con las letras en mayúscula “UY”, en referencia al país, seguido de la primera letra del género y la primera letra del epíteto de la especie vegetal de la cual fueron obtenidos (también en mayúscula); y el número de referencia de la colecta. (\*)Cepas con genoma secuenciado. Adaptado de <sup>18</sup>.

Cepa	Hospedero	Lugar de colecta	Coordenadas geográficas	Primera publicación
UYPR2.512 *	<i>Parapitadenia rigida</i>	Artigas, Bosque nativo cerca de Arroyo Mandiyú	S 30° 31' 13.4" W 57° 41' 53.8"	Taulé et al (2012) <sup>57</sup>
UYPR2.54 *	<i>Parapitadenia rigida</i>	Artigas, Bosque nativo cerca de Arroyo Mandiyú	S 30° 31' 13.4" W 57° 41' 53.8"	Taulé et al (2012)
UYPR2.55	<i>Parapitadenia rigida</i>	Artigas, Bosque nativo cerca de Arroyo Mandiyú	S 30° 31' 13.4" W 57° 41' 53.8"	Taulé et al (2012)
UYMU48A *	<i>Mimosa uragüensis</i>	Río Negro, pto. Viejo	S 32° 38' 18.52" W 58° 8' 53.51"	Sandes, L. (2015) <sup>18</sup>
UYMRa05A	<i>Mimosa ramulosa</i>	Lavalleja, Minas, Aguas blancas	S 34° 31' 34.3" W 55° 19' 0.6"	Platero et al (2016)
UYMSc13B *	<i>Mimosa schleidenii</i>	Lavalleja, Minas, Aguas blancas	S 34° 30' 47.2" W 55° 21' 16.5"	Platero et al (2016)
UYMMa02A *	<i>Mimosa magentea</i>	Lavalleja, Minas, Aguas blancas	S 34° 30' 47.2" W 55° 21' 16.5"	Platero et al (2016)
UYMRe01A	<i>Mimosa reptans</i>	Lavalleja, Minas, Aguas blancas	S 34° 30' 47.2" W 55° 21' 16.5"	Platero et al (2016)
UYMAm01A	<i>Mimosa amphigena</i>	Lavalleja, Minas, Aguas blancas	S 34° 31' 33.1" W 55° 19' 11.7"	Platero et al (2016)
UYMEx01A	<i>Mimosa excedentis</i>	Rocha, Parque San Miguel	S 33° 41' 29.29" W 53° 32' 49.06"	Sandes, L. (2015)



**Figura 8.** Relación filogenética 16S entre los distintos aislamientos de *Mimosas* nativas y cepas de referencia del género *Cupriavidus*. Las secuencias fueron alineadas con la herramienta Muscle del sitio web [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk), la filogenia obtenida con el programa PhyML y finalmente el árbol se visualizó con el programa Mega 7.0.



**Figura 9.** Relación filogenética basada en el análisis de 1155 genes ortólogos de especies de *Cupriavidus* simbióticos y especies secuenciadas más cercanas. Las especies de *Cupriavidus* simbióticas se encuentran marcadas con un cuadrado y con círculos se indican las ramas del árbol con un bootstrap superior a 0.75 (Iriarte y Platero, comunicación personal).

La observación de que los nódulos de *Mimosas* en Uruguay están ocupados frecuentemente por *Cupriavidus* y la existencia de al menos dos grupos filogenéticamente diversos nos llevó a hipotetizar que nuestro país puede ser un centro de diversificación para rizobios pertenecientes al género *Cupriavidus*. La descripción de estas posibles nuevas especies contribuirá a incrementar el conocimiento sobre la diversidad y riqueza de microorganismos presentes en los suelos de nuestro país, lo cual es fundamental para el manejo exitoso de las leguminosas con las que se asocian.

## **OBJETIVOS.**

El objetivo general del presente trabajo es caracterizar la diversidad de rizobios pertenecientes al género *Cupriavidus* obtenidos a partir de nódulos de leguminosas nativas.

### **Los objetivos específicos son:**

- 1) Caracterizar fenotípicamente 10 cepas de *Cupriavidus* representantes de la colección comparándolas con cepas tipo.
- 2) Caracterizar genéticamente estas 10 cepas y determinar su relación filogenética con las cepas tipo más cercanas.
- 3) Definir si existen, dentro de las cepas seleccionadas, nuevas especies de rizobios pertenecientes al género *Cupriavidus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### Selección de cepas.

Se seleccionaron 10 cepas representantes de la colección, teniendo en cuenta el origen de donde fueron aisladas y su posición filogenética dentro del árbol construido a partir del gen *rrs*. Se comparó, tanto fenotípica como genotípicamente, el comportamiento de estos aislamientos con el de especies tipo más cercanas. Para la determinación de las especies tipo más cercanas se utilizó la plataforma EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/identify>) comparando las secuencias del gen *rrs* de las cepas a caracterizar contra esta base de datos<sup>58</sup>.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 2), se incluyeron, para nuestros análisis comparativos, las cepas tipo correspondientes a las especies de *Cupriavidus*; *C. basilensis* 4G11, *C. numazuensis* TE26, *C. oxalaticus* DSM1105, *C. necator* N-1, *C. taiwanensis* LMG19424 y *C. alkaliphilus* ASC732. Además para los ensayos de degradación de compuesto aromáticos se utilizó la cepa JMP134, perteneciente a la especie *C. pinatubonensis*<sup>59</sup>.

**Tabla 2.** Se presentan las cepas a caracterizar en este trabajo, el hospedero del cual fueron aisladas, su origen geográfico (Uruguay) y cuáles son las especies tipo más cercanas.

CEPA	Hospedero	Origen geográfico	Especie más cercana según EzBioCloud	Porcentaje de similitud (%)
UYPR2.512	<i>Parapiptadenia rigida</i>	S 30° 31' 13.4" W 57° 41' 53.8"	<i>C. necator</i>	99,32
			<i>C. alkaliphilus</i>	98,65
			<i>C. oxalaticus</i>	98,49
UYPR2.54	<i>Parapiptadenia rigida</i>	S 30° 31' 13.4" W 57° 41' 53.8"	<i>C. necator</i>	99,39
			<i>C. alkaliphilus</i>	98,79
			<i>C. taiwanensis</i>	98,56
UYPR2.55	<i>Parapiptadenia rigida</i>	S 30° 31' 13.4" W 57° 41' 53.8"	<i>C. necator</i>	99,48
			<i>C. alkaliphilus</i>	98,88
			<i>C. taiwanensis</i>	98,66
UYMU48A	<i>Mimosa uragüensis</i>	S 32° 38' 18.52" W 58° 8' 53.51"	<i>C. basilensis</i>	93,88
			<i>C. numazuensis</i>	93,65
			<i>C. necator</i>	93,48
UYMRa05A	<i>Mimosa ramulosa</i>	S 34° 31' 34.3" W 55° 19' 0.6"	<i>C. basilensis</i>	98,97
			<i>C. numazuensis</i>	98,82
			<i>C. pinatubonensis</i>	98,82
UYMSc13B	<i>Mimosa schleidenii</i>	S 34° 30' 47.2" W 55° 21' 16.5"	<i>C. necator</i>	99,1
			<i>C. basilensis</i>	98,55
			<i>C. alkaliphilus</i>	98,41
UYMM02A	<i>Mimosa magentea</i>	S 34° 30' 47.2" W 55° 21' 16.5"	<i>C. necator</i>	99,58
			<i>C. numazuensis</i>	99,58
			<i>C. basilensis</i>	99,37
UYMRe01A	<i>Mimosa reptans</i>	S 34° 30' 47.2" W 55° 21' 16.5"	<i>C. basilensis</i>	98,92
			<i>C. numazuensis</i>	98,71
			<i>C. pinatubonensis</i>	98,57
UYMAm01A	<i>Mimosa</i>	S 34° 31' 33.1"	<i>C. necator</i>	99,06

	<i>amphigena</i>	W 55° 19' 11.7"	<i>C. basilensis</i>	98,47
			<i>C. alkaliphilus</i>	98,33
UYMEx01A	<i>Mimosa excedentis</i>	S 33° 41'	<i>C. basilensis</i>	98,92
		29.29" W 53°	<i>C. numazuensis</i>	98,71
		32' 49.06"	<i>C. pinatubonensis</i>	98,57

## Caracterización genotípica.

Para la caracterización genotípica de las cepas estudiadas se realizaron análisis filogenéticos utilizando las secuencias de los genes *housekeeping gyrB*<sup>60</sup> y *recA*<sup>61</sup>, para lo cual se amplificaron y secuenciaron estos genes. Además las cepas se compararon mediante el análisis de los perfiles de bandas obtenidos empleando la técnica de rep-PCR<sup>62</sup>.

## Obtención de lisados bacterianos.

Para las reacciones de PCR, se empleó ADN molde obtenido a partir de lisados bacterianos. Para la obtención de los lisados se tomó, con ayuda de un tip estéril, una colonia fresca de la cepa de interés a partir de un cultivo fresco en medio sólido TY, se resuspendió en 100 µl de H<sub>2</sub>O extra pura y se centrifugó a 15600 g durante 2 minutos. El *pellet* bacteriano se resuspendió en 100 µl de NaOH 0,05 M y se incubó el tubo a 100°C durante 4 minutos seguido de 2 minutos en hielo. A continuación se le agregaron 900 µl de H<sub>2</sub>O extra pura a cada tubo, se mezcló el contenido y se centrifugó a 15600 g durante 2 minutos. Finalmente se pasaron 700 µl del sobrenadante a un tubo limpio, el cual se conservó a -20°C hasta su uso como molde en las reacciones de PCR.

## Amplificación por PCR de los genes *recA* y *gyrB*.

Se seleccionaron los genes conservados *recA* y *gyrB*, los cuales codifican para la proteína recombinasa A y para la subunidad B de la ADN girasa respectivamente, para complementar los análisis filogenéticos realizados anteriormente en base al análisis de la secuencia del gen *rrs*.

La amplificación se llevó a cabo empleando los cebadores que se muestran en la **Tabla 3** esperándose fragmentos de 800 pb para *recA* y de 1300 pb para *gyrB*.

Ambas reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50 µl conteniendo: 5 µl de *Dream Taq Buffer* 10X (Thermo Scientific #B65) el cual contiene MgCl<sub>2</sub> 20 mM; 2 µl de una mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 5 mM; 2 µl de cada cebador

correspondiente a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y 1U de ADN-polimerasa recombinante (*Dream Taq Polymerase*, Thermo Scientific 5 U/ $\mu\text{l}$ ) y 4  $\mu\text{l}$  de lisado celular como molde.

Para ambas amplificaciones se utilizó el mismo programa, el cual consiste en: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 61°C y 1 minuto, 30 segundos 72°C. Por último se realizó un ciclo de extensión final de 7 minutos a 72°C.

Los productos de amplificación se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa 0,8% (p/v) en buffer Tris-Acético-EDTA (TAE 1X, Anexo1) sometido a 90 V. Para evidenciar las bandas de ADN se incorporó el intercalante Good View sbs Genetech Co., Ltd. (China) (2  $\mu\text{l}$  / 50 ml de gel) y los geles fueron fotografiados bajo iluminación de luz azul o luz UV.

### **Análisis filogenéticos.**

Los productos de PCR de los genes *recA* y *gyrB* fueron secuenciados en ambas direcciones en MACROGEN Inc. (Corea del Sur), empleando los mismos cebadores usados para su amplificación y las secuencias obtenidas se empalmaron mediante el programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x (2010). Luego con el programa BLASTX<sup>63</sup> (el cual partiendo de una secuencia nucleotídica, la traduce en sus seis posibles marcos de lectura y luego la compara contra una base de datos de proteínas) se indago si las secuencias presentaban posibles corrimientos artefactuales en el marco de lectura (por ejemplo debido al ensamblado y/o a la secuenciación) y en los casos afirmativos se procedió a corregir los mismos manualmente. Una vez efectuadas las correcciones se verificó, nuevamente utilizando BLASTX, que la proteína codificada por dichas secuencias estuviera ahora en un único marco de lectura. Estas secuencias fueron alineadas en base a codones con el programa MEGA5<sup>64</sup> y el alineamiento resultante fue depurado manualmente, descartando las regiones flanqueantes (regiones por izquierda y derecha donde no se poseen caracteres en todas las secuencias utilizadas) y en las regiones internas, conservando los gaps que tuvieran un soporte razonable (conservando aquellas columnas donde menos del 50% de las secuencias presentaran un gap).

Finalmente se procedió a la inferencia de los árboles filogenéticos, tanto para *recA* y *gyrB*, como para el concatenado de ambas secuencias. Para esto se utilizó el método de máxima verosimilitud (*Maximum likelihood* en inglés) realizando 500 réplicas de *bootstrap* para estimar el soporte estadístico de los nodos. En cada caso se eligió el modelo evolutivo con mejor ajuste: *General Time Reversible* + distribución gamma

(GTR+G) para *gyrB*; *Tamura 3 parámetros* + distribución gamma (T92+G) para *recA* y *General Time Reversible* + distribución gamma + sitios invariantes (GTR+G+I) para el árbol concatenado.

Para estos análisis además, de las secuencias de las cepas a caracterizar, se incluyeron las secuencias de las cepas tipo utilizadas y otras cepas del género *Cupriavidus* que fueron obtenidas de la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Debido a que en las bases de datos no se contaba con secuencias de algunas cepas tipo decidimos amplificar y secuenciar los productos de PCR para *gyrB* y *recA* de las cepas *C. numazuensis* TE26, *C. basilensis* 4G11 y *C. oxalaticus* DSM1105. Las secuencias de las siguientes cepas fueron obtenidas del NCBI: *C. necator* N-1, *C. taiwanensis* LMG19424, *C. alkaliphilus* ASC732, *C. pinatubonensis* JMP134, *C. metallidurans* CH34, *C. pauculus* KF709 y *C. nantogensis* X-1.

### **Técnica de rep-PCR.**

Esta técnica se basa en la utilización de cebadores que se hibridan en regiones repetitivas del genoma bacteriano, obteniéndose así la amplificación de un perfil de bandas que es característico para cada cepa<sup>65</sup>. En este caso se utilizó el cebador BoxA1R<sup>62</sup> cuya secuencia se describe en la **Tabla 3**.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl conteniendo: 25 µl de Taq 2X Master Mix (BioLabs #M0270L); 2 µl de cebador BoxA1R y 4 µl de lisado de colonia como molde. El Master Mix incluye (para una concentración 1X): 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 5% Glycerol, 0,08% IGEPAL, 0,05% Tween y 25 U/ml de Taq polimerasa.

El programa de amplificación utilizado fue: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 7 minutos, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 90°C, 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 52°C y 8 minutos a 65°C. Para finalizar se realiza un ciclo de extensión final de 16 minutos a 65°C<sup>62</sup>.

Los perfiles de amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) en buffer Tris-Borato-EDTA 0,5X (TBE). El gel se sometió a 90 V y fue teñido con el intercalante Good View (Beijing SBS. Genetech Co. Ltd.), 2 µl / 50 ml de gel, para su visualización a la luz azul o luz U.V

Finalmente los perfiles de bandas obtenidos se analizaron con el software Gel Compare 4.2 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium, <http://www.appliedmaths.com>). La similitud entre aislamientos se expresó a través del coeficiente de Dice y el análisis de agrupamiento se realizó mediante el método de UPGMA (Unweighed Pair Group Matching Analysis)<sup>66</sup>.

**Tabla 3.** Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para amplificar los genes *recA* y *gyrB* y para la técnica de rep-PCR.

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia nucleotídica</b>
recA-F1	5'-GAGCGCCGAGAAGCAGAAGG-3'
recA-R1	5'-CCGATCTTGTCGCCGTTGTAGC-3'
gyrB-F1	5'-AGGTGCTGGACAACCTCCATCGAC-3'
gyrB-R1	5'-GGCAGGATGGCCTGGAACCTTAC-3'
BOXA1R	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'

## Caracterización fenotípica.

### Crecimiento de las cepas a distintos pH.

Se estudió el crecimiento de las cepas en el rango de pHs de 4 a 9. Este ensayo se realizó en medio líquido YMAG (Anexo 1.) al cual se le adicionaron soluciones tampón adecuadas para lograr el pH deseado. Para obtener los pH 4 y 5 se adicionó el tampón acetato de sodio - ácido acético 2 mM y 7 mM respectivamente, para los pH 6 y 7 un tampón ácido cítrico - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 mM y 2 Mm y para los valores de pH 8 y 9 se utilizó el tampón Tris - HCl 5mM).

Se inició un cultivo primario de cada cepa inoculando una ansada de las mismas (a partir de un cultivo fresco en medio sólido TY) en 5ml de medio líquido YMAG e incubándolo a 30°C con agitación a 100 rpm. Pasadas las 24 horas se midió la densidad óptica a 600 nm (que al cabo de este tiempo es de aproximadamente 1) y se la ajustó a 0,5 en medio YMAG. Luego se tomó una alícuota de 200 µl para inocular 2 ml de YMAG con el pH ya ajustado. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos de 2 ml DELTALAB #900195 (una placa por cada pH ensayado) sembrando cada cepa por triplicado. Las mismas se mantuvieron a 30°C con agitación y se tomaron alícuotas de los cultivos a las 24, 48 y 72 horas para reportar su crecimiento por medio de la densidad óptica de los cultivos a 600nm (DO<sub>600nm</sub>).

### **Solubilización de fosfato inorgánico.**

Para evaluar la capacidad de los distintos aislamientos de solubilizar fosfato inorgánico, se utilizó el medio sólido NBRIP<sup>67</sup> (cuya composición se detalla en el Anexo 1), el cual contiene fosfato tricálcico que es insoluble en las condiciones del medio. Se partió de un cultivo primario de cada cepa inoculando una ansada de las mismas en 5ml de medio mínimo M9 citrato e incubándolo a 30°C con agitación a 100 rpm. Pasadas las 24 horas se lavaron las células con una solución de cloruro de sodio al 0,9% (estéril) y se ajustó la DO<sub>600nm</sub> a 0,5 en medio M9 sin fuente de carbono. Finalmente se sembraron 10 µl de cada cepa, colocando esta cantidad en forma de gota en la superficie del NBRIP agar y se incubaron las placas a 30°C durante 10 días. Se consideraron solubilizadores aquellos aislamientos que al cabo de este tiempo presentaban un halo transparente alrededor de la colonia, utilizando como controles positivos las cepas *Achromobacter* sp. UYSO02 y *Acinetobacter* sp. UYSO03<sup>49</sup>. La solubilización de fosfato generalmente ocurre por la producción y liberación de ácidos orgánicos los cuales actúan como agentes quelantes y a su vez disminuyen el pH del medio<sup>68</sup>. Cada cepa se ensayó por duplicado.

### **Solubilización de potasio.**

Para evaluar la capacidad de solubilizar potasio se utilizó el medio sólido Aleksandrov<sup>69</sup>, el cual fue modificado mediante el agregado de citrato de sodio 12mM como fuente de carbono, además de la sacarosa que ya contiene el medio.

También en este caso se partió de un inóculo primario en M9 citrato, se lavaron las células con NaCl 0,9% y se ajustó la DO<sub>600nm</sub> a 0,5 en M9 sin fuente de carbono, luego se colocó una gota de 10 µl de cada cepa en la superficie del medio. El ensayo se realizó por duplicado y las placas se incubaron a 30°C durante 7 días, considerándose solubilizadoras aquellas que presentaron un halo transparente alrededor de la colonia. Dicha solubilización se produce por la liberación al medio de ácidos orgánicos producidos por las bacterias. Como control se utilizó la cepa *Enterobacter* sp. UYSO10<sup>49</sup>.

### **Producción de sideróforos.**

Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro producidos por las bacterias. Para detectar la presencia de los mismos se utilizó el ensayo de cromo azurol-S<sup>70</sup> (CAS). El ensayo se basa en que el CAS forma un complejo con el hierro que le otorga una coloración azul al medio (composición detallada en Anexo 1). Si las bacterias son

capaces de secuestrar el hierro de dicho complejo mediante la producción de sideróforos, se produce un viraje de color en el medio, observándose un halo color naranja alrededor de la colonia. En este caso el control positivo utilizado fue la cepa de *Pseudomonas fluorescens* CFBP 2392 del cepario de BIOGEM.

Se partió de un cultivo primario en M9 citrato, se lavaron las células con NaCl 0,9% y se ajustó la  $DO_{600nm}$  a 0,5 en M9 sin fuente de carbono. Luego se sembraron 10  $\mu$ l de cada cultivo en el medio CAS y se incubó durante 7 días a 30°C. El ensayo se realizó por duplicado.

### **Uso de fuentes de carbono.**

Para evaluar el uso de distintas fuentes de carbono se utilizó el medio mínimo M9 suplementado con la fuente de carbono que se deseara estudiar. Se evaluó la capacidad de las cepas de utilizar glutamato, manitol, glucosa, citrato, fructosa, malato, sacarosa, arabinosa, xilosa, succinato y oxalato de sodio como única fuente de carbono. A su vez se estudió si eran capaces de crecer utilizando compuestos aromáticos tales como fenol, benzoato, 3-metilbenzoato y 4-hidroxibenzoato como fuente de carbono<sup>71</sup>.

Para estos ensayos se emplearon distintas metodologías.

Por un lado se hicieron curvas de crecimiento en medio líquido probando las fuentes de carbono succinato, citrato y manitol. Para esto se partió de un cultivo primario de cada cepa en M9 citrato incubado durante toda la noche con agitación a 30°C. Este cultivo se utilizó para inocular, con una  $DO_{600nm}$  final de 0,01, 5mL de medio líquido M9 conteniendo 14mM de la correspondiente fuente de carbono. De este medio inoculado se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ l y se sembró cada cepa por triplicado en placas estériles de 96 pocillos con formato de ELISA (DELTALAB # 900010). El crecimiento bacteriano se siguió midiendo la  $DO_{600nm}$  cada 2 horas durante 62 horas en total empleando un lector de placas, Varioskan Flash (Thermo Scientific). Las placas se mantuvieron a 30°C y se agitaron durante 30 segundos cada 2hs, previo a cada medida de  $DO_{600nm}$ . Los datos obtenidos mediante el Software Skanit 2.4.3 fueron exportados al programa Excel para su análisis.

Por otro lado se evaluó la capacidad de las cepas de crecer en medio M9 sólido suplementado con las siguientes fuentes de carbono: glutamato, manitol, glucosa, citrato, fructosa, malato, sacarosa, arabinosa, xilosa, succinato y oxalato de sodio. Cada fuente fue adicionada al medio de cultivo antes de que solidifique, a una

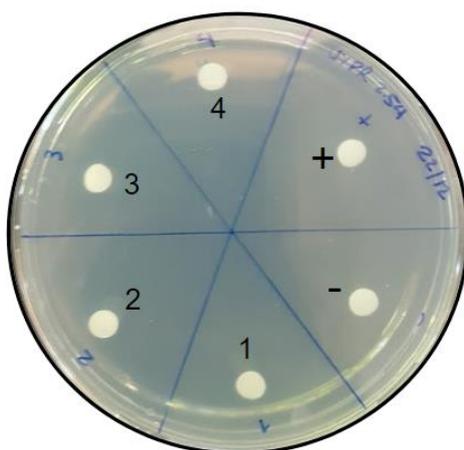
concentración final de 14mM, a partir de una solución en agua previamente esterilizada. Las sales utilizadas para las soluciones se detallan en el Anexo 1.

En este caso se partió de una colonia aislada proveniente de un cultivo fresco en medio sólido TY, la cual se estirió en el medio M9 sólido con la fuente de carbono correspondiente. Cada ensayo se realizó por duplicado y las placas se crecieron a 30°C durante 72 horas.

Debido al potencial inhibitorio del crecimiento bacteriano y a la baja solubilidad de los compuestos aromáticos benzoato, 3-metilbenzoato y 4-hidroxibenzoato se procedió de manera distinta para evaluar el crecimiento. En este caso se realizó siembra incorporada de cada cepa en agar, inoculando 500 µl de cultivo primario (con la  $DO_{600nm}$  ajustada a 0,5 en M9 sin fuente de carbono) en 25 ml de medio M9-Agar (16g/L), sin fuente de carbono, fundido y termostatzado a 50°C.

Luego se procedió a colocar papeles de filtro estériles como se muestra en la (**Figura 10**) en los cuales se incorporaron 20 µl de cada compuesto aromático a una concentración de 150 mM en agua (excepto para el 4-hidroxibenzoato que debido a su baja solubilidad en agua, la máxima concentración que se logró fue de 35 mM). Como control positivo se utilizó Citrato 150 mM y como control negativo  $H_2O$ .

Las placas se realizaron por duplicado para cada cepa a estudiar y se incubaron a 30°C durante 7 días. Pasado este tiempo se observó la presencia de halos de crecimiento alrededor de los papeles de filtro con cada fuente de carbono.



**Figura 10.** Ejemplo de placa para ensayo de crecimiento con compuestos aromáticos. 1. Benzoato 150 mM; 2. 3-metilbenzoato 150 mM; 3. 4-hidroxibenzoato 35 mM; (+). Citrato 150 mM; (-).  $H_2O$  esterilizada.

Finalmente en el caso del fenol, se utilizó también M9 sólido, con la técnica de siembra en superficie. Para esto se realizó un cultivo primario para cada cepa en M9 citrato crecido durante toda la noche y con agitación a 30 °C. Se midió la  $DO_{600nm}$  de los cultivos y se ajustó la misma a 0,5, resuspendiendo las células en una solución estéril de NaCl 0.9%. Luego se inoculó en la superficie de una placa con M9 sólido sin fuente de carbono, 100  $\mu$ l de la suspensión de células con ayuda de un rastrillo estéril. En este caso ya que el fenol es volátil, en vez de incluirlo en el medio, lo cual podría resultar tóxico para las células, se procedió a colocar una gota de 30,5  $\mu$ l en la tapa de la placa de Petri, permitiendo que el contacto con las células ocurra por evaporación. Para el cálculo de la concentración a utilizar se tuvo en cuenta cual fue la concentración utilizada para las demás fuentes de carbono que se probaron (14 mM). Debido a que este compuesto puede reaccionar con el material de las placas de Petri descartables, se utilizaron placas de Petri de vidrio, las cuales fueron cerradas herméticamente utilizando una cinta de teflón y parafilm para prevenir el escape de los vapores. Como control negativo se utilizaron placas inoculadas con las cepas pero sin fuente de carbono y como control positivo se utilizó la cepa *C. pinatubonensis* JMP134<sup>71</sup>. Cada cepa se probó por duplicado y las placas se incubaron durante 7 días a 30°C.

## RESULTADOS.

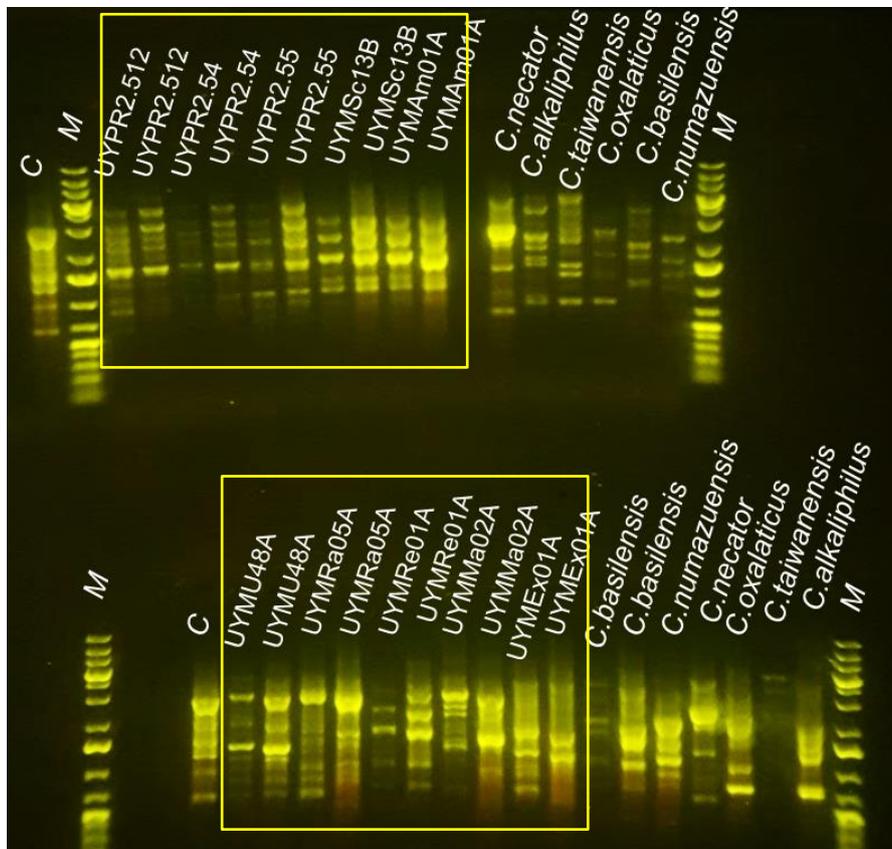
### Caracterización genotípica.

#### Técnica de rep-PCR.

Para estudiar la diversidad a nivel genómico de los aislamientos de la colección y las cepas tipo, se empleó en primer lugar la técnica de BOX-PCR utilizando el cebador BoxA1R. Se logró amplificar con éxito todas las cepas obteniéndose un patrón de bandas consistente entre las repeticiones y característico de cada una (**Figura 11**).

La imagen obtenida fue analizada mediante el software GelCompare, sin embargo no se logró el agrupamiento de las cepas en distintos *clusters* según su perfil de bandas ni su porcentaje de similitud, posiblemente debido a la baja calidad de la imagen original del gel (resultados no mostrados). Sin embargo, decidimos realizar un análisis preliminar en base a una comparación manual y apoyándonos en los análisis filogenéticos obtenidos anteriormente utilizando la secuencia del gen *rrs* (**Figura 8** del apartado de antecedentes). Según estos antecedentes, las cepas a caracterizar se

agrupan con la cepa tipo *C. necator* y con la cepa tipo *C. basilensis* y siguiendo este criterio se estableció el orden de siembra de las cepas en el gel de agarosa (**Figura 11**). Los aislamientos que agrupaban con la especie *C. necator*; UYPR2.512, UYPR2.54, UYPR2.55, UYMSc13B, UYMAm01A y UYMRe01A, se sembraron juntos en la parte superior de gel mostrado en la **Figura 11**. Todos estos presentaron un perfil de bandas muy similar entre sí aunque distinto al perfil obtenido para la cepa tipo *C. necator* N1. Las demás cepas a caracterizar, que agrupaban con *C. pinatubonensis* y *C. numazuensis*, se sembraron juntas en las parte inferior del gel (**Figura 11**) y presentaron perfiles de bandas únicos, que no nos permitieron su agrupamiento.



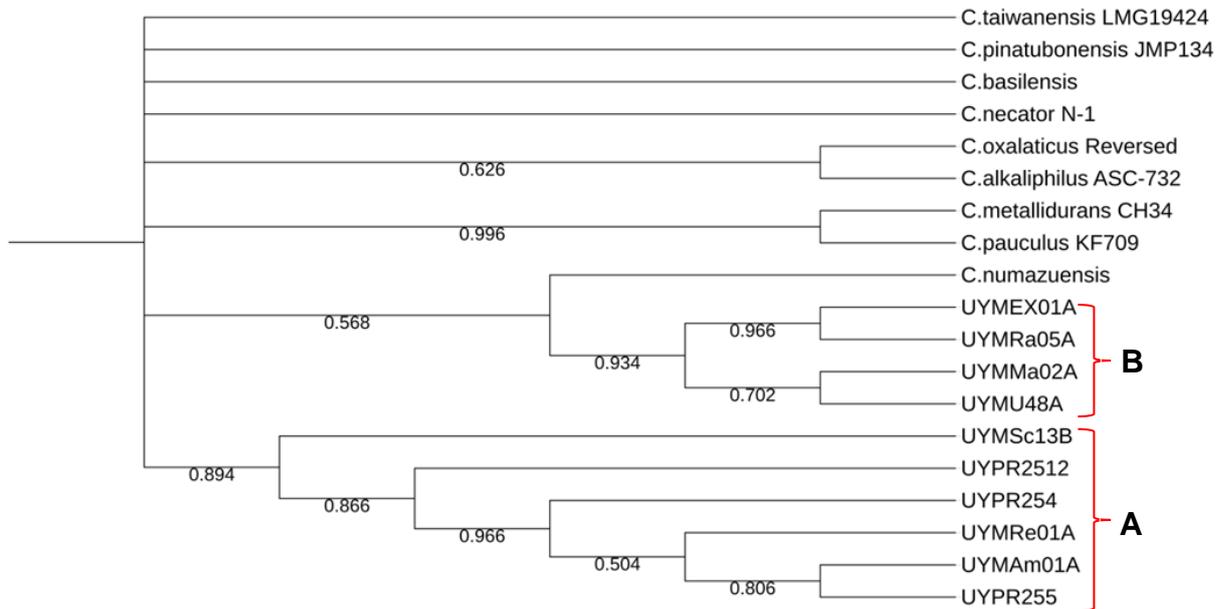
**Figura 11.** Gel de agarosa donde se observan los perfiles de bandas obtenidos mediante Box-PCR. El recuadro señala las cepas que se caracterizaron en este trabajo M. Marcador de peso molecular; C: control positivo, ADN genómico de la cepa UYMMa02A.

### **Análisis filogenéticos.**

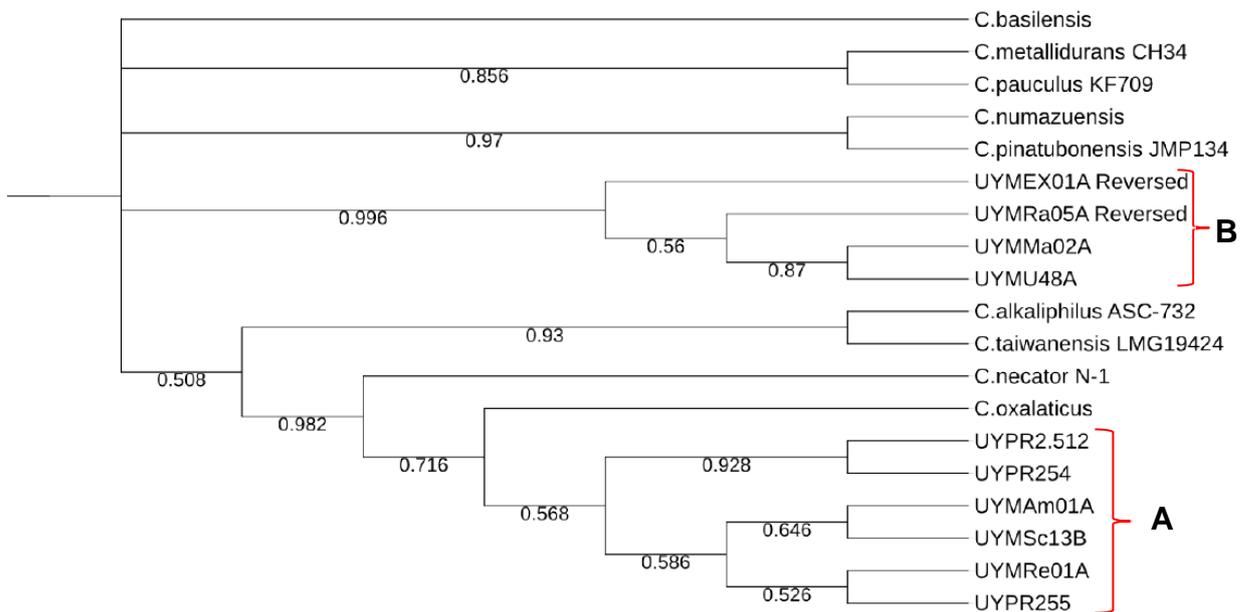
Una vez obtenidas las secuencias correspondientes a los genes *recA* y *gyrB* y un alineamiento confiable de las mismas (ver apartado de materiales y métodos) se procedió a la construcción de las filogenias utilizando el programa MEGA5 y el método de máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*). Se decidió realizar un análisis filogenético para cada gen por separado y concatenando las secuencias de ambos genes con el fin de evaluar la topología y soporte estadístico de los árboles obtenidos.

En la **Figura 12** se muestra el árbol construido a partir de las secuencias obtenidas para *gyrB* de las cepas problema y distintas cepas tipo. En este se observa claramente que se resuelven dos grupos monofiléticos (grupo de secuencias que descienden de un único ancestro en común), el grupo A, formado por las cepas UYPR2.512, UYPR2.54, UYPR2.55, UYMSc13B, UYMRa01A y UYMAm01A, con un soporte de *bootstrap* de 0.894 y el grupo B formado por las cepas UYMEx01A, UYMRa05A, UYMMa02A Y UYMU48A con un *bootstrap* de 0.934. A su vez este árbol sugiere que el grupo B agrupa también con la cepa tipo *C. numazuensis* en un mismo grupo monofilético. En concordancia con esto, en el árbol inferido con las secuencias de *recA* se observan los mismos grupos monofiléticos con las cepas de interés nuevamente con buen soporte en los nodos (**Figura 13**). En este no se termina de resolver el agrupamiento del grupo B con *C. numazuensis* pero se resuelve que el grupo A al parecer se agrupa con *C. necator* y *C. oxalaticus* con un buen soporte estadístico.

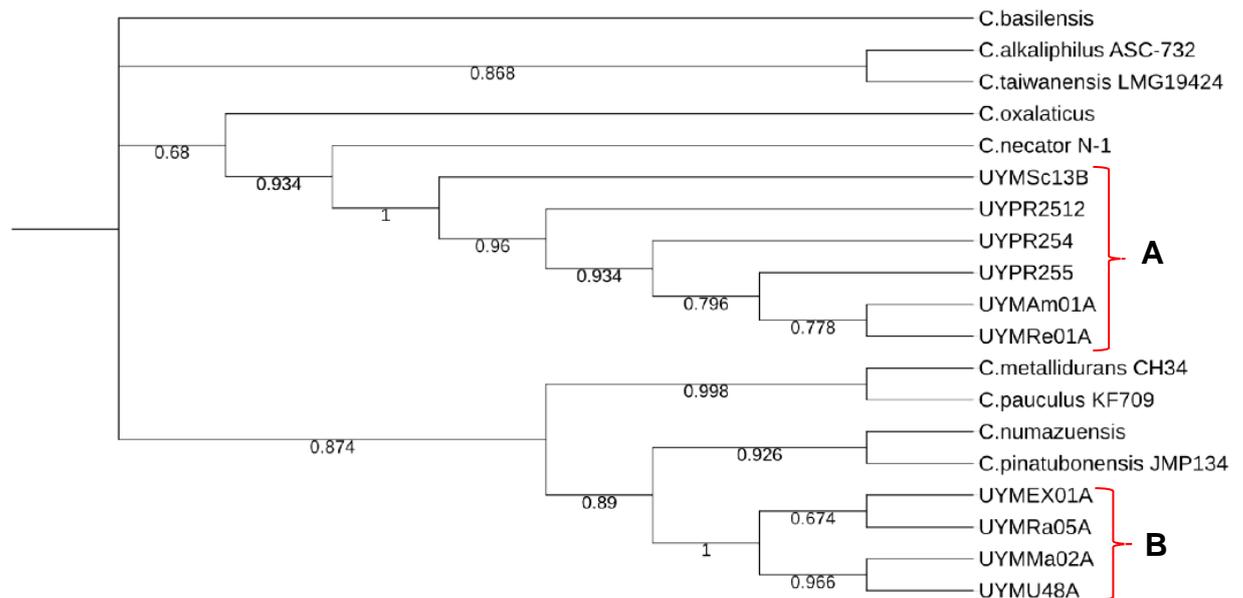
Finalmente con el concatenado de ambas secuencias, se obtuvo un árbol con una topología similar (**Figura 14**). En el mismo se logró resolver que los grupos monofiléticos descritos agrupan con las cepas tipo *C. necator* y *C. numazuensis* / *C. pinatubonensis* respectivamente con un buen soporte en los nodos (*bootstrap* de 0.934 para el agrupamiento del grupo A con *C. necator* y de 0.89 para el agrupamiento del grupo B con *C. numazuensis* y *C. pinatubonensis*).



**Figura 12.** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias del gen *gyrB*. El mismo se realizó con el programa MEGA5 utilizando el método de máxima verosimilitud. Se destacan los grupos; B, constituido por las cepas UYMEX01A, UYMRa05A, UYMMa02A y UYMU48A y A, constituido por las cepas UYPR2.512, UYPR2.54, UYPR2.55, UYMSc13B, UYMR01A y UYMAm01A. Los números en las ramas hacen referencia al valor de *bootstrap*.



**Figura 13.** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias del gen *recA*. El mismo se realizó con el programa MEGA5 utilizando el método de máxima verosimilitud. Se destacan los grupos; B, constituido por las cepas UYMEX01A, UYMRa05A, UYMMa02A y UYMU48A y A, constituido por las cepas UYPR2.512, UYPR2.54, UYPR2.55, UYMSc13B, UYMR01A y UYMAm01A. Los números en las ramas hacen referencia al valor de *bootstrap*.



**Figura 14.** Árbol filogenético construido a partir de las secuencias de los genes *recA* y *gyrB* concatenadas. El mismo se realizó con el programa MEGA5 utilizando el método de máxima verosimilitud. Se destacan los grupos; B, constituido por las cepas UYMEX01A, UYMRa05A, UYMMa02A y UYMU48A y A, constituido por las cepas UYPR2.512, UYPR2.54, UYPR2.55, UYMSc13B, UYMR01A y UYMRa01A. Los números en las ramas hacen referencia al valor de *bootstrap*.

## Caracterización fenotípica.

### Crecimiento de las cepas a distintos pH.

El ensayo se realizó en medio líquido YMA+G probando el rango de pHs 4-9. El crecimiento se reportó midiendo la  $DO_{600nm}$  a las 24, 48 y 72 horas. Se observó que tanto los aislamientos a caracterizar, como las cepas tipo empleadas, fueron capaces de crecer dentro del rango de pHs de 5 a 9, sin embargo ninguna mostró crecimiento a pH 4 (**Figura 15**).

Durante las primeras 24hs, todos los cultivos mostraron un perfil similar de crecimiento, sin embargo a pH 9 se observó que la DO de la mayoría de los cultivos comenzó a disminuir a partir de ese momento, con la notable excepción de la cepa tipo *C. alkaliphilus* la cual muestra su mejor crecimiento a este pH, alcanzando una  $DO_{600nm}$  de aproximadamente 1,2. Este comportamiento sugiere que las demás cepas comienzan a morir luego de 24hs a pH 9.

En el otro extremo del rango ensayado, pH 5, se observó un comportamiento muy particular, todas las cepas mostraron una fase “lag” o tiempo de adaptación mayor que

en el resto de las condiciones, observándose crecimiento luego de las 48 horas de incubación en estas condiciones. Aún así las cepas UYPR2.55, UYMU48A, UYMRa05A, UYMRa01A, *C. numazuensis*, *C. oxalaticus* y *C. taiwanensis* alcanzaron su mayor  $DO_{600nm}$  a este pH, mientras que para las cepas UYPR2.512, UYPR2.54, UYMSc13B y *C. alkaliphilus* el crecimiento se vió bastante comprometido. En general para estas cepas la mayor densidad óptica se alcanzó a pH 6, entrando en la fase estacionaria a las 48 horas. Para el resto de las cepas no se observaron grandes diferencias entre la  $DO_{600nm}$  alcanzada a este pH en comparación con el crecimiento a los otros pH ensayados.

Finalmente a pH 7 y 8 se observa una disminución de la densidad óptica alrededor de las 48 horas que luego comienza a aumentar nuevamente. Cabe destacar que a estos pHs la medida a las 72 horas no es muy confiable, ya que para ese momento algunos de los controles negativos incluidos en las respectivas placas presentaban turbidez, sugiriendo que se encontraban contaminados.

En la **Figura 15** se muestran las curvas de crecimiento de todas las cepas ensayadas a los distintos pH.

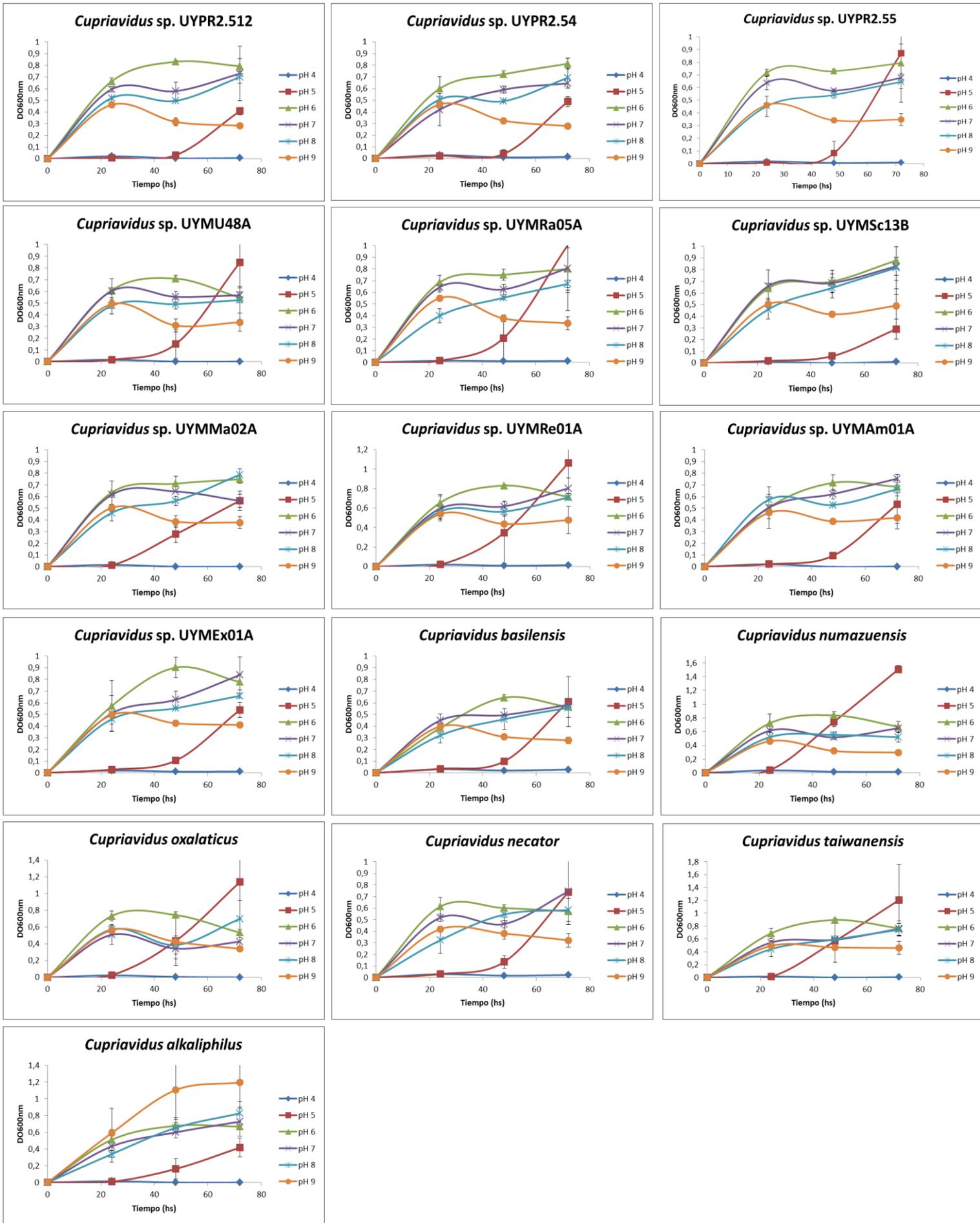


Figura 15. Curvas de crecimiento de las cepas estudiadas y las cepas de referencia en medio

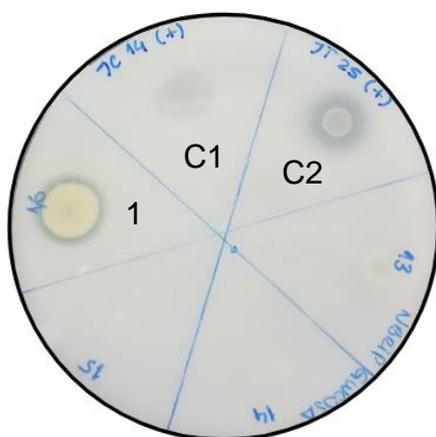
líquido YMA en el rango de pHs 4 a 9. Se graficó la DO600nm en función del tiempo, realizando medidas de la DO a las 0, 24, 48 y 72hs.

### Solubilización de fosfato inorgánico.

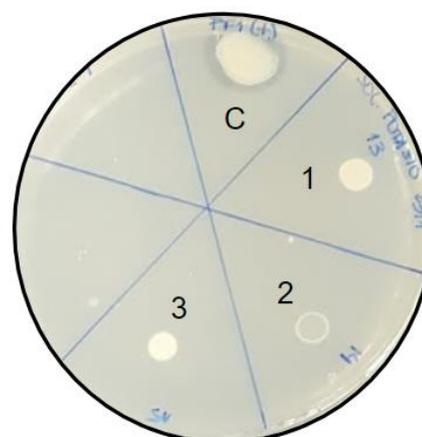
La capacidad de los aislamientos de solubilizar fosfato inorgánico se evaluó en el medio NBRIP. Todas las cepas fueron capaces de crecer en este medio, sin embargo solamente la cepa tipo de *C. alkaliphilus* logró solubilizar el fosfato tricálcico del medio, observándose un halo traslúcido alrededor de la colonia. Como controles positivos se utilizaron las cepas *Achromobacter* sp. UYSO02 y *Acinetobacter* sp. UYSO03<sup>49</sup> los cuales mostraron el comportamiento esperado (**Figura 16**).

### Solubilización de potasio.

Se utilizó una modificación del medio Aleksandrov, al cual se le agregó citrato como fuente de carbono complementaria. Todas las cepas fueron capaces de crecer en el medio pero ninguna resultó solubilizadora de potasio. Como control positivo se utilizó la cepa *Kosakonia* sp. UYSO10<sup>49</sup>, en la cual sí se observó un halo de solubilización alrededor de la colonia (**Figura 17**).



**Figura 16.** Ensayo de solubilización de fosfato inorgánico en medio NBRIP 1: *C. alkaliphilus*; C1: *Achromobacter* sp. UYSO02; C2: *Acinetobacter* sp. UYSO03.



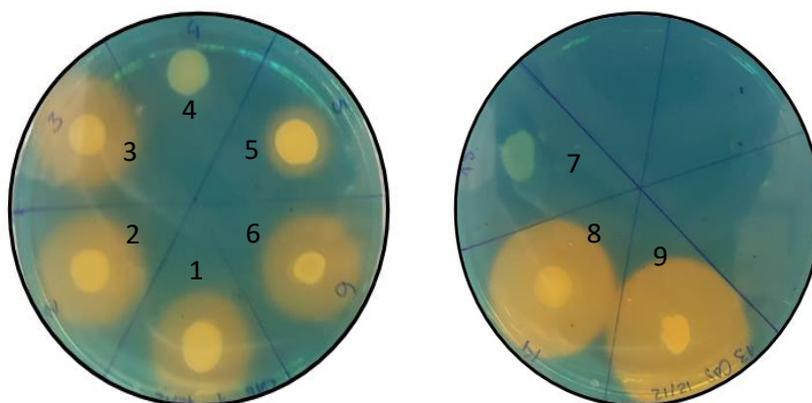
**Figura 17.** Ensayo de solubilización de potasio en medio Aleksandrov. 1: *C. oxalaticus*; 2: *C. necator*; 3: *C. taiwanensis*; C: *Kosakonia* sp. UYSO10.

### Producción de sideróforos.

El ensayo de producción de sideróforos se llevó a cabo en el medio CAS considerando productores a aquellos aislamientos que generaron un viraje de color en el medio

alrededor de la colonia (halo color naranja) (**Figura 18**). Dicho viraje ocurre debido a que los sideróforos liberados por la bacteria son capaces de secuestrar el hierro del complejo formado con el CAS. En este caso, 6 de los aislamientos a caracterizar; UYPR2.512, UYPR2.54, UYPR2.55, UYMRa05A, UYMSc13B y UYMMa02A y solamente 2 de las especies de referencia: *C. necator* y *C. oxalaticus*, resultaron productores de sideróforos. A estos aislamientos se les midió el diámetro del halo, resultado que se muestra en la **Tabla 4**.

Cabe destacar que aquellas cepas que no resultaron productoras de sideróforos en estas condiciones, sí fueron capaces de crecer en el medio.



**Figura 16.** Producción de sideróforos por los distintos aislamientos. 1: *Cupriavidus* sp. UYPR2.512; 2: *Cupriavidus* sp. UYPR2.54; 3: *Cupriavidus* sp. UYPR2.55; 4: *Cupriavidus* sp. UYMU48A; 5: *Cupriavidus* sp. UYMRa05A; 6: *Cupriavidus* sp. UYMSc13B; 7: *C.taiwanensis*; 8: *C.necator*; 9: *C.oxalaticus*.

**Tabla 4.** Medida del diámetro de los halos observados en el medio CAS para las cepas productoras de sideróforos.

Cepa	Diámetro del halo (cm)
<i>Cupriavidus</i> sp. UYPR2.512	2,4 ± 0,1
<i>Cupriavidus</i> sp. UYPR2.54	2,3 ± 0,1
<i>Cupriavidus</i> sp. UYPR2.55	2,3 ± 0,2
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMU48A	-
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMRa05A	1,6 ± 0,1
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMSc13B	2,0 ± 0,1
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A	2,3 ± 0,0
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMRa01A	-
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMAm01A	-
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMEEx01A	-
<i>C. basilensis</i>	-
<i>C. numazuensis</i>	-
<i>C. oxalaticus</i>	2,4 ± 1,2
<i>C. necator</i>	2,5 ± 0,3
<i>C. taiwanensis</i>	-
<i>C. alkaliphilus</i>	-

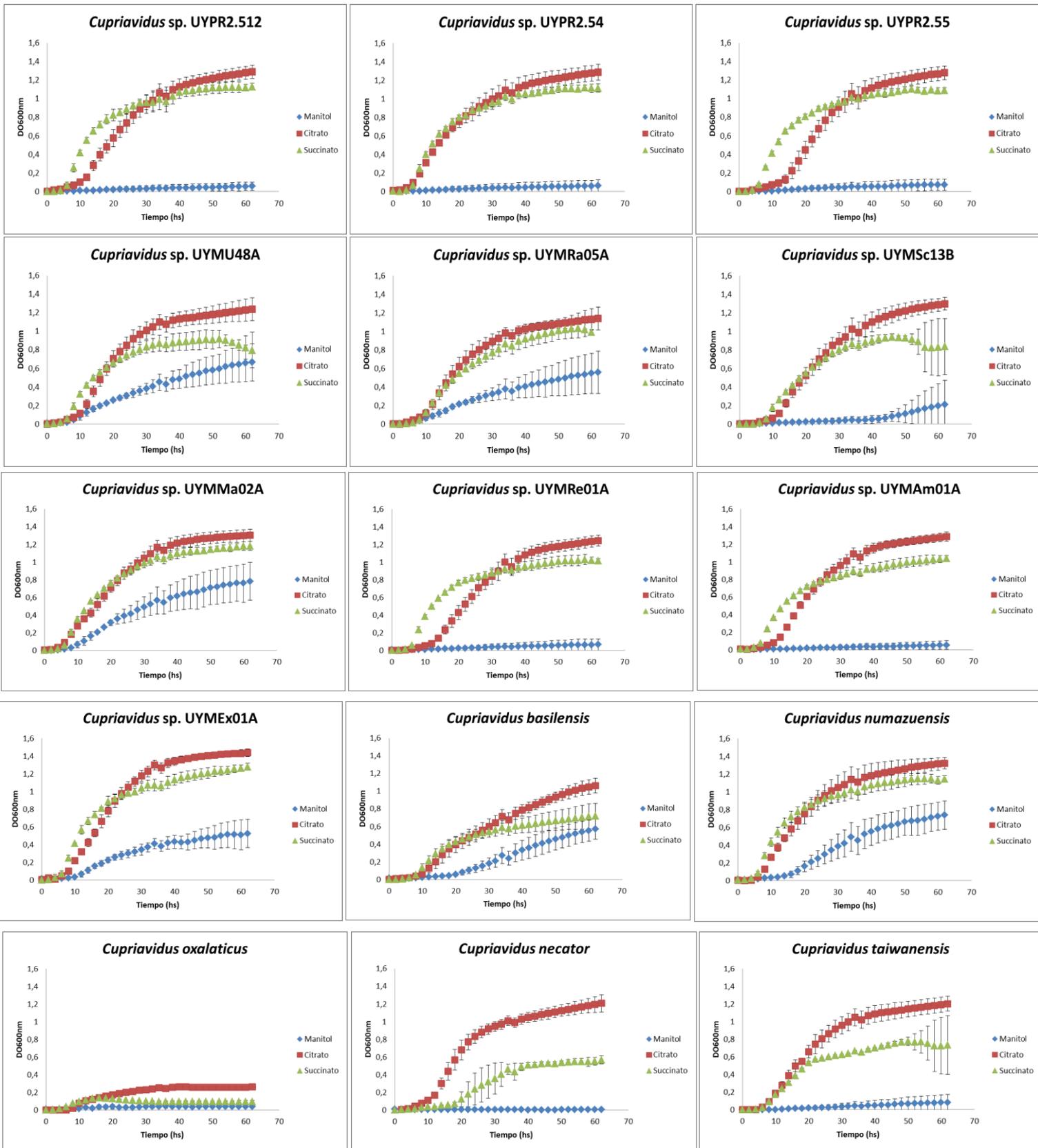
## Uso de fuentes de carbono.

### Crecimiento en medio líquido M9.

Se realizaron curvas de crecimiento detalladas midiendo la  $DO_{600nm}$  cada 2 horas durante 64hs, probando manitol, citrato y succinato como fuentes de carbono **Figura 19**. Todas las cepas mostraron un buen crecimiento utilizando citrato como única fuente de carbono, alcanzando una  $DO_{600nm}$  de aproximadamente 1,4. La única excepción fue la cepa tipo *C. oxalaticus* que si bien creció usando citrato como fuente de carbono, su crecimiento fue limitado, sin embargo cabe destacar que esta cepa crece formando gránulos y no en suspensión como el resto de las cepas ensayadas por lo que la DO no es una buena medida para determinar su crecimiento.

El crecimiento en succinato mostró un comportamiento similar, registrándose un buen crecimiento en la mayoría de las cepas, aunque las cepas tipo *C. necator*, *C. taiwanensis* y *C. basilensis* alcanzaron una DO ligeramente menor que la alcanzada con citrato. Sin embargo cabe destacar que para las cepas UYPR2.512, UYPR2.54, UYMU48A, UYMRa01A, UYMAm01A y UYMEEx01A, se observa en succinato una disminución de la fase de latencia, entrando en fase exponencial de crecimiento antes que con citrato (entre la 6 y 8hs).

Por otro lado el manitol, empleado como principal fuente de carbono en el medio YMA, recomendado para rizobios<sup>72</sup>, solamente permitió el desarrollo de algunas cepas; UYMU48A, UYMRa05A, MMa02A, UYMEEx01A, *C. basilensis* y *C. numazuensis*. Igualmente en todos los casos el crecimiento fue menor que con citrato y succinato.



**Figura 17.** Curvas de crecimiento en medio mínimo M9 con Manitol (curva azul), Citrato (curva roja) y Succinato (curva verde) como única fuente de carbono.

## Crecimiento en medio sólido.

Para continuar con la caracterización fenotípica, se ensayó la capacidad de los 16 aislamientos de crecer en medio M9-agar, suplementado con las siguientes fuentes de carbono: glutamato, manitol, glucosa, citrato, fructosa, malato, sacarosa, arabinosa, xilosa, succinato y oxalato de sodio.

El resultado que se presenta en la **Tabla 5** muestra que todas las cepas fueron capaces de crecer utilizando glutamato, succinato, citrato y malato, mientras que la fructosa fue una buena fuente de carbono para la mayoría, pero no permitió el crecimiento de dos de las cepas de nuestra colección ni de las cepas tipo de *C. numazuensis* y *C. necator*. Con las demás fuentes de carbono el crecimiento se vio más comprometido. Cabe destacar que las cepas UYMU48A y UYMRa05A sobresalieron por su capacidad de crecer, en mayor o menor medida, con la mayoría de las fuentes de carbono, a excepción del oxalato de sodio.

**Tabla 5.** Crecimiento para las 10 cepas a caracterizar y las 6 cepas tipo con distintas fuentes de carbono en medio sólido M9.

Cepa	Glutamato	Manitol	Glucosa	Citrato	Fructosa	Malato	Sacarosa	Arabinosa	Xylosa	Succinato	Oxalato
UYPR2.512	++	-	-	+	++	+	-	-	-	+	-
UYPR2.54	++	-	-	+	++	+	-	-	-	+	-
UYPR2.55	++	-	-	+	++	+	-	-	-	+	-
UYMU48A	++	-/+	-/+	+	++	+	-/+	-/+	-/+	+	-
UYMRa05A	++	-/+	-/+	++	++	++	-/+	-/+	-/+	++	-
UYMSc13B	++	-	-	+	-	++	-	-	-	++	-
UYMM02A	++	-	-/+	+	++	+	-	-/+	-/+	++	-
UYMRa01A	++	-	-	+	++	+	-	-	-	++	-
UYMAm01A	++	-	-	+	-	+	-	-	-	++	-
UYMEx01A	++	-	-	+	-/+	+	-	-	-/+	+	-
<i>C. basilensis</i>	++	-	-	+	++	+	-	-/+	-/+	+	-/+
<i>C. numazuensis</i>	++	-	-	+	-	+	-	-	-/+	+	-
<i>C. oxalaticus</i>	++	-	-/+	++	++	+	-/+	-/+	-/+	+	-
<i>C. necator</i>	++	-	-/+	+	++	+	-	-	-	+	-
<i>C. taiwanensis</i>	++	-	-/+	+	-	+	-	-	-	++	-
<i>C. alkaliphilus</i>	+	++	++	+	++	-/+	-	+	+	-/+	-

++: Buen crecimiento; +: Crecimiento moderado; -/+ : Muy poco crecimiento; -: Crecimiento nulo

## Crecimiento con compuestos aromáticos como fuente de carbono.

Para evaluar la capacidad de las cepas de utilizar los compuestos benzoato, 4-hidroxibenzoato y 3-metilbenzoato, se procedió a incorporar cada uno de estos compuestos sobre papeles de filtro estériles colocados en la superficie de medio M9 (sin otra fuente de carbono) conteniendo a la cepa a ensayar incorporada en el medio. La capacidad de los aislamientos de utilizar estos compuestos como fuente de carbono se evidenció por la aparición de un halo de crecimiento alrededor de los papeles de filtro. Una solución de citrato de sodio fue empleada como control positivo

de crecimiento. Como era de esperarse todas las cepas fueron capaces de crecer alrededor del pocillo conteniendo Citrato. Interesantemente también todas las cepas formaron un halo de crecimiento alrededor del papel conteniendo benzoato de sodio, demostrando que son capaces de utilizar este compuesto como fuente de carbono. Por otro lado solamente la cepa tipo *C. basilensis* 4G11, creció alrededor del pocillo que contenía 4-hidroxibenzoato y no se observó crecimiento de ninguna cepa alrededor de los pocillos conteniendo 3-metilbenzoato. Estos resultados se detallan a continuación en la **Tabla 6**, donde se muestra la medida del diámetro del halo de crecimiento observado.

**Tabla 6.** Medidas del diámetro de los halos de crecimiento para los distintos aislamientos utilizando Benzoato, Citrato o 4-hidroxibenzoato como única fuente de carbono.

Cepa	Benzoato (150 mM) Diámetro del halo (cm)	Citrato (150 mM) Diámetro del halo (cm)	4-hidroxibenzoato (36 mM) Diámetro del halo (cm)
UYPR2.512	2,9 ± 0,1	1,7 ± 0,5	-
UYPR2.54	3,0 ± 0,0	2,4 ± 0,1	-
UYPR2.55	2,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1	-
UYMU48A	3,6 ± 0,1	2,8 ± 0,3	-
UYMRa05A	3,1 ± 0,4	1,9 ± 0,6	-
UYMSc13B	3,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	-
UYMMa02A	3,3 ± 0,1	1,7 ± 0,5	-
UYMRa01A	3,3 ± 0,3	2,1 ± 0,4	-
UYMAm01A	3,2 ± 0,2	2,2 ± 0,3	-
UYMEx01A	3,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	-
<i>C. basilensis</i>	3,7 ± 0,4	1,9 ± 0,2	2,3 ± 0,4
<i>C. numazuensis</i>	3,2 ± 0,1	1,6 ± 0,1	-
<i>C. oxaliticus</i>	3,0 ± 0,1	2,3 ± 0,1	-
<i>C. necator</i>	2,9 ± 0,2	1,8 ± 0,2	-
<i>C. taiwanensis</i>	3,0 ± 0,3	2,0 ± 0,4	-
<i>C. alkaliphilus</i>	*	*	*

\*no se determinó ya que el cultivo primario necesario para inocular el medio no creció.

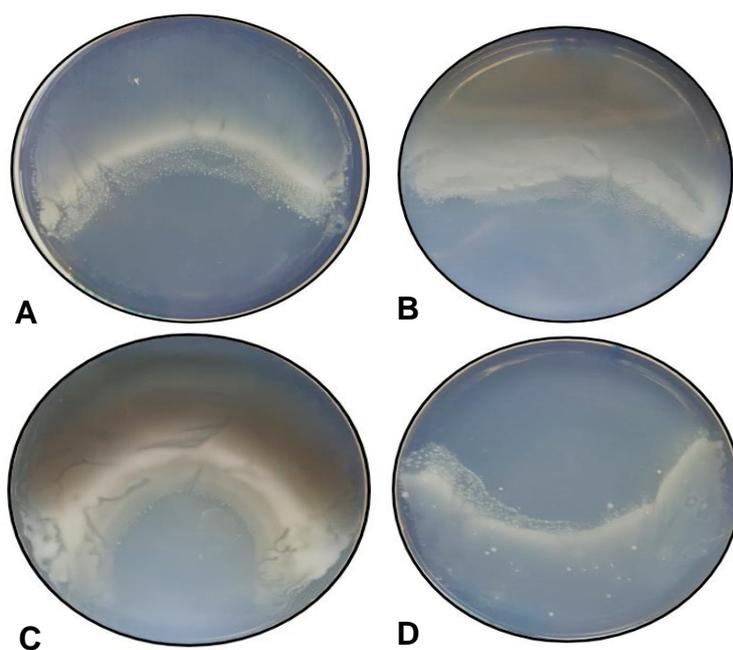
### Crecimiento con el compuesto aromático Fenol en medio sólido M9.

El ensayo reveló que 11 de los 16 aislamientos, los cuales se detallan en la **Tabla 7**, fueron capaces de utilizar fenol como única fuente de carbono. Interesantemente en todos los casos se observó un halo de inhibición en la zona del medio más cercana al sitio en el que se colocó la gota de fenol. En la **Figura 20** se muestran algunos ejemplos del tipo de crecimiento observado. Como control positivo del ensayo se utilizó la cepa *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134<sup>71</sup>.

**Tabla 7.** Capacidad de los distintos aislamientos de crecer utilizando fenol como única fuente de carbono.

Cepa	Fenol
<i>Cupriavidus</i> sp. UYPR2.512	+
<i>Cupriavidus</i> sp. UYPR2.54	+
<i>Cupriavidus</i> sp. UYPR2.55	+
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMU48A	++
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMRa05A	++
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMSc13B	-
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMMa02A	+
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMRa01A	-
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMAm01A	-
<i>Cupriavidus</i> sp. UYMEx01A	++
<i>C. basilensis</i>	+
<i>C. numazuensis</i>	+/-
<i>C. oxalaticus</i>	+/-
<i>C. necator</i>	+
<i>C. taiwanensis</i>	-
<i>C. alkaliphilus</i>	-

++: Buen crecimiento; +: Crecimiento moderado; +/-: Muy poco crecimiento; -: Crecimiento nulo



**Figura 18.** Crecimiento con fenol de las cepas: A: UYPR2.54 (crecimiento moderado); B: Control positivo-*C.pinatubonensis* JMP134; C: UYMU48A (buen crecimiento); D: UYPR2.55 (crecimiento moderado).

## DISCUSIÓN.

En nuestro país se han reportado más de 290 especies de leguminosas nativas, sin embargo es poco lo que se sabe sobre la diversidad de especies bacterianas capaces de asociarse simbióticamente con ellas. El estudio sobre la diversidad y riqueza de estos microorganismos es fundamental para poder hacer un manejo exitoso de estas plantas. En este sentido, el objetivo principal del presente trabajo fue ahondar en el conocimiento de estos simbioses. Trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación mostraron la presencia de rizobios pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus* asociados a leguminosas nativas presentes en distintos puntos de nuestro país<sup>57</sup>. El estudio de este grupo de rizobios conocidos como beta-rizobios, abre una nueva etapa en la investigación de la simbiosis planta-bacteria, por lo que en los últimos años nuestro grupo ha construido una colección de beta-rizobios aislados a partir de nódulos de diversas leguminosas nativas pertenecientes a la subfamilia de las *Mimosoideae* entre las que se destacan *Parapiptadenia rigida* y más de 10 especies de *Mimosas*. Actualmente nuestra colección consta de más de 50 aislamientos los cuales han sido identificados y clasificados mediante la amplificación y secuenciación del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal.

Para poder avanzar en la caracterización de este grupo de rizobios, en este trabajo nos centramos en el estudio de 10 aislamientos de *Cupriavidus spp.* aislados a partir de nódulos de distintas leguminosas nativas presentes en diferentes regiones del país. Para su comparación se seleccionaron cepas tipo pertenecientes a especies de *Cupriavidus* más cercanas a estos aislamientos o que presentaban alguna característica específica, como la cepa LMG19424 de *C. taiwanensis*, el primer rizobio reportado para este género<sup>23</sup> y la cepa JMP134 de *C. pinatubonensis*, modelo en el estudio de la degradación de compuestos aromáticos<sup>59</sup> (**Tabla 2.** del apartado de materiales y métodos).

Los análisis filogenéticos basados en la secuencia de los genes *housekeeping recA* y *gyrB* mostraron que los *Cupriavidus* aislados de nuestro país conforman dos grupos monofiléticos distintos, uno formado por las cepas UYPR2.512, UYPR2.54, UYPR2.55, UYMSc13B, UYMRa01A y UYMAm01A y el otro por los aislamientos UYMEx01A, UYMRa05A, UYMMa02A y UYMU48A (**Figura 14.** del apartado de resultados). Estos resultados son congruentes con análisis previos realizados en base a la secuencia del gen *rrs* (ver **Figura 8.** de antecedentes) y con el análisis realizado en base a todo el genoma (**Figura 9.** de antecedentes), en el cual fueron incluidas las

cepas UYPR2.512 y UYMMa02 como representantes de los dos grupos. Lo interesante es que, según esta caracterización genotípica, ninguna de las cepas descritas pertenece a la especie *C. taiwanensis*, la cual hasta recientemente era la única caracterizada como simbiote de leguminosas<sup>73</sup>, sino que se encuentran más emparentadas con otras especies del género *Cupriavidus* tales como *C. necator*, *C. numazuensis* y *C. pinatubonensis*. Cepas de rizobio pertenecientes a la especie *C. necator* fueron aisladas por Da Silva et al. (2012) en la región de Minas Gerais en Brasil<sup>74</sup>. En ese mismo año nuestro grupo reportó cepas filogenéticamente muy emparentadas a estos *C. necator*, obtenidas a partir de nódulos de *Parapiptadenia rigida* (Taulé et al., 2012)<sup>57</sup>, pero hasta el momento no se han reportado simbioses representativas de las especies *C. numazuensis* ni *C. pinatubonensis* en otras partes del mundo.

El hecho de que las cepas UYMEx01A, UYMRa05A, UYMMa02A y UYMU48A no agrupen con *Cupriavidus* descritos como simbioses es emocionante ya que sugiere el hallazgo de nuevas especies. La presencia de estas nuevas especies en nuestro país no es un acontecimiento aislado; las mismas fueron encontradas en nódulos de distintas leguminosas (*M. excedentis*, *M. ramulosa*, *M. magentea* y *M. uraguensis*) en distintos puntos del territorio, demostrando que la diversidad de especies de *Cupriavidus* simbióticas es mayor a la pensada hasta el momento y que Uruguay podría ser un sitio de origen de diversidad para este género bacteriano.

El concepto de especie bacteriana se encuentra en constante revisión y ha ido evolucionando conforme se desarrollan nuevas técnicas de análisis. Hasta el momento no existe una definición oficial sobre lo que es una especie en microbiología, sin embargo es de común acuerdo que el conocimiento completo sobre una especie bacteriana requiere un enfoque multidisciplinario en el cual se describan sus características genotípicas y fenotípicas<sup>75,76</sup>.

La caracterización fenotípica realizada en este trabajo nos permite concluir que los aislamientos en estudio al igual que las cepas tipo de especies de *Cupriavidus* estudiadas, tienen una gran capacidad de adaptarse a distintas condiciones de pH ya que en general fueron capaces de crecer dentro del rango de pH de 5 a 9 en medio líquido. Esto es relevante ya que es sabido que el pH es uno de los factores que afectan tanto el crecimiento de la planta y de la bacteria así como el establecimiento del nódulo<sup>77</sup>. En particular se ha reportado que el efecto negativo sobre el establecimiento de la simbiosis es más considerable en los suelos ácidos, afectándose la producción de los factores Nod, la adherencia de las bacterias a las raíces, el

número de nódulos y la actividad de la nitrogenasa<sup>78</sup>. El aumento de la concentración de protones en el suelo disminuye la disponibilidad de calcio y fósforo a la vez que aumenta la solubilidad de aniones tóxicos como  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , en los sistemas productivos, la disminución del pH ocurre generalmente por un ciclado de nutrientes pobre, los efectos acidificantes de los fertilizantes nitrogenados y la lixiviación del suelo<sup>79,77</sup>. Graham et al (1994)<sup>80</sup> propusieron que la tolerancia a la acidez por los rizobios se correlaciona con la producción de exopolisacáridos y poliaminas así como la concentración de glutamato en la célula. A su vez, Muglia et al. (2007)<sup>81</sup> destacaron el rol del glutatión en el crecimiento de *R. tropici* bajo condiciones ácidas y Watkin et al. (2003) reportaron que la habilidad del rizobio ácido tolerante *R. leguminosarum* bv. *Trifolii* se debe a la acumulación de niveles altos de potasio y fósforo en comparación con las cepas más sensibles<sup>79</sup>. Se ha demostrado que la aplicación de cepas de rizobio ácido-tolerantes mejora la interacción simbiótica. Algunos reportes han concluido que una buena nodulación puede ser lograda en condiciones ácidas mientras uno de los simbioses sea ácido-tolerante<sup>77</sup>.

Luego del nitrógeno, el fósforo es uno de los nutrientes principales que limitan el crecimiento vegetal ya que su biodisponibilidad en el suelo es baja. La aplicación de fertilizantes fosfatados es una forma para proveer a las plantas de este elemento, sin embargo el uso excesivo de los mismos es, no solamente costoso, sino que daña al medio ambiente y además, gran parte del fósforo aplicado es rápidamente inmovilizado mediante la precipitación con  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  en suelos ácidos o con  $\text{Ca}^{2+}$  en suelos calcáreos o neutros<sup>79,82</sup>. Por lo tanto la movilización de las formas insolubles y precipitadas del fósforo mediante el uso de microorganismos es un aspecto importante a considerar. Es sabido que la inoculación de semillas y el suelo con bacterias solubilizadoras de fósforo tiene un resultado positivo sobre el rendimiento de los cultivos. Varios autores atribuyen esta capacidad solubilizadora a la producción de ácidos orgánicos y quelantes oxácidos sintetizados a partir de azúcares<sup>67</sup>. Además de la fijación biológica de nitrógeno, los rizobios pueden beneficiar a las plantas mediante el aumento en la disponibilidad de nutrientes a través de la solubilización de potasio y fósforo inorgánico. Las bacterias con estas capacidades son denominadas comúnmente como bacterias promotoras del crecimiento vegetal<sup>79,83</sup>. En las condiciones ensayadas en este trabajo ninguno de los aislamientos analizados fue capaz de solubilizar potasio ni fósforo, mientras que de las cepas de referencia ensayadas, únicamente la cepa tipo de *C. alkaliphilus* destacó por su capacidad de solubilizar fósforo. Sin embargo se demostró que varios de los aislamientos caracterizados así como las cepas tipo *C. oxalaticus* y *C. necator* fueron capaces de

producir sideróforos. Estos son compuestos de bajo peso molecular, con alta afinidad por el hierro, el cual es un micronutriente esencial para las plantas. El suelo generalmente contiene grandes cantidades de Fe en forma de óxidos amorfos y cristalinos y distintos minerales; la disolución de los mismos libera dos formas solubles:  $\text{Fe}^{2-}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , que pueden ser utilizadas por plantas y microorganismos. Esta disolución depende fuertemente del pH y el potencial redox del suelo, bajo condiciones aerobias y a pH neutro a alcalino, este elemento se encuentra principalmente como hidróxidos u oxihidróxidos muy insolubles<sup>79,84</sup>. Los sideróforos son capaces de secuestrar el hierro, aumentando su biodisponibilidad y además pueden formar compuestos estables con metales pesados tales como, Al, Cd, Cu, entre otros<sup>79</sup>. También se ha visto que la producción de sideróforos puede tener un importante efecto sobre el control de microorganismos patógenos y en algunos casos se ha demostrado su participación en la inducción de los mecanismos sistémicos de resistencia de la planta. En suma, estos compuestos producidos por las bacterias, pueden asistir a las plantas en la asimilación del hierro, aliviarlas del estrés por metales pesados e inhibir la colonización de las raíces por microorganismos patógenos<sup>79,84,83</sup>. En relación con esto, varias de las cepas productoras de sideróforos caracterizadas en este trabajo, habían sido previamente descritas como resistentes a diversos metales pesados (Sandes, 2015; Platero et al., 2016)<sup>18,31</sup>. Gadd (2010)<sup>85</sup> plantea la existencia de diversos mecanismos empleados por las bacterias para tolerar la presencia de metales. Entre estos se encuentran, la volatilización, precipitación y quelado intracelular, la producción de enzimas detoxificantes, disminución del transporte por la membrana y precipitación dentro de la paredes, mecanismos de eflujo y la liberación de metabolitos quelantes al medio. Por este motivo, creemos que los sideróforos producidos por estos aislamientos, estarían involucrados en la resistencia a metales observada, quelandolos e impidiendo concentraciones tóxicas en su entorno, aunque son necesarios más estudios para corroborar esta hipótesis.

El género *Cupriavidus* se caracteriza por tener una gran plasticidad metabólica<sup>24</sup>. En este sentido las bacterias caracterizadas en este trabajo también se destacaron por su capacidad de crecer utilizando diversas fuentes de carbono, en particular resaltamos que varios de los aislamientos así como cepas tipo, lograron utilizar compuestos aromáticos como benzoato, 4-hidroxybenzoato (solamente la cepa tipo *C. basilensis*) y fenol. Dado que aproximadamente el 25% de la biomasa terrestre está formada por compuestos que contienen un anillo de benceno como el principal componente estructural y que los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, la habilidad de las cepas de utilizarlos como fuente de carbono significa una

ventaja para las mismas en el ambiente de la rizosfera<sup>83</sup>. Pérez Pantoja et al. (2008)<sup>59</sup> destacaron a la cepa *Cupriavidus pinatubonensis* (ex. *C. necator*) JMP134 por su capacidad de utilizar una gran variedad de compuestos aromáticos y cloroaromáticos como única fuente de carbono. La misma posee 11 de las 12 rutas principales de degradación de compuestos aromáticos reportadas en Proteobacteria y en su genoma se encuentran genes codificantes para más de 70 oxigenasas implicadas en el catabolismo de los mismos. Una de las principales vías catabólicas es la que converge en la formación de  $\beta$ -cetoadipato, en *C. pinatubonensis* JMP134, la misma posee dos ramas principales: la rama del catecol (codificada por los genes *cat*), que convierte el catecol generado a partir de benzoato, fenol y algunos monómeros de lignina en  $\beta$ -cetoadipato, y la rama del protocatecuato (codificada por los genes *pca*) que a partir del protocatecuato derivado del 4-hidroxibenzoato y de diversos monómeros de lignina genera el  $\beta$ -cetoadipato. Finalmente dos pasos adicionales logran la conversión de este compuesto en los intermediarios del ciclo de Krebs succinil-CoA y acetil-CoA<sup>59,71</sup>. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de la rama del catecol en todas las cepas estudiadas ya que fueron capaces de crecer utilizando benzoato como única fuente de carbono y en algunos casos fenol. Sin embargo, a excepción de la cepa tipo *C. basilensis*, cabría asumir que estas cepas no poseen la rama del protocatecuato debido a su incapacidad de utilizar 4-hidroxibenzoato. En particular en *C. pinatubonensis* JMP134 el primer paso de esta vía (conversión del 4-hidroxibenzoato a protocatecuato) se da por los productos del gen *pob*, el cual podría estar ausente en nuestras cepas<sup>59</sup>. Además de la descomposición vegetal, gran cantidad de compuestos aromáticos contaminantes son liberados al ambiente por la actividad antropogénica por lo que la habilidades degradativas de las cepas reportadas podría ser explotada para la biorremediación de suelos contaminados.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Las especies descritas en este trabajo apoyan el hecho de que la diversidad de microorganismos simbiotes pertenecientes al género *Cupriavidus* es mayor a lo que se pensaba hasta el momento y que nuestro país podría representar un centro de diversificación para este género.

Para concluir la descripción de las especies propuestas y poder depositarlas en colecciones bacterianas como la BCCM/LMG ([bccm.belspo.be](http://bccm.belspo.be)) es necesario completar nuestros análisis. Dentro de la caracterización genotípica, debemos concluir el análisis de los resultados obtenidos mediante la técnica de Box-PCR. Por otro lado hemos avanzado en la caracterización genética del género *Cupriavidus* aportando nuevas secuencias para los genes *recA* y *gyrB* tanto de nuestras cepas como de cepas tipo, estas secuencias están siendo procesadas para su depósito en el Genebank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) como contribución al conocimiento científico. Los análisis basados en la sumatoria de las secuencias de ambos genes permitieron definir la posición filogenética de nuestros aislamientos. Sin embargo se espera que en un futuro cercano, la disminución de los costos de secuenciación permitan realizar estos análisis empleando la secuencia completa genómica de las cepas tal como se realizó hasta ahora para un único representante de cada grupo de *Cupriavidus* simbióticos. La disponibilidad de la información genética completa nos permitiría completar otros requerimientos como el contenido de G+C de estas cepas y realizar análisis *in silico* de niveles de identidad nucleotídica (ANI). En cuanto a la caracterización fenotípica resta analizar la composición de ácidos grasos, lípidos totales y quinonas, lo cual se realizará como servicio en el servicio del BCCM/LMG. Finalmente la visualización y fotografía por microscopía electrónica se realizará en el servicio de Facultad de Ciencias, UdelaR.

Además de estudiar la diversidad de rizobios asociados a leguminosas nativas, nuestro grupo de investigación tiene interés en el estudio de los mecanismos involucrados en la interacción rizobio-leguminosa. Para esto estamos iniciando un proyecto en el cual se estudiará, mediante las técnicas de genómica funcional y proteómica de alto rendimiento, los genes y vías metabólicas bacterianas implicadas el establecimiento de la simbiosis entre la cepa de *Cupriavidus* sp. UYMMa02A y su par simbiótico la leguminosa *Mimosa pudica*. Es en el marco de este proyecto en el cual tengo planeado continuar mis estudios de postgrado.

Finalmente cabe destacar que la versatilidad metabólica y características PGPR de las cepas caracterizadas, las colocan entre especies con potencial agroecológico, pudiendo ser utilizadas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y como posibles biorremediadoras de suelos contaminados con xenobióticos. Los datos generados en este trabajo contribuyen a incrementar el conocimiento sobre la diversidad y riqueza de microorganismos simbióticos presentes en los suelos de nuestro territorio, lo cual es fundamental para el manejo exitoso de las leguminosas con las que se asocian.

## ANEXO 1.

### Medios de cultivo.

#### Medio TY

Componente	Cantidad por litro
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl <sub>2</sub> 2,5%	2 ml
Agar	16 g
H <sub>2</sub> O c.s.p 1 litro	

Pesar y disolver los componentes en agua destilada y luego agregar el agar. Se esteriliza a 121°C por 20 minutos

#### Medio YMA+G

Componente	Cantidad por litro
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anh	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
Extracto de levadura	1,0 g
Manitol	10 g
H <sub>2</sub> O c.s.p 1 litro	
Glutamato 10 % (p/v)	10 ml

Se ajusta el pH a 6,8 – 7 y se esteriliza a 121°C por 20 minutos. El glutamato se esteriliza por separado y se agrega al medio luego de esterilizado

#### Medio NBRIP

Componente	Cantidad por litro
Glucosa	10 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5 g
MgCl <sub>2</sub>	2,34 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 g
KCl	0,2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 g
Agar	16 g
H <sub>2</sub> O c.s.p 1 litro	

Pesar y disolver los componentes en agua destilada y luego agregar el agar. Se esteriliza a 121°C por 20 minutos

## Medio M9

Componente	Cantidad por litro
Sales M9 5x *	200 ml
MgSO <sub>4</sub> 1M	2 ml
Solución 20 % (p/v) de la fuente de carbono	20 ml
CaCl <sub>2</sub> 1M	0,1 ml
H <sub>2</sub> O c.s.p 1 litro	
<b>Sales 5x *</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	64 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
NaCl	2,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	5,0 g
H <sub>2</sub> O c.s.p 1 litro	

Las sales y el resto de los componentes se esterilizan por separado y luego se arma el medio. Para el medio sólido se agrega agar 18 g/L.

Como fuentes de carbono se utilizaron en una concentración de 14mM: sal de ácido glutámico monosódico hidratado SIGMA #096K0111; citrato de sodio tribásico dihidratado SIGMA #087K0055; D-manitol SIGMA #BCBL2493V; D-sacarosa J.T.Baker #4072-01; D-fructosa SIGMA #1.05323; ácido málico DL SIGMA #11624MH; D-glucosa SIGMA #G8270; L-arabinosa SIGMA #A3256; D-xilosa SIGMA #WXBC1601V; sal de ácido succínico disódico hexahidratado SIGMA #110K0278; oxalato de sodio SIGMA #077K0704

## Medio Aleksandrov modificado\*

Componente	Cantidad por litro
Sacarosa	5 g
Citrato	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
CaCO <sub>3</sub>	1 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O c.s.p 1 litro	

\*La modificación consistió en colocar 5 g de sacarosa y 5 g de citrato en lugar de los 10 g de sacarosa de la receta original.

Se disuelven los componentes en agua destilada, se ajusta el pH a 7,5 y finalmente se agrega el agar. Se esteriliza a 121°C por 20 minutos

## Medio CAS

Componente	Cantidad por litro
<b>Medio base</b>	
Solución salina *	100 ml
PIPES	30,24 g
Ext. levadura desferrado	1,0 g
MgCl 1M	1 ml
CaCl <sub>2</sub> 0,1M	1 ml
Manitol	1,0 g
Agar	15 g
H <sub>2</sub> O	748 ml
<b>Solución salina *</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3 g
NaCl	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
H <sub>2</sub> O	100 ml
<b>Solución colorante</b>	
CAS	60,48 mg
H <sub>2</sub> O	59 ml

Se ajusta el pH del medio base a 6,8 con NaOH 50%, luego se agrega 10 ml/L de fructosa 20% previamente esterilizada (el medio original contiene glucosa pero se decidió sustituir esta fuente por fructosa debido a que nuestros aislamientos crecen mejor con esta última), 6,25 ml/L de glutamato 10% y 6,25 ml/L de biotina 0,01%.

Mezclar la solución colorante con 1 ml de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (135 mg/50 ml en HCl 0,01N) y bajo agitación constante agregarla gota a gota sobre una solución de 72,88 mg de HDTMA en 40 ml de H<sub>2</sub>O. Agregar la solución final al medio base justo antes de armar las placas. Previamente al armado de placas todas las soluciones (base, salina y HDTMA) deben esterilizarse a 121°C por 20 minutos.

## Soluciones.

### Buffer Tris-Acético-EDTA (TAE) 50X

Componente	Cantidad por litro
Tris-base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M pH 8.0	100 ml
H <sub>2</sub> O c.s.p 1 litro	

Se trabajó con una solución 1X obtenida por dilución de la solución stock 50X.

### Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X

Componente	Cantidad por litro
Tris Base	54 g
Ácido Bórico	27,5 g
EDTA 0,5 M	20 ml
H <sub>2</sub> O c.s.p 1 litro	

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Azcón-Bieto, J. & Talón, M. *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGrawHill (2003). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
2. Miller, A. J. & Cramer, M. D. *Root nitrogen acquisition and assimilation*. *Plant and Soil* **274**, (2005).
3. Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. (2015). doi:10.15713/ins.mmj.3
4. Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R. & Blankenship, R. E. The Natural History of Nitrogen Fixation. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 541–554 (2004).
5. Lloret, L. & Martínez-Romero, E. Evolución y filogenia de Rhizobium. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **47**, 43–60 (2005).
6. Franche, C., Lindström, K. & Elmerich, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* **321**, 35–59 (2009).
7. Mckhann, H. *et al.* Does Rhizobium Avoid the Host Response ? What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special ? 1. 1484–1492 (1994). doi:10.1104/pp.010866.1484
8. Crews, T. E. & Peoples, M. B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: Ecological tradeoffs and human needs. *Agric. Ecosyst. Environ.* **102**, 279–297 (2004).
9. Mercedes Fernandez, P. Fijación Biológica de nitrógeno: Factores limitantes. *Cienc. y Medio Ambient.* 2002 (2002).
10. Rees, D. C. *et al.* Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **363**, 971–984 (2005).
11. Hoffman, B. M., Lukoyanov, D., Yang, Z. Y., Dean, D. R. & Seefeldt, L. C. Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: The next stage. *Chem. Rev.* **114**, 4041–4062 (2014).
12. Peters, J. W., Fisher, K. & Dean, D. R. Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 335–366 (1995).
13. Hoffman, B. M., Lukoyanov, D., Dean, D. R. & Seefeldt, L. C. Nitrogenase: A draft mechanism. *Acc. Chem. Res.* **46**, 587–595 (2013).
14. Taiz, L. & Zeiger, E. *Plant Physiology*. (2010).
15. Rubio, L. M. & Ludden, P. W. Maturation of nitrogenase: A biochemical puzzle. *J. Bacteriol.* **187**, 405–414 (2005).
16. McRose, D. L., Zhang, X., Kraepiel, A. M. L. & Morel, F. M. M. Diversity and activity of alternative nitrogenases in sequenced genomes and coastal environments. *Front. Microbiol.* **8**, 1–13 (2017).
17. Fallik, E., Chan, Y. K. & Robson, R. L. Detection of alternative nitrogenases in aerobic gram-negative nitrogen-fixing bacteria. *J. Bacteriol.* **173**, 365–371 (1991).
18. Sandes, L. Análisis de Cupriavidus aislados de mimosas nativas de Uruguay.

(Facultad de Ciencias, UDELAR, 2015).

19. Dreyfus, B., Garcia, J. L. & Gills, M. Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from *Sesbania rostrata*. **98**, 89–98 (1988).
20. Alazard, D. Stem and Root Nodulation in *Aeschynomene* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 732–734 (1985).
21. Angeles, L., Evolution, M., Evolu-, M. & Interactions, S. Insights into the history of the legume- betaproteobacterial symbiosis. 28–30 (2010).
22. Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. & Boivin-Masson, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria (vol 411, pg 948, 2001). *Nature* **412**, 926-U17 (2001).
23. Chen, W. M. *et al.* *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1729–1735 (2001).
24. Vandamme, P. & Coenye, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: A tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 2285–2289 (2004).
25. Vandammel, P., Goris, J., Chen, W. M., De Vos, P. & Willems, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**, 507–512 (2002).
26. Izaguirre, P. & Beyhaut, R. *Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte 1: Papilionoideae.* (2003).
27. Velazquez, E., R. Silva, L. & Peix, A. Legumes: A Healthy and Ecological Source of Flavonoids. *Curr. Nutr. Food Sci.* **6**, 109–144 (2010).
28. Izaguirre, P. & Beyhaut, R. *Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte 2: Caesalpinioideae. Parte 3: Mimosoideae.* (2003).
29. Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E. & Bedmar, E. J. Bacterial Associations with Legumes. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **34**, 17–42 (2015).
30. Rubiales, D. & Mikic, A. Legumes in Sustainable Agriculture. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **34**, 2–3 (2015).
31. Platero, R. *et al.* Novel *Cupriavidus* strains isolated from root nodules of native Uruguayan *Mimosa* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 3150–3164 (2016).
32. Bueno dos Reis, F. *et al.* Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. *New Phytol.* **186**, 934–946 (2010).
33. Bontemps, C. *et al.* Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. *New Phytol.* **209**, 319–333 (2016).
34. Elliott, G. N. *et al.* *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. *Environ. Microbiol.* **11**, 762–778 (2009).
35. Elliott, G. N. *et al.* *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen *ex planta*. *New Phytol.* **173**, 168–180 (2007).
36. Lodeiro, A. R., López García, S., Mongiardini, E., Quelas, J. I. & Petricari, A. *Los*

*rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación simbiótica de nitrógeno.* (2003).

37. Gage, D. J. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 280–300 (2004).
38. Stokkermans, T. J. *et al.* Structural requirements of synthetic and natural product lipo-chitin oligosaccharides for induction of nodule primordia on Glycine soja. *Plant Physiol.* **108**, 1587–95 (1995).
39. Caetano-Anolles, G. & Gresshoff, P. M. Plant Genetic Control of Nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 345–382 (1991).
40. Perret, X., Staehelin, C. & Broughton, W. J. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 180–201 (2000).
41. Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E. & Graham, C. How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. *October* **5**, 619–633 (2009).
42. Lodwig, E. & Poole, P. Metabolism of Rhizobium bacteroids. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **22**, 37–78 (2003).
43. White, J., Prell, J., James, E. K. & Poole, P. Nutrient Sharing between Symbionts. *Plant Physiol.* **144**, 604–614 (2007).
44. Fabiano, E. & Arias, A. Identification of inoculant strains and naturalized populations of Rhizobium leguminosarum bv trifolii using complementary methodologies. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 121–126 (1990).
45. Monza, J., Fabiano, E. & Arias, A. Characterization of an indigenous population of rhizobia nodulating Lotus corniculatus. *Soil Biol. Biochem.* **24**, 241–247 (1992).
46. Amarelle, V. *et al.* A new small regulatory protein, HmuP, modulates haemin acquisition in Sinorhizobium meliloti. *Microbiology* **156**, 1873–1882 (2010).
47. Rosconi, F. *et al.* Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte Herbaspirillum seropedicae. *Environ. Microbiol.* **15**, 916–927 (2013).
48. Platero, R., De Lorenzo, V., Garat, B. & Fabiano, E. Sinorhizobium meliloti fur-like (Mur) protein binds a fur box-like sequence present in the mntA promoter in a manganese-responsive manner. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4832–4838 (2007).
49. Taulé, C. *et al.* The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (Saccharum officinarum L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. *Plant Soil* **356**, 35–49 (2012).
50. Mareque, C., Taulé, C., Beracochea, M. & Battistoni, F. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (Sorghum bicolor (L) Moench). *Ann. Microbiol.* **65**, 1057–1067 (2015).
51. Krause, A., Bischoff, B., Miché, L., Battistoni, F. & Reinhold-Hurek, B. Exploring the Function of Alcohol Dehydrogenases During the Endophytic Life of Azoarcus

- Sp. Strain BH72. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **24**, 1325–1332 (2011).
52. Ríos Mendaro, C. Estudio de bacterias simbiotes de leguminosas nativas. Aportes para la conservación de la biodiversidad en un área protegida de Uruguay. (Facultad de Ciencias, UDELAR, 2014).
  53. Lagurara, P. Caracterización fenotípica de rizobios presentes en el parque Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay. (Facultad de Ciencias, UDELAR, 2014).
  54. Zabaleta, M. Conservación de Leguminosae nativas y sus bacterias simbióticas del Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay. (PEDECIBA-Biología, 2013).
  55. De Meyer, S. E. *et al.* High-quality permanent draft genome sequence of the parapiptadenia rigida-nodulating cupriavidus sp. Strain UYPR2.512. *Stand. Genomic Sci.* **10**, 1–8 (2015).
  56. Iriarte, A. *et al.* Insight into the evolution of symbiosis in the Cupriavidus genus. (2016).
  57. Taulé, C. *et al.* New betaproteobacterial Rhizobium strains able to efficiently nodulate Parapiptadenia rigida (Benth.) Brenan. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1692–1700 (2012).
  58. Facultad de Ciencias - UdelaR Licenciatura en Bioquímica Análisis de Cupriavidus aislados de mimosas nativas de Uruguay Laura Sandes Bufano Tutora : Elena Fabiano Cotutor : Raúl Platero. (2015).
  59. Pérez-Pantoja, D., De la Iglesia, R., Pieper, D. H. & González, B. Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium Cupriavidus necator JMP134. **32**, 736–794 (2008).
  60. Martens, M. *et al.* Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: A case study using 10 housekeeping genes in the genus Ensifer (including former Sinorhizobium). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 200–214 (2008).
  61. Young, J. M. A. & Park, D. Relationships of plant pathogenic enterobacteria based on partial atpD , carA , and recA as individual and concatenated nucleotide and peptide sequences. **30**, 343–354 (2007).
  62. Versalovic, J. & Schneider, M. Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. *Methods Mol. Cel. Biol.* 25–40 (1994). doi:10.1128/JCM.43.1.199-207.2005
  63. Johnson, M. *et al.* NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* **36**, 5–9 (2008).
  64. Tamura, K. *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739 (2011).
  65. Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. & Bruijn, F. J. D. E. Specific Genomic Fingerprints of Phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas Pathovars and Strains Generated with Repetitive Sequences and PCR. **60**, 2286–2295 (1994).

66. Skoal, R. & Michener, C. *A statistical method for evaluating systematic relationships*. (1958).
67. Nautiyal, C. S. An eficiente microbiological growth médium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**, 265–270 (1999).
68. Richardson, A. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**, 897–906 (2001).
69. Avakayan, Z. ., Pivovarova, T. . & Shinner, F. Properties of a new species, *Bacillus mucilaginosus*. *Mikrobiologiya* 477–482 (1986).
70. Schwyn, B. & Neilands, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Anal. Biochem.* **160**, 47–56 (1987).
71. Kraiser, T., Ledger, T., Zu, A., Gonza, B. & Pe, D. Aromatic compounds degradation plays a role in colonization of *Arabidopsis thaliana* and *Acacia caven* by *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134. (2011). doi:10.1007/s10482-011-9685-8
72. Vincent, J. M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. in *International Biological Pro- gramme Handbook*. Blackwell Scientific 73–97 (1970).
73. Amadou, C. *et al.* comparative genomics of rhizobia Genome sequence of the *β*-rhizobium *Cupriavidus taiwanensis* and comparative genomics of rhizobia. 1472–1483 (2008). doi:10.1101/gr.076448.108
74. da Silva, K. *et al.* *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. *Syst. Appl. Microbiol.* **35**, 175–182 (2012).
75. Rossello-Mora, R. & Amann, R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* **25**, 39–67 (2001).
76. Prakash, O. *et al.* Polyphasic approach of bacterial classification - An overview of recent advances. *Indian J. Microbiol.* **47**, 98–108 (2007).
77. Ferguson, B. J., Lin, M. H. & Gresshoff, P. M. Regulation of legume nodulation by acidic growth conditions. *Plant Signal. Behav.* **8**, (2013).
78. Lagares, A. *et al.* A consolidated analysis of the physiologic and molecular responses induced under acid stress in the legume-symbiont model-soil bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Sci. Rep.* **6**, 1–18 (2016).
79. Gopalakrishnan, S. *et al.* Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech* **5**, 355–377 (2015).
80. Graham, P. H. *et al.* Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* , and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can. J. Microbiol.* **40**, 198–207 (1994).
81. Muglia, C. I., Grasso, D. H. & Aguilar, O. M. *Rhizobium tropici* response to acidity involves activation of glutathione synthesis. *Microbiology* **153**, 1286–1296 (2007).
82. Yadav, B. K. & Verma, A. Phosphate Solubilization and Mobilization in Soil

Through Microorganisms Under Arid Ecosystems. *Funct. Ecosyst.* 332 (2007).  
doi:10.5772/2661

83. Caballero-Mellado, J., Onofre-Lemus, J., Estrada-De Los Santos, P. & Martínez-Aguilar, L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing Burkholderia species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 5308–5319 (2007).
84. Alexander, D. B. & Zuberer, D. A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* **12**, 39–45 (1991).
85. Gadd, G. M. Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* **156**, 609–643 (2010).