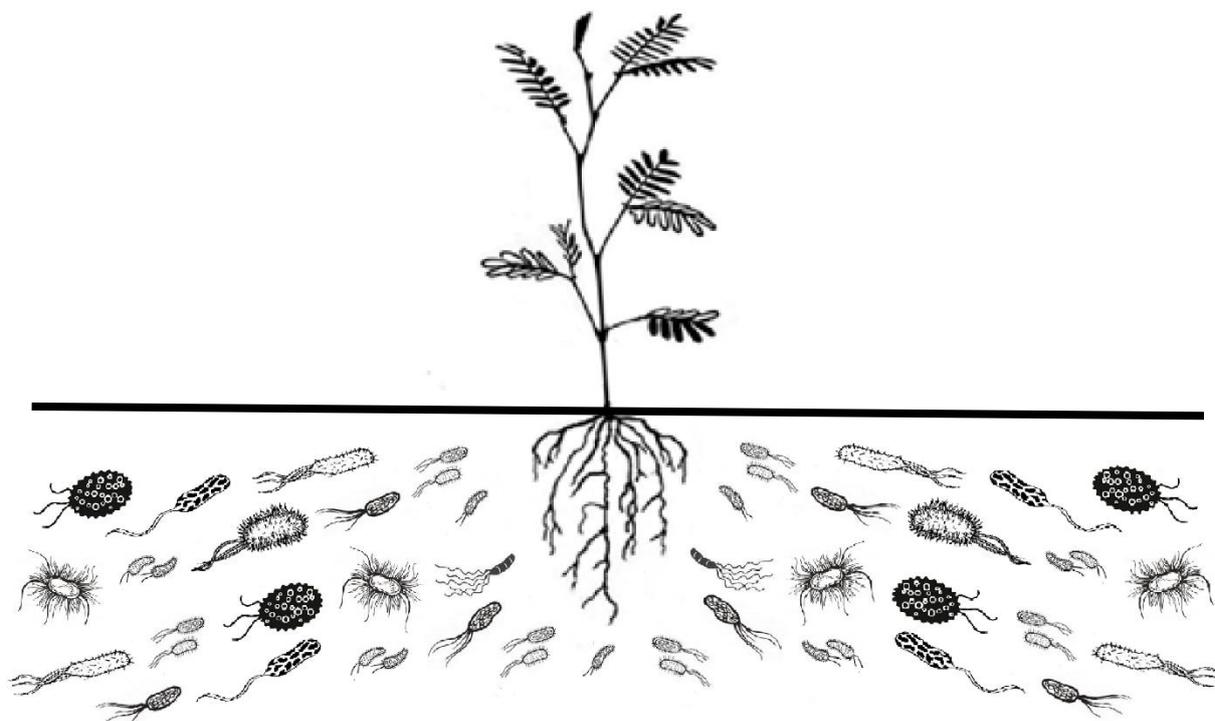


Tesina para optar al título de Licenciado en Biología

Efecto del tipo de suelo en la selección de rizobios simbiotes por *Mimosa* spp. del Uruguay



Bach. Ignacio Eastman

Tutor: Dr. Raúl Platero

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

Montevideo, Uruguay

2020

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecerle a Rufo por haberme dado esta oportunidad, por dejarme entrar a este grupo y por siempre darme para adelante en todo este tiempo.

También quiero agradecer especialmente a Nicole y a la Rubia, que siempre me dieron una mano cuando las necesitabas y con las que tuve largas horas en el laboratorio, trabajando y riendo.

Además, quiero agradecer a Lu, Mati, Vero, Caro, Angi y todos los del labo, por aceptarme e incluirme en su grupo, por darme una mano siempre que los necesite, por los almuerzos, charlas, campeonatitos de la FUBE y por todo.

A los amigos que me dio la facultad (la Facción), que si no fuera por ellos todavía seguía luchando con materias de primero. Que me bancaron en todo este tiempo y me dieron para adelante siempre, aunque me hicieron perder muchas clases por jugar al truco y al ping pong. Sobre todo, a la última en ingresar al grupo, a Emma que no solo me banco en todo esto, sino que también fue correctora, tutora, novia y más.

A mis amigos de la vida, que no los nombro porque la lista de apodos es poco seria para esta o cualquier tesis, pero que sin ellos no sería la persona que soy ahora.

A mis compañeros del Yagua, Hueveros, Waffles y KGB, gente que han pasado todo este tiempo y los que me distrajerón de todas estas responsabilidades.

También quiero agradecerles a todos los que me ayudaron en mi carrera hasta aquí, desde los profesores, hasta el Coya, Alejandra y Pablo, que me enseñaron que es ser un verdadero científico.

Por último, a mi familia que como buenos Eastman siempre me apoyaron y me dieron para adelante, y especialmente a Guille, que me aconsejó en todo este camino, aunque muchas veces no te haya hecho caso (y me haya salido mal).

¡Muchas gracias a todos!

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Leguminosas.....	2
Leguminosas Nativas	3
Género <i>Mimosa</i>	4
Rizobios	4
Fijación Biológica de Nitrógeno	6
Generalidades	6
Nitrogenasa	7
Estructura.....	8
Función	10
Evolución	10
Interacción Rizobio-Leguminosa	11
Flavonoides y factores Nod	11
Proceso de infección	13
Competencia entre Rizobios	15
Antecedentes.....	18
Objetivos.....	19
Materiales y Métodos.....	20
Cepas bacterianas	20
Procesamiento de semillas.....	20
Ensayos de nodulación y promoción del crecimiento vegetal	21
Ensayo de competencia en tubo	21
Procesamiento de nódulos	22
Caracterización genética	22
Lisados bacterianos.....	22
Técnica de rep-PCR	22
Ensayo de competencia en maceta.....	24
Análisis estadístico.....	24
Medición de pH de los sustratos.....	24
Resultados.....	26
Confirmación de simbiosis	26
Promoción de crecimiento vegetal.....	27
Tamaño de la parte aérea.....	27
Peso seco de la parte aérea	28
Número de nódulos	29
Ensayos de competencia	30
Ensayo de competencia en tubo.....	30
Ensayo de competencia en maceta	32

Caracterización de los sustratos.....	33
Discusión	34
Conclusiones y Perspectivas	40
Anexo	41
Medios de cultivo y soluciones	41
Geles de electroforesis.....	43
Bibliografía.....	47

Índice de Figuras

Figura 1. Reconstrucciones filogenéticas de organismos diazótrofos.....	7
Figura 2. Esquema de las subunidades de la Mo- Nitrogenasa.....	9
Figura 3. Representación de los cofactores de la Mo-Nitrogenasa.....	9
Figura 4. Estructura de factores Nod.....	12
Figura 5. Esquema del proceso de infección de los rizobios	14
Figura 6. Morfología de las cepas utilizadas	22
Figura 7. Visualización del patrón de bandas obtenido por rep-PCR de las cepas control (B4 y C2).....	23
Figura 8. Representación del ensayo de nodulación y promoción de crecimiento.....	26
Figura 9. Medición de la parte aérea.....	28
Figura 10. Tamaño de la parte aérea de las plántulas en función del género bacteriano inoculado	28
Figura 11. Peso de la parte aérea de las plántulas en función del género bacteriano inoculado	29
Figura 12. Morfología de las colonias de las cepas utilizadas en los ensayos de competencia	31
Figura 13. Gel de agarosa 1% del rep-PCR obtenido del ensayo de competencia.....	31
Figura 14. Visualización del ensayo de competencia en macetas.....	32

Índice de Tablas

Tabla 1. Cepas estudiadas en el ensayo de confirmación de rizobios	20
Tabla 2. Tabla de cebadores	23
Tabla 3. Condiciones estudiadas en el ensayo de competencia en macetas.....	24
Tabla 4. Resultados del ensayo de nodulación.....	27
Tabla 5. Tamaño y número de nódulos obtenidos en el ensayo de nodulación	29
Tabla 6. Resultado del ensayo de competencia en macetas	32
Tabla 7. pH de los sustratos empleados en el ensayo de competencia	33

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Estequiometría de la reacción catalizada por la enzima nitrogenasa.....	10
--	----

Resumen

El género *Mimosa*, perteneciente a la familia de las leguminosas, está compuesto por cerca de 450 especies que se distribuyen naturalmente desde el sur de EEUU hasta el Uruguay. En Uruguay existen cerca de 50 especies de mimosas nativas, constituyendo un centro de biodiversidad y a su vez, un límite de distribución para el género. La mayor parte de *Mimosa* spp. estudiadas hasta la fecha se encuentran asociadas simbióticamente con rizobios de la familia betaproteobacterias. En nuestro país la mayor parte de ellas se encuentran noduladas por rizobios del género *Cupriavidus*, aunque también se han encontrado del género *Paraburkholderia*. Durante esta asociación, los rizobios son capaces de transformar el nitrógeno atmosférico en amonio, mediante un proceso conocido como fijación biológica del nitrógeno (FBN). Este proceso es un factor determinante para el crecimiento vegetal, ya que el nitrógeno es un elemento esencial para la planta. La efectividad en la FBN depende en gran medida de la cepa bacteriana simbiote y, por lo tanto, su promoción de crecimiento vegetal.

En este trabajo nos preguntamos cuál es el rol del suelo en el establecimiento de la simbiosis entre betarizobios y mimosas nativas. Para responder esta pregunta, se utilizaron rizobios obtenidos de un ensayo realizado previamente en el laboratorio, en el cual se sembraron semillas de mimosas nativas en suelos de nuestro país con características contrastantes.

Se seleccionaron cepas de rizobios de la colección del laboratorio para su caracterización simbiótica. Durante este trabajo se confirmó la capacidad de las cepas seleccionadas de nodular la planta modelo *Mimosa pudica* y se caracterizó la promoción de crecimiento asociada. Los rizobios pertenecientes al género *Cupriavidus* fueron los más eficientes, mientras que los correspondientes al género *Paraburkholderia* y *Rhizobium* no generaron promoción de crecimiento asociada. Se seleccionaron dos cepas, una perteneciente al género *Cupriavidus* y otra al género *Paraburkholderia*, para realizar ensayos de competencia tanto en tubos como en macetas, empleando como modelo a *M. uragüensis*. Ambas cepas pudieron nodular con esta planta, pero la cepa de *Cupriavidus* mostró una tendencia para inducir la formación de nódulos más rápidamente. Sin embargo, al realizar el tratamiento de competencia, en el cual las plantas fueron co-inoculadas, la cepa de *Paraburkholderia* fue recuperada de todos los nódulos extraídos. No se obtuvieron datos concluyentes a partir de la planta modelo *M. pilulifera* para ninguno de los dos ensayos de competencia. Finalmente, se realizaron ensayos en maceta conteniendo suelos provenientes del Abra de Zabaleta (alto contenido de arcillas) y Playa El Calabrés (alto contenido de arena), inoculados con las cepas individualmente como coinoculado con ambas. Sorprendentemente en ambas suelos la cepa de *Cupriavidus* mostró ser la más competitiva, recuperándose en la mayor parte de los nódulos analizados.

Los resultados obtenidos indican que, la cepa del género *Cupriavidus* analizada está más adaptada para establecer una relación simbiótica con la planta modelo *M. uragüensis* en condiciones complejas como son los suelos de la playa El Calabrés o del Abra de Zabaleta. Mientras que en condiciones controladas y usando un sustrato inerte (ensayo en tubo), la cepa del género *Paraburkholderia* fue la más competente. Esto sugiere que no hay una capacidad intrínseca de los rizobios pertenecientes a determinado género de ser más competente que otro, sino que su competitividad va a depender de las condiciones en las cuales se desarrolla esta interacción.

Introducción

Leguminosas

Los miembros de la familia *Fabaceae* comúnmente conocidos como leguminosas, son fácilmente reconocidas por su fruto (legumbre) y su hoja compuesta y estipulada. Esta familia de plantas angiospermas, está compuesta por 751 géneros y 19500 especies conocidas, es la tercera familia más diversa de las plantas con flor, solo superada por *Orchidaceae* y *Asteraceae* (Lewis et al., 2013; The Legume Phylogeny Working Group (LPWG), 2013). Presenta distribución cosmopolita, con capacidad de crecer en condiciones climáticas muy diversas, su distribución abarca regiones tropicales, subtropicales y templadas. Además, se encuentran en una variedad de condiciones edáficas, como una gran diversidad de ambientes terrestres y acuáticos (Velazquez et al., 2010). Respecto a su morfología, presentan estructuras muy variadas reflejando su gran diversidad de géneros y especies, donde se pueden encontrar desde árboles de gran porte, arbustos, pequeñas hierbas a plantas rastreras como trepadoras (Izaguirre, 2003).

Esta familia se originó en África, hace unos 120 millones de años aproximadamente, desde donde se dispersó tempranamente a Sudamérica y posteriormente a Asia, esto se ve reflejado en la mayor diversidad de géneros en estos continentes (Stevens et al., 2001).

Históricamente se ha clasificado a la familia *Fabaceae* en tres subfamilias: *Faboideae* (o *Papillioideae*), *Mimosoideae* y *Caesalpinioideae*, diferenciándolas morfológicamente. Sin embargo, con las nuevas técnicas de filogenias moleculares, se ha podido reconstruir fielmente su parentesco. The Legume Phylogeny Working Group (LPWG) encontró que las especies clasificadas como *Fabaceae* son un grupo monofilético y las reclasificó en seis subfamilias: *Cercidoideae*, *Detarioideae*, *Duparquetioideae*, *Dialioideae*, *Caesalpinioideae* y *Faboideae*. Entre las modificaciones más relevantes que se realizaron, se generaron cuatro subfamilias nuevas a partir de *Caesalpinioideae*, las restantes *Caesalpinioideae* se fusionaron con *Mimosoideae*, manteniéndose esta última como un clado dentro de la subfamilia *Caesalpinioideae* (LPWG, 2017). Al no haberse formalizado los cambios en la nomenclatura de dicha familia, continuaremos utilizando la clasificación anterior, basada en las tres subfamilias nombradas.

Se ha observado que las leguminosas generan relaciones simbióticas mutualistas con bacterias de suelo conocidas como rizobios. Durante la simbiosis, se producen nuevas estructuras características en las raíces de las plantas, denominados nódulos, en los cuales estas bacterias son capaces de transformar el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_4), en un proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Andrews et al., 2017). Se cree que la capacidad de las leguminosas de asociarse con rizobios, contribuiría a explicar la extensa distribución de esta familia (Martínez-Romero, 2009). A partir del estudio de 3400 especies de leguminosas aproximadamente, que representan el 57% de sus géneros, se observó que el porcentaje de especies susceptibles a ser noduladas varía mucho entre las subfamilias, es aproximadamente de un 25% en *Caesalpinioideae*, 90% en *Mimosoideae* y 97% en *Faboideae*, (Azcón-Bieto et al., 2003, Mckhann et al., 1994). La presencia y ausencia de especies nodulantes en las tres subfamilias indica que la nodulación surgió varias veces durante

la evolución de las leguminosas y que se ha perdido en algunos linajes (Lloret et al., 2005).

Las leguminosas tienen una gran importancia económica, fueron de los primeros cultivos domesticados por el hombre, de acuerdo con los restos arqueológicos que muestran la producción de garbanzos y lentejas, que se remontan al 7000-8000 a.C. en Anatolia (Turquía) (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2006). Económicamente, en la actualidad representan la segunda familia más importante a nivel mundial, solo superada por la familia *Poaceae*, que incluye los cereales. Son una importante fuente de proteína y energía tanto para el ser humano como para los animales, además, se utilizan para la producción de madera, gomas, productos medicinales, entre otros usos (Javaloyes, 2016). Por otro lado, tienen una gran importancia ecosistémica, estableciendo importantes relaciones con animales herbívoros, hormigas, larvas de escarabajos, etc. (Rico-Gray et al., 2007, Kergoat, 2011, Mackay, 2010).

Otra característica muy importante de esta familia, está dada por su utilización en los cultivos de rotación y como recuperadores de suelo, ya que están adaptados a suelos pobres. Estas plantas aportan muchos nutrientes al sustrato una vez que la planta muere, entre ellos, parte del nitrógeno que fijó de la atmósfera a través de sus nódulos. Esto contribuye a mejorar las condiciones fisicoquímicas y la biodiversidad del suelo, y dados los recursos limitados de la energía fósil y la creciente preocupación sobre el ambiente, el potencial de las leguminosas en su rol como fuente de nitrógeno en los sistemas de cultivo es cada vez más valorado (Rubiales et al. 2015, Pankievicz et al., 2019).

Leguminosas Nativas

La subfamilia de *Caesalpinioideae* se caracteriza, dentro de esta familia, por el predominio de elementos arbóreos o arbustos, trepadoras leñosas y pocos elementos herbáceos. Esta familia abunda en regiones tropicales y subtropicales, pero se ha adaptado a hábitat xéricos y climas templados. Está compuesta por 160 géneros y aproximadamente 1900 especies, de los cuales los géneros más representados son *Senna* (con 350 especies), *Chamaecrista* (265) y *Caesalpinia* (100 especies). En Uruguay se han contabilizado diez géneros con 28 entidades taxonómicas, al igual que se observa a nivel mundial, los géneros predominantes en nuestro país son *Senna*, *Caesalpinia* y *Chamaecrista* (Izaguirre, 2003; Polhill, 1981).

En cuanto a la subfamilia *Mimosoideae*, se subdivide en más de 50 géneros, pero la mayoría de las especies pertenecen a tres géneros que son: *Acacieae* (1200 especies, aproximadamente), *Mimoseae* (450 especies aprox.) e *Ingeae* (más de 400 especies). Esta subfamilia se distribuye desde regiones tropicales a templadas y excepcionalmente a regiones frías. Al igual que *Caesalpinioideae*, contiene especímenes arbóreos o arbustos, trepadoras leñosas y pocos elementos herbáceos. Respecto a nuestro país, los tres géneros que acumulan el mayor número de especies dentro de la subfamilia *Mimosoideae* son los que se encuentran más representados. Excepto que el género *Mimoseae* es el más abundante en Uruguay, con 50 entidades descritas (Izaguirre, 2003; Izaguirre et al., 2009).

Finalmente, la subfamilia *Papilionoidea* (*Faboideae*), es la más diversa dentro de las leguminosas, con unos 450 géneros, aproximadamente, y más de 12000 especies. Esta diversidad también se muestra en su distribución y morfología, ya que comprende la

distribución más amplia dentro de la familia, aunque se concentran principalmente en regiones cálidas, y tienen una gran diversidad de formas y tamaños, abarcados todos los nombrados anteriormente. En nuestro territorio se han descrito 56 géneros con 201 especies, de las cuales 130 son nativas y 71 son adventicias. Los géneros más representados en Uruguay son *Adesmia*, *Vicia*, *Lathyrus*, entre otros (Izaguirre, 2003).

Género *Mimosa*

Mimosa es el género más antiguo dentro de la subfamilia *Mimosoideae* y el segundo género más diverso, con 450 especies aproximadamente, solo superado por el género *Acacieae*. Es un género principalmente americano, ya que el 90% de sus especies se encuentran en este continente, con el 10 % restante distribuido en África, Asia y Australia. Tiene una distribución principalmente tropical y subtropical, donde posee centros de diversificación en México y el Planalto de Brasil, aunque penetra regiones templadas llegando al sur de Estados Unidos y a nuestro territorio (Camargo-Ricalde et al., 2015).

La mayoría de las especies de este género presentan hojas bipinnadas y ramas con cerdas o espinas. Las inflorescencias esta formadas por pequeñas flores bisexuales, globosas, de diferentes colores (rosadas, blancas, etc.), normalmente axilares o en racimos. Se pueden encontrar diferentes morfologías dentro de este género, desde árboles pequeños (3 a 10 metros de altura) como *M. aculeaticarpa*, distintos tipos de arbustos (decumbente, erguido y trepadores) a hierbas anuales como *M. ursina* (Grether et al., 2015). Con su gran diversidad de morfologías, se han usado con múltiples funciones, como forrajeras, medicinales, combustibles, melíferas, en la construcción, ornamentales, entre otras utilidades (Camargo-Ricalde et al., 2015).

Este género siempre ha llamado la atención de las personas y la comunidad científica, por la característica de algunas de sus especies de poder reaccionar ante ciertos estímulos, cerrando rápidamente sus hojas al ser tocadas, o levantar sus hojas durante el día y bajarlas por la noche. Recientemente han vuelto al ser el foco de atención debido a que, en muchos casos, se ha reportado que bacterias pertenecientes a los géneros *Paraburkholderia* y *Cupriavidus* son capaces de formar asociaciones simbióticas con dichas plantas, registrándose esta relación en mimosas en todos los continentes (Grether et al., 2015; Franche et al. 2009; Garabato, 2018; Sandes, 2015; Ríos Mendaro, 2014).

Rizobios

El filo *Proteobacteria*, del dominio *Bacteria*, es uno de los más abundante y diverso dentro de este dominio, y es el filo al que pertenecen mayoritariamente los rizobios. Se divide en seis subfilos denominados con las letras griegas α , β , γ , δ , ϵ y ζ , de los cuales los rizobios pertenecen al grupo de las α y β *Proteobacteria*.

Los rizobios son organismos diazotrofos del suelo, esto quiere decir que son capaces de transformar el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_4^+) (diazó = dos nitrógenos, trofo = alimentación), en un proceso conocido como FBN. Lo que distingue a los rizobios del resto de los organismos diazotrofos y por lo que son los más estudiados entre ellos, es que realizan este proceso principalmente en asociación con leguminosas, estableciendo una relación simbiótica con estas.

Los rizobios son bacterias del suelo, bacilos, Gram negativas, que no forman esporas y sus colonias generalmente tienen un aspecto mucilaginoso. Mayoritariamente presentan metabolismo aerobio heterótrofo y son capaces de utilizar gran variedad de azúcares como fuente de carbono (Azcón-Bieto et al., 2003). Al interactuar con la planta, ésta genera como respuesta una estructura característica denominada nódulo, el cual se desarrolla en el córtex radicular y excepcionalmente en el tallo de muchas leguminosas y singularmente con no leguminosas, como *Parasponia*, miembro de la familia *Ulmaceae* (Franche et al. 2009). En esta estructura se da el ambiente propicio para la FBN, se dan los intercambios de nutrientes y amonio entre la planta y el rizobio (Azcón-Bieto et al., 2003). Los rizobios se caracterizan por tener 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, son móviles ya que presentan un flagelo polar o subpolar, o de dos a seis flagelos peritricos. Además, pueden usar una gran variedad de fuentes de carbono y en su mayoría son incapaces de fijar N₂. Mientras que, en el interior de los nódulos, se diferencian a bacteroides, donde tienen generalmente una forma irregular, son inmóviles, capaces de fijar N₂ y sólo pueden utilizar ácidos dicarboxílicos como succinato y malato como fuente de carbono (Fernandez-Pascual et al. 2002).

Al principio, los investigadores comenzaron a clasificar a los rizobios por sus características morfológicas y por la especie de leguminosa con la que nodulaban. Rápidamente se vio que esto era insuficiente, debido a la promiscuidad simbiótica que presentan muchos de los rizobios, esto significa que una misma especie de rizobio puede establecer relaciones simbióticas con más de una especie de leguminosa. Se observó que la promiscuidad simbiótica está ampliamente distribuida en la naturaleza, y no está asociada a bacterias particulares o a grupos taxonómicos de plantas en específico, aunque sí se puede afirmar que las bacterias y plantas promiscuas se encuentran mayormente en zonas cálidas o tropicales del mundo (Perret et al., 2000). Más recientemente, mediante los análisis filogenéticos basados en la secuencia del gen *rrs* (subunidad ribosomal menor [ARNr 16S]), se generó un análisis mucho más robusto, profundizando el conocimiento de las relaciones filogenéticas de los rizobios.

La interacción entre rizobios y leguminosas fue descrita principalmente en las bacterias pertenecientes a las α -*Proteobacterias*, en la cual se identificaron siete géneros: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium* y *Devosia* (Lloret et al., 2005, Franche et al. 2009). Pero recientemente se ha identificado que los géneros *Paraburkholderia* y *Cupriavidus*, pertenecientes a las β -*Proteobacteria*, son capaces de nodular a leguminosas, especialmente al género *Mimosa* (Angeles, 2010, Moulin et al., 2001, Chen et al., 2001). Estos dos géneros no se conocían por esta capacidad, el género *Cupriavidus*, por ejemplo *C. necator*, era conocido como un predador no obligado de bacterias y hongos del suelo, mientras que la familia *Burkholderiaceae* era estudiada por tener representantes patógenos (Bontemps, et al., 2010). Además, recientemente se creó un nuevo género dentro de la familia *Burkholderiaceae*, llamado *Trinickia*, el cual agrupa especies simbiotes de leguminosas, las que antes pertenecían todas al género *Paraburkholderia* (Estrada-de los Santos, et al., 2018). Por lo tanto, actualmente se reconocen tres géneros dentro de las β -*Proteobacterias* que tienen especies de rizobios; *Paraburkholderia*, *Cupriavidus* y *Trinickia*.

Fijación Biológica de Nitrógeno

Generalidades

El nitrógeno es uno de los elementos más abundantes en la naturaleza, se encuentra en la biomasa y el suelo, es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, en las cuales es el cuarto elemento más abundante. Este elemento forma parte de moléculas imprescindibles para la vida, como son los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hormonas y clorofilas (Azcón-Bieto et al., 2003). En la atmósfera es donde se encuentra en mayor abundancia, encontrándose como N_2 y representando aproximadamente el 78% de ésta. Este nitrógeno molecular atmosférico es una molécula muy estable y poco reactiva, debido al triple enlace que une a los átomos de nitrógeno, de una manera muy rígida y planar.

Este elemento se encuentra disponible en el suelo en diferentes estados de oxidación, el nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+) son las principales formas en que las plantas lo pueden absorber y asimilar. Se estima que la cantidad de nitrógeno incorporado al suelo por año es de unas 275 millones de toneladas a nivel mundial. De éstas, 30 millones son producto de la oxidación del N_2 a ácido nítrico, provocada por las descargas eléctricas de las tormentas. Una gran cantidad de nitrógeno se fija mediante el proceso industrial de Harber-Bosch, este proceso 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; amonio que posteriormente va a ser oxidado para formar fertilizantes como el nitrato de amonio. Sin embargo, la mayor fijación del nitrógeno atmosférico se debe a organismos diazotrofos mediante la FBN, que incorporan unas 50–465 kg/ha/año lo que equivale a un 80% de la fijación total (Fernandez-Pascual et al. 2002, Miller et al., 2005).

Las leguminosas tienen una importancia ecológica y agronómica muy grande, debido a que son responsables de una parte sustancial del flujo global de nitrógeno, ya que una gran proporción de éste es fijada por los rizobios asociadas a ellas (Crews et al., 2004). Además, la fijación de nitrógeno por hectárea producida por leguminosas asociadas simbióticamente con rizobios, es mucho mayor que para cualquier otro organismo del suelo en vida libre (Sprent, 1979). Es importante destacar que nos referimos a organismos del suelo, ya que la fijación que ocurre en los océanos y mares es muy grande y tiene igual o mayor importancia en el ciclo de este elemento (Wang et al., 2019).

La incorporación de leguminosas a sistemas de rotación con otros cultivos, ofrece una práctica sustentable y amigable con el medio ambiente. En contrapartida, la utilización de fertilizantes se ha asociado a numerosos problemas ambientales, no solo debido al alto costo energético para su producción (con un alto consumo de combustibles fósiles), sino también por causar eutrofización de ríos y mares, contaminación de aguas subterráneas y el adelgazamiento de la capa de ozono (contribuyendo al calentamiento global) (Sprent, 1979).

La FBN es un proceso exclusivo de bacterias y arqueas (**Figura 1**), los organismos que realizan este proceso no son exclusivamente rizobios, hay una gran cantidad de organismos que lo realizan en vida libre. Además, existen organismos que no son rizobios pero que pueden generar una relación simbiótica similar. Un ejemplo de esto son las cianobacterias, que pueden formar una relación simbiótica con tejidos de plantas hepáticas, helechos, cícadras y dicotiledóneas. O como *Frankia*, perteneciente al filo *Actinobacteria*, que forma nódulos con muchas plantas no leguminosas de varias

familias, que incluyen a los géneros *Alnus* y *Prusia* (Azcón-Bieto et al., 2003; Meeks, et al., 2017)

A.

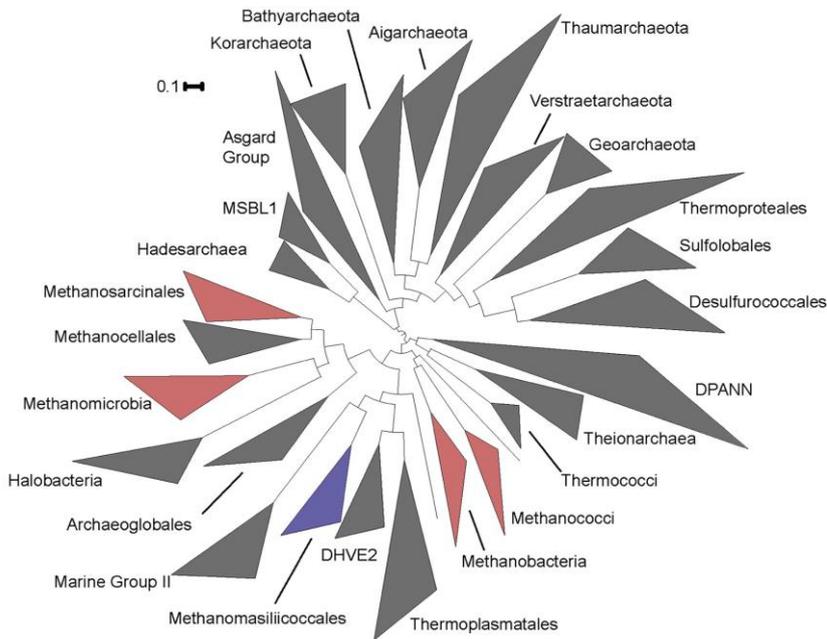
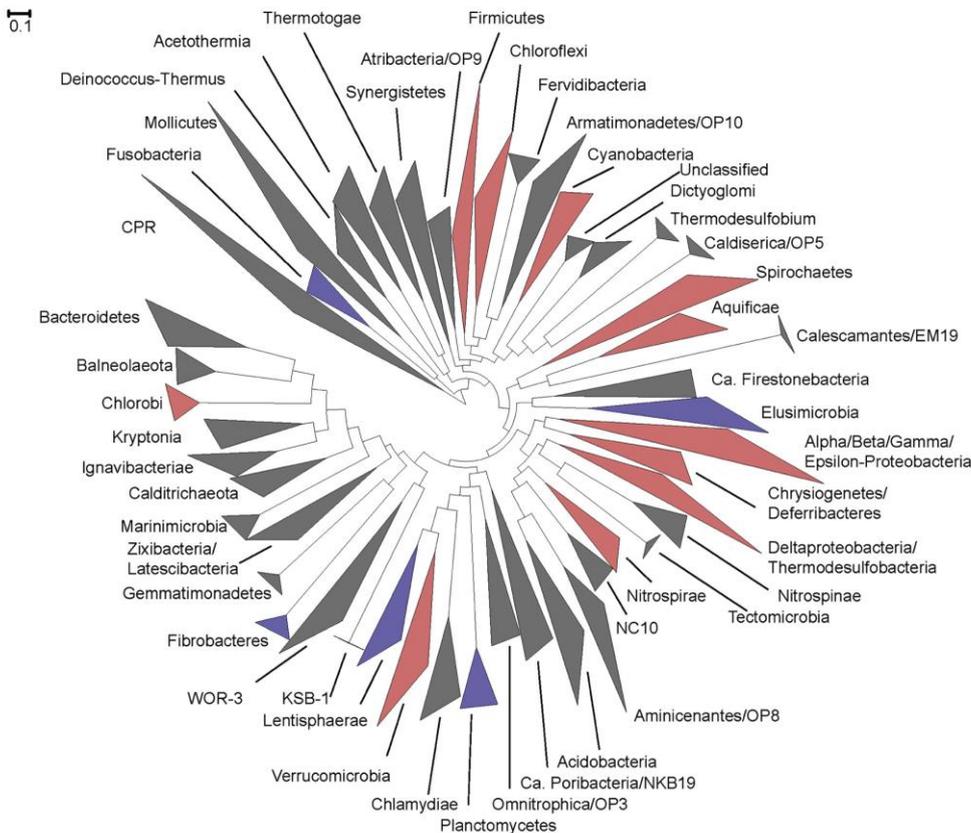


Figura 1. Reconstrucciones filogenéticas de organismos diazotrofos. Filogenia realizada por máxima verosimilitud, utilizando entre treinta y un a ciento cuatro genes codificantes de proteínas, y se presentan como visualizaciones no enraizadas. Se muestran en “A” grupos de nivel de dominio *Arquea* y en “B” grupos del dominio *Bacteria*, los grupos se colapsan como triángulos con las designaciones taxonómicas proporcionadas junto a ellos. Los linajes que posean los genes codificantes de la nitrogenasa (NifHDK) se denotan en color gris, los contiene genes homólogos (NifHDK) identificados previamente en color rojo, y los recién identificados se muestran en color azul. La barra de escala muestra el número esperado de sustituciones por sitio. Imagen extraída de Mus et al., 2019.

B.



Si bien es probable que el complejo enzimático responsable de la FBN, complejo de la nitrogenasa, se originó durante un periodo con una atmósfera primitiva reductora, hubo que esperar hasta la aparición de las plantas hace 400 millones de años para que se comenzara a establecer esta interacción entre organismos diazótrofos y plantas. Desde ese momento hasta la actualidad, los linajes de organismos diazótrofos se diversificaron y lograron establecer relaciones simbióticas con algunos linajes específicos de plantas (Lloret et al., 2005).

Nitrogenasa

La nitrogenasa es un complejo enzimático que lleva a cabo uno de los procesos metabólicos más importantes y costosos de la naturaleza; la reducción de una molécula de N_2 a amonio (Raymond et al., 2004, Rubio et al., 2005).

Estructura

Esta enzima está codificada en tres genes, *nifK/H/D*, los cuales codifican para los monómeros de las distintas subunidades. Respecto a *nifH*, codifica para los dos γ monómeros de la Fe proteína (dinitrogenasa reductasa o componente II). Esta proteína de aproximadamente 64 kDa, es un homodímero compuesto además por cuatro átomos de hierro arreglados en un grupo Fe_4S_4 . Por otra parte, *nifD* y *nifK* codifican para las subunidades α y β respectivamente de la MoFe proteína (dinitrogenasa o componente I). Esta es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades α y dos β , que pesa aproximadamente 240 kDa en total, y que contiene además cuatro grupos metálicos, dos cofactores hierro-molibdeno (abreviado FeMo-co por los metales que incluye [Fe y Mo] y su carácter de cofactor [co]) y dos grupos P. Los grupos P se encuentran en la interfase de las subunidades, mientras que los FeMo-co se encuentran al interior de las subunidades α . Estas estructuras están esquematizadas en las **Figuras 2 y 3** (Peters et al., 1995, Hoffman et al., 2013).

Para el ensamblaje completo de nitrogenasa se requiere productos de otros genes *nif*, involucrados en la síntesis del FeMo-co (*nifB*, *nifQ*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifU*, *nifS*, *nifV*, *nifY* y también *nifH*), el ensamblaje de grupos Fe_4S_4 (*nifS* y *nifU*) y la maduración de los componentes de nitrogenasa (*nifW* y *nifZ*) (Franche et al. 2009).

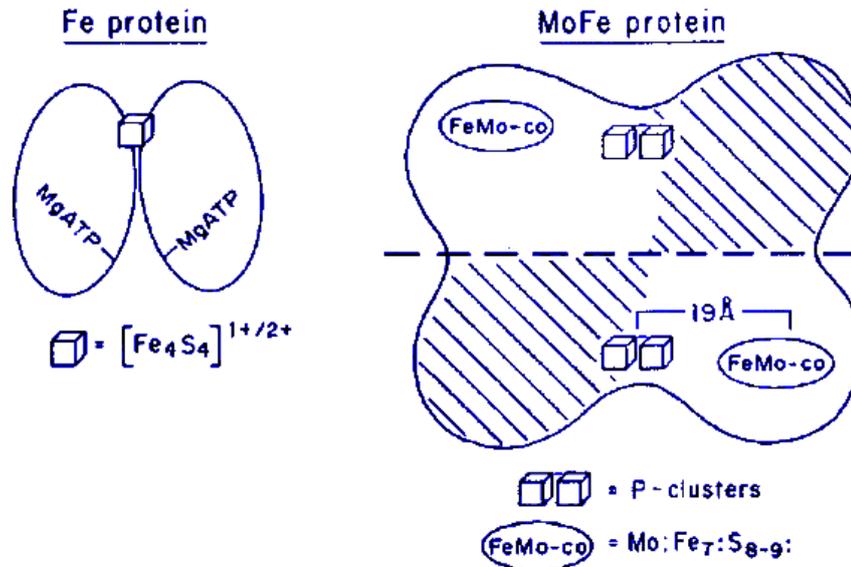


Figura 2. Esquema de las subunidades de la Mo- Nitrogenasa. Se muestran por separado la Fe proteína con sus dos subunidades α y β , unidas por el grupo Fe_4S_4 , y la MoFe proteína con sus dos subunidades α (blancas) y β (rayadas), y sus cofactores (grupo P y FeMo-co). Imagen extraída y modificada Peters et al., 1995

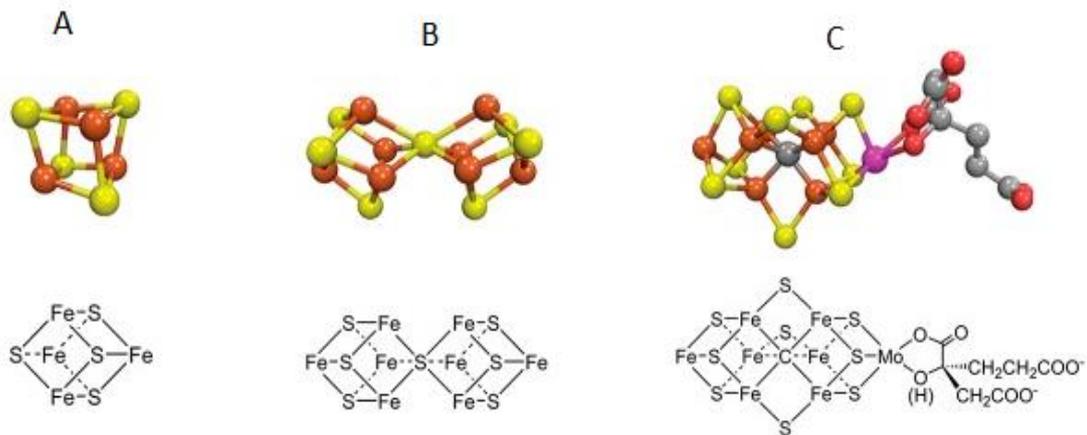
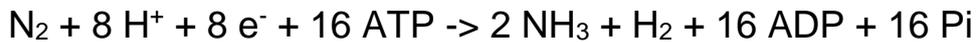


Figura 3. Representación de los cofactores de la Mo-Nitrogenasa. “A” representa al grupo Fe_4S_4 (perteneciente al componente II), “B” al grupo P y “C” representa el cofactor hierro-molibdeno (FeMo-co), ambos presentes en el componente I. Los átomos coloreados de rojo representan al hierro (en “C” también representa al oxígeno), los amarillos al azufre, el gris al carbono y el violeta al molibdeno. Imagen extraída y modificada de Taiz et al., 2010.

Existen tres variantes de nitrogenasas, según los metales que presentan en sus cofactores, siendo la más estudiada, eficiente energéticamente y distribuida entre los rizobios, la molibdeno (Mo) nitrogenasa y la cual describimos anteriormente. Pero existen nitrogenasas alternativas, como la vanadio (V) nitrogenasa y hierro (Fe) nitrogenasa (Rubio et al., 2005). Todas estas enzimas presentan una secuencia aminoacídica muy conservada entre los distintos filos procariontes. No se han encontrado microorganismos que expresan únicamente nitrogenasas alternativas, siempre coexpresan con la Mo-nitrogenasa, por lo que se supone que las nitrogenasas alternativas se expresan cuando es baja la disponibilidad de molibdeno en el medio, para complementar su función (Darnajoux et al., 2019).

Función

Esta enzima está encargada del proceso endergónico más costoso en la naturaleza, con un requerimiento mínimo de energía de 960 kJ, que se obtienen de 16 moléculas de ATP formadas mediante fosforilación oxidativa por la bacteria (Fernandez-Pascual et al. 2002). La ecuación general de esta reacción involucra la reducción de protones (H⁺), la hidrólisis de ATP y requiere tanto transferencia de protones como de electrones, esto se visualiza en la **Ecuación 1**. Pero cuando analizamos paso a paso la reacción, vemos que es de mayor complejidad (Peters et al., 1995, Hoffman et al., 2013).



Ecuación 1. Estequiometría de la reacción catalizada por la enzima nitrogenasa. Aquí se muestra la ecuación balanceada del proceso realizado por la nitrogenasa, en el cual se fija el nitrógeno atmosférico en amonio, extraído de Burgess et al. 1996.

Este proceso comienza con la Fe proteína, ésta media el pasaje de electrones de un agente reductor como la ferredoxina o la flavodoxina a la MoFe proteína; para realizar este proceso acopla la hidrólisis de dos moléculas de ATP. La unión de ATP genera un cambio conformacional que acerca a los cofactores de ambas proteínas, disminuyendo su potencial redox y favoreciendo así esta reacción, al mismo tiempo que la hace más susceptible a la inactivación por oxígeno. Una vez que ocurrió el pasaje de electrones desde el complejo II al complejo I, la Fe proteína oxidada se desacopla, permitiendo que entre otro complejo II reducido para repetir el ciclo. Este proceso debe ocurrir ocho veces para reducir una molécula de N₂ a amonio (Peters et al., 1995, Hoffman et al., 2013).

Respecto a la MoFe proteína, une al N₂ mediante el cofactor FeMo-co, quedando el N₂ unido específicamente al átomo de molibdeno. Luego, mediante el grupo P se transfieren los electrones de la Fe proteína al N₂, el cual se comienza a reducir incorporando protones (H⁺) (Peters et al., 1995, Hoffman et al., 2013).

El modelo cinético de Lowe-Thorneley para la función de nitrogenasa, describe la cinética de transformaciones entre intermediarios catalíticos de la enzima. Durante mucho tiempo, dos propuestas (la vía alternativa y la vía distal) se debatieron para explicar el proceso por el cual se reduce el N₂, invocando diferentes productos intermediarios en este proceso. Recientemente, se ha determinado «la vía alternativa» como la más probable, ganándole la pulseada a la vía distal para explicar este proceso (Taiz et al., 2010). Estos modelos todavía no logran dilucidar todos los aspectos funcionales de esta enzima, una muestra de ésto es la formación de hidrógeno molecular (H₂) en esta reacción. Ésto se debe a las dificultades de estudiar a los intermediarios de esta enzima mediante cristalografía (Peters et al., 1995, Hoffman et al., 2013, Hoffman et al., 2014).

Evolución

El surgimiento y la evolución de este complejo enzimático ha sido una fuente de debate en este último tiempo. Los estudios paleontológicos marcan el origen de la FBN hace unos 3.2 giga años (Ga). Sin embargo, los enfoques de datación filogenética sugieren que este evento no ocurrió hasta aproximadamente 2.1 Ga, dejando un espacio de 1.1 Ga entre las diferentes dataciones. Esta diferencia se puede deber a que el complejo enzimático como lo conocemos pudo surgir a partir de un predecesor que ya tenía una cierta capacidad de realizar este proceso (Mus et al., 2019).

La reconstrucción filogenética de los genes estructurales de la nitrogenasa (*nifHDK*), indica que los primeros organismos capaces de fijación de N₂ fueron ancestros de bacterias termófilas hidrogenotróficas metanogénicas. Este resultado es apoyado por la observación de que la nitrogenasa está evolutivamente relacionada (como parálogo) con enzimas que funcionan en la biosíntesis del cofactor F430, cofactor clave en el metabolismo del metano (Mus et al., 2019). Este resultado no era el esperado, ya que estas bacterias tienen un metabolismo con bajo rendimiento energético, y se esperaba que un proceso tan costoso energéticamente como este, haya surgido en una bacteria con un metabolismo más eficiente, como sería una bacteria fotosintética o heterótrofa.

Finalmente, se consideraba que la Mo-nitrogenasa se originó a partir de las nitrogenasas alternativas, ya que el molibdeno se encontraba en baja concentración en el ambiente en ese momento. Sin embargo, las reconstrucciones filogenéticas indican que las nitrogenasas alternativas se derivan de la Mo-nitrogenasa. Este hallazgo es consistente con la observación de que todos los genomas que codifican para nitrogenasas alternativas también lo hacen para la Mo-nitrogenasa. Además, la biosíntesis de los cofactores metálicos de las nitrogenasas alternativas depende de la maquinaria biosintética de la Mo-nitrogenasa (Mus et al., 2018).

Interacción Rizobio-Leguminosa

Flavonoides y factores Nod

La simbiosis entre leguminosas y rizobios no es obligatoria, aunque en condiciones limitantes de nitrógeno se favorece esta relación mutuamente fructífera. Ambos simbiontes interactúan mediante un elaborado intercambio de señales, las cuales producen un cambio de la expresión génica tanto en el hospedero como en el microsimbionte, generando en ambos los cambios necesarios para producir la infección (Caetano-Anollés et al., 1991). Para que el proceso de infección pueda darse, los rizobios deben colonizar la rizósfera (zona del suelo que rodea a la raíz y se ve afectada por ella) y posteriormente unirse a la raíz. Este proceso de adsorción depende de múltiples factores tanto de la bacteria (polisacáridos, proteínas superficiales, microfibrillas de celulosa y fimbrias), la planta (exudados radiculares, estructura de la superficie radicular) como del ambiente (pH, temperatura, cationes divalentes, humedad, presencia de otros microorganismos competidores) (Lodeiro et al., 2003). Dentro de las principales señales secretadas por las plantas, se encuentran los compuestos exudados por las raíces. Estos incluyen aminoácidos, proteínas, azúcares, carbohidratos complejos, flavonoides, alcoholes, vitaminas y ácidos orgánicos, que producen cambios en la composición química del suelo. Las nuevas condiciones del suelo, con un ambiente enriquecido en nutrientes, puede promover el crecimiento de poblaciones microbianas específicas y su quimiotaxis hacia esta zona (Gage, 2004). Dentro de los exudados radiculares, los flavonoides y betaínas son las moléculas identificadas con capacidad de inducir en el rizobio tanto la quimiotaxis como la expresión de los genes responsables de la nodulación (Mckhann et al. 1994, Streng et al., 2011).

Todos los flavonoides consisten en dos anillos de benceno unidos mediante un anillo heterocíclico de pirano o pirona y las diferentes sustituciones sobre estos anillos producen flavonoides, flavonas, flavononas, así como isoflavonoides. Se han identificado más de 9000 flavonoides diferentes sintetizados por plantas vasculares (Valavanidis et al., 2013), pero solamente un conjunto de éstos está involucrado en

mediar las interacciones simbióticas rizobio-leguminosa. Es más, la capacidad de distinguir a su hospedero particular por parte del rizobio está dada en parte por el reconocimiento específico de cada flavonoide por la bacteria (Mckhann et al. 1994, Gage, 2004, Hirsch et al., 2001).

Los flavonoides inducen la expresión de los genes *nod* bacterianos, activando al operón de igual nombre. Ésto se debe a la interacción entre esta molécula y el producto del gen *nodD*, un factor de transcripción de la familia LysR. Esta interacción causa un cambio conformacional en la proteína NodD, la cual se une a una secuencia altamente conservada, conocida como caja nod, presente en las regiones promotoras de los genes *nod*, induciendo la transcripción de dicho operón (Streng et al., 2011).

Los genes *nod* codifican para aproximadamente 25 proteínas requeridas para la síntesis y exportación de los factores Nod por la bacteria. Los factores Nod (**Figura 4**) son lipolito-oligosacáridos, consisten en un oligómero de quitina acilada (tri o pentasacárido de N-acetil-D-glucosamina), sustituido en el carbono 2 de su extremo no reductor por una cadena de ácido graso insaturado de dieciséis a veinte carbonos. Además, pueden sufrir modificaciones en el residuo terminal del oligómero de quitina, desde glicosilaciones, sulfataciones, acetilaciones hasta metilaciones en dicho residuo. Estas moléculas cumplen un rol central en la interacción entre rizobios y leguminosas, modificando muchos aspectos de la raíz y la planta, como por ejemplo: desencadena la deformación del pelo radicular, la formación de hilos de pre infección, la división celular cortical, generan la despolarización de la membrana y la oscilaciones del calcio intracelular, la inducción y secreción de flavonoides, la inducción de nodulina y genes del ciclo celular; varios estudios sugieren que pueden afectar la regulación de fitohormonas (Gage, 2004, Streng et al., 2011, Mathesius et al., 2002, Roche et al., 1991).

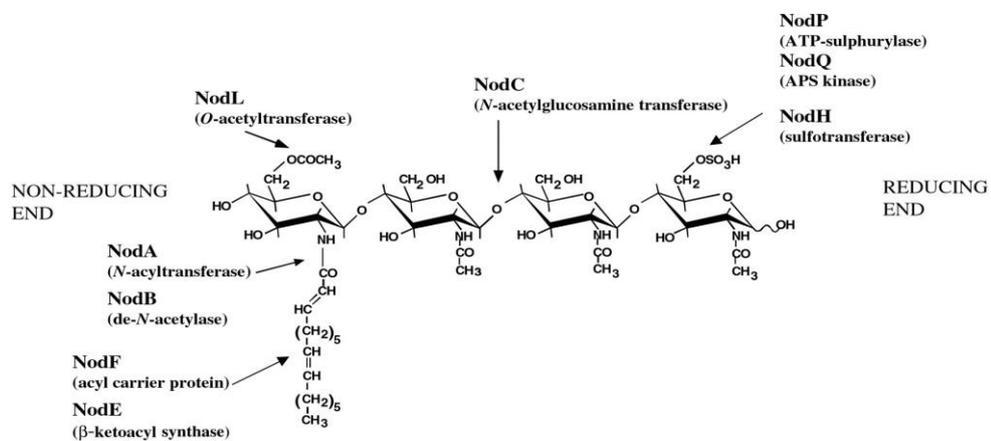


Figura 4. Estructura de factores Nod. En esta imagen se muestra la estructura del factor Nod producido por *S. meliloti*, en la cual se marcan el extremo reductor (reducing end) y no reductor (non-reducing end) y las proteínas encargadas de sintetizar cada parte del factor. Imagen extraída de Wais et al., 2002.

La estrategia por la cual se establece esta interacción no es única de rizobios, ya que otros organismos simbiotes de plantas como son las micorrizas sintetizan moléculas muy similares a los factores Nod para mediar su interacción con la planta hospedera (Mathesius et al., 2002).

Las distintas especies de rizobios producen diferentes factores Nod, que se distinguen por: el largo y grado de saturación de la cadena de ácido graso, el largo del oligómero de quitina y los sustituyentes que presentan en sus extremos. Por lo tanto, se supone que la producción y captación de factores Nod específicos, por el simbiote y el huésped

respectivamente, ha co-evolucionado generando un cierto grado de especificidad en esta relación. Sin embargo, algunas especies de rizobios producen una mezcla diversa de factores Nod que a menudo dan como resultado su capacidad de formar simbiosis con diferentes especies de plantas hospederas (Streng et al., 2011, Mathesius et al., 2002).

Los genes *nod* pueden ser clasificados en tres categorías, las cuales cada una da un grado de especificidad en la relación simbiote. La primera y más general, son los genes *nod* más conservados (*nodA*, *nodB* y *nodC*), los cuales son esenciales para generar esta relación simbiótica. Se encuentran en todos los rizobios y su función es la biosíntesis y el ensamblaje de las unidades de N-acetil-D-glucosamina y la unión de la cadena de ácido graso. El segundo grupo, son los genes *nod* reguladores (*nodD*) los cuales están encargados de regular al operón e interactuar específicamente con flavonoides determinados. Finalmente, el tercer grupo son 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 (**Figura 4**) (Roche et al., 1991).

Por parte de la planta, se han identificado una serie de genes conocidos como nodulinas, que se expresan solamente en respuesta a los factores Nod. Reciben este nombre debido a que su expresión se da preferentemente en el nódulo, además se discriminan por su aparecer en diferentes momentos en la diferenciación del nódulo: como nodulinas tempranas o tardías. La función de muchas de estas proteínas se sigue estudiando y es un campo muy activo de investigación (Franche et al. 2009, Roche et al., 1991).

Proceso de infección

El proceso de infección es desencadenado por la inducción de la bacteria por parte de los flavonoides secretados naturalmente en los exudados radiculares, que cambian su perfil de expresión génica, y comienzan a sintetizar los factores Nod. Estas bacterias van a colonizar la rizosfera y comenzar el proceso de infección, proceso que se puede dar de dos maneras, extracelular o intracelular.

Resumidamente, el mecanismo de infección extracelular se caracteriza por no presentar un hilo de infección y por ser independiente de la producción de factores Nod. Se han descrito dos mecanismos para esto; en el primero, los rizobios ingresan a través de las micro-grietas provocadas en los sitios donde emergen las raíces laterales, mientras que el segundo, los rizobios ingresando directamente por las células epidérmicas o entre estas y el pelo radicular (Andrews et al., 2017), este último proceso de infección fue descrito para *Mimosa scabrella* (Sprent et al., 1989).

El proceso de infección intracelular es el predominante en la interacción entre rizobios y leguminosas, comienza con la unión de las bacterias a los pelos radiculares de las raíces, por lo que la planta va a recibir la estimulación de los factores Nod presentes en la bacteria (**Figura 5**). Estos pelos radiculares, se desarrollan cerca del ápice de la raíz, son extensiones unicelulares de las células epidérmicas. En la rizosfera, los pelos jóvenes en crecimiento juegan un papel importante en el reconocimiento simbiótico. Una de las respuestas tempranas de las plantas a la estimulación por los factores Nod, es el aumento en los niveles intracelulares de calcio en los pelos radiculares, seguido de fuertes oscilaciones y alteraciones en el citoesqueleto de dicha célula. Simultáneamente, se estimulan las células de la corteza de la raíz, induciendo su proliferación, células que posteriormente formarán el primordio nodular y alojarán a los

rizobios (Jonas et al., 2007). Los cambios en el citoesqueleto producen el enrollamiento del pelo radicular, las bacterias que estaban unidas a esta estructura quedan atrapadas en su curvatura interior. Estas bacterias van a ser las que degradan la pared celular y penetran, lo que resulta en la invasión bacteriana al tejido vegetal, formando así el hilo de infección (**Figura 5, A**). La punta del hilo de infección en desarrollo es un sitio de continua síntesis de membrana celular, estimulada por la presencia de bacterias. Además, hay una constante proliferación de bacterias en este sitio, esto parece hacer progresar la infección (**Figura 5, B**) y la inducción de la síntesis de la membrana (Jones et al., 2007).

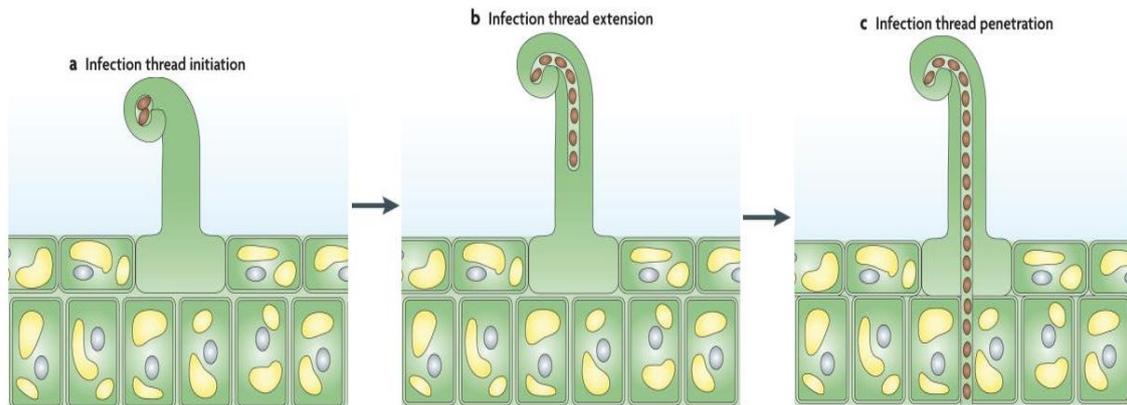


Figura 5. Esquema del proceso de infección de los rizobios. En “A” se ve el enrollamiento del pelo radicular y el inicio del hilo de infección, en “B” se muestra la extensión del hilo de infección, finalmente en “C” se esquematiza la penetración del hilo de infección para la formación del nódulo. Imagen extraída y modificada de Jones et al., 2007.

Este proceso culmina con la liberación de las bacterias en el citoplasma de las células corticales de la raíz (**Figura 5, C**). Las bacterias permanecen rodeadas por la membrana de la célula hospedera producida en el hilo de infección (membrana peribacteroidal), originando un nuevo organelo llamado simbiosoma, donde las bacterias se diferencian hacia su forma capaz de realizar la FBN, conocida como bacteroides. El nivel de diferenciación y viabilidad de los bacteroides depende tanto del tipo de rizobio como del hospedador (Sprent et al., 2013).

Como resultado de este proceso se originan los nódulos en las raíces de las leguminosas, estos poseen dos morfologías: determinado o indeterminado. Los nódulos indeterminados, los que se ven en plantas del género *Mimosa*, como *M. uraguensis* u otras mimosas nativas (Platero et al., 2016, Pereira-Gomez et al., 2020), presentan actividad meristemática persistente. Ésto genera nuevas células que son infectadas por los rizobios residentes del nódulo, por lo que adquieren una forma alargada cuando están maduros. En cambio, los nódulos determinados como los de la soja, poroto y lotus, entre otros, no presentan un meristema persistente y usualmente son redondeados, además, no parece que haya división de las bacterias una vez envueltas por la membrana peribacteroidal, lo cual sí ocurre en los nódulos indeterminados (Gage, 2004, Jones, 2007).

Sin embargo, todas las especies examinadas en las Caesalpinioideae, excepto las herbáceas *Chamaecrista* spp. y unas pocas especies en Papilionoideae, retienen su rizobios dentro de los hilos de infección (Andrews et al., 2017).

Competencia entre Rizobios

Como ya fuimos dilucidando, la relación simbiótica entre rizobios y leguminosas está determinada por muchos factores. Entre los más importantes se encuentra la especie de leguminosa y, por lo tanto, los flavonoides que secreta. Además, el tipo de rizobio y los factores Nod que sintetizan, incluyendo sus modificaciones y el ácido graso correspondiente, son importantes en mediar este reconocimiento. Estos factores (flavonoides y factores Nod) también determinan el grado de promiscuidad de esta interacción, ya que la variedad que sintetizan como el múltiple reconocimiento, por parte de ambos simbios, le proporciona este carácter.

Una vez que se establece en primera instancia esta interacción, la planta desarrolla una especificidad en la nodulación por ese rizobio específico, esto quiere decir que las bacterias nodulantes del primer nódulo van a verse favorecidas para la formación de los nódulos siguientes (van Rhijn et al., 1995). Aunque existen excepciones y se han encontrado casos de plantas noduladas por más de un tipo de rizobio, incluso colonizando el mismo nódulo. A pesar de esto, es importante identificar a la primera cepa nodulante porque generalmente produce una preferencia o ventaja para el resto del proceso, esto se hace identificando al primer nódulo y a la cepa simbiote dentro de éste (Safronova, et al., 2019).

Además de estos factores, hay otros aspectos que caracterizan y modulan el establecimiento de esta interacción, como la temperatura, la salinidad y el pH, entre otros. Una baja temperatura en la raíz inhibe la síntesis y secreción de flavonoides y otros compuestos de los exudados radiculares. Además, las bajas temperaturas también reducen la síntesis y/o excreción de factores Nod bacterianos. Estas dos consecuencias provocan el retraso del inicio de la nodulación y reducción de la tasa de crecimiento de los nódulos, lo que conduce a nódulos más pequeños.

Respecto a la salinidad, se ve que puede tener tanto efectos positivos como negativos en el establecimiento de esta interacción. Hay indicios de que las altas concentraciones de sal pueden inducir la expresión de genes *nod* incluso en ausencia de inductores como flavonoides, como se describió en *Rhizobium tropici* (Guasch-Vidal et al., 2012, Estévez et al., 2009). Sin embargo, el aumento de la salinidad reduce la producción de factor Nod por *Sinorhizobium arboris*, que nodulan *Acacia* y *Prosopis* (Penttinen et al., 2013).

El pH es uno de los parámetros físicoquímicos del suelo que afectan a este proceso ya que puede afectar a las señales secretadas, por ejemplo, reducir la secreción de los exudados radiculares, como isoflavonoides. Además, la modificación del pH puede reducir la expresión de los genes *nod* como *nodA*, generando la disminución de la producción y excreción de los factores Nod (Richardson et al., 1988). Otra modificación que pueden sufrir los simbios al reducir el pH, es modificar el patrón de expresión de factores nod, por uno más tolerante a las condiciones ambientales. Finalmente, algunos simbios al ver reducido el pH del medio, puede activar un mecanismo sistémico que regula negativamente el desarrollo de la nodulación (Lira et al., 2015). Por esta razón hay rizobios más adaptados a suelos ácidos, como es *Paraburkholderia*, haciéndolo más competente en esta situación (Garau et al., 2009).

Otro factor que es muy importante, es la disponibilidad de algunos compuestos en el sustrato, como el hierro o el fosfato, que son fundamentales para la función y la competencia del nódulo. Ya que la nitrogenasa necesita cofactores que presentan hierro y un alto requerimiento energético que utiliza como base fosfato (ATP), con una baja disponibilidad de estos compuestos se ve afectado el proceso y la función de los

nódulos. Además, la obtención de estos elementos es una gran ventaja para la competencia de las cepas por la nodulación de la planta (Lira et al., 2015).

Por otro lado, la presencia de metales pesados puede afectar fuertemente la nodulación, ya que se ha visto que, en presencia de éstos, algunos rizobios retrasan éste proceso, reducen la fijación de nitrógeno y se ve afectada la función del regulador *nodD*. También se han visto adaptaciones a estos ambientes, como la formación de biopelículas o la modificación del metabolismo bacteriano, lo que reduce los efectos antes descritos (Schue et al., 2011). Existen ciertas especies de *Cupriavidus*, como *Cupriavidus metallidurans*, que, aunque no es un rizobio se caracterizan por su gran resistencia a estos metales (von Rozycki et al., 2009).

Finalmente, otro factor que afecta mucho la competencia entre rizobios, es la presencia de nitrógeno en el sustrato. Se ha visto que cuando se aumenta la concentración de nitrógeno en el sustrato, *Cupriavidus taiwanensis* aumenta su competitividad sobre *Paraburkholderia phymatum* (Elliott et al., 2015).

Se han desarrollado varios estudios de competencia entre cepas de *Cupriavidus*, *Paraburkholderia* y *Rhizobium*, en los cuales se encontró que en condiciones controladas *Paraburkholderia* era ampliamente la más competente. Pero ciertas condiciones específicas como un pH más básico, mayor concentración de nitrógeno en el medio y una concentración mayor de metales pesados, favorecen la nodulación por rizobios pertenecientes al género *Cupriavidus*. La mayor capacidad competitiva que muestra *Paraburkholderia phymatum* puede deberse a que tiene una mayor y más rápida expresión de los genes *nod* que *Cupriavidus taiwanensis* y *Rhizobium mesoamericanum* (Klonowska et al., 2018).

Métodos para la identificación de cepas

La identificación de los endosimbiontes fue un tema de discusión durante mucho tiempo, ya que morfológicamente no son discriminables y como ya se ha dicho antes, no hay una relación única, uno a uno, entre rizobios y leguminosas. Además, es de gran importancia su identificación para estudios de competitividad y efectividad en el establecimiento de esta interacción.

Una solución a este problema es la amplificación de secuencias repetidas dentro del genoma bacteriano, que son lo suficientemente polimórficas como para identificar cepas dentro de una misma especie. Estas secuencias pueden ser las secuencias REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) y BOX (Enterobacterial Repetitive Sequences), de las cuales nos concentramos en las secuencias BOX ya que son las que utilizamos para identificarlos en este trabajo (Pallás et al., 2008, Louws et al., 1994, de Bruijn, 1992).

Las secuencias BOX, como ya adelantamos, son secuencias intergénicas repetidas en el genoma bacteriano, posee este nombre por la subunidad BOX A de los elementos BOX de *Streptococcus pneumoniae* (Pallás et al., 2008, Louws et al., 1994). La amplificación de estas regiones por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) genera de diez a treinta fragmentos de 200 a 6000 pb, lo que permite un buen poder de discriminación entre cepas. Es una técnica muy utilizada, ya que es muy reproducible, con juegos de cebadores y protocolos específicos para cada grupo de bacteria a analizar. Es un proceso muy robusto, capaz de adaptarse a diferentes concentraciones de ADN y que se puede realizar directamente a partir de colonias bacterianas aisladas (Pallás et al., 2008, Louws et al., 1994). La desventaja de esta técnica es que no se

puede identificar de novo géneros o especies, ya que la identificación es mediante la comparación con cepas conocidas. Para esto se utilizan otras técnicas como la secuenciación de genes housekeeping o el *rrs*, que permite realizar estudios filogenéticos y la correcta identificación de estas cepas.

Antecedentes

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que diferentes *Mimosa* spp. presentes en la zona del Abra de Zabaleta (departamento de Lavalleja) se encuentran noduladas por rizobios del género *Cupriavidus* (Platero et al., 2016). Mientras que las plantas de *Mimosa pilulifera* analizadas, presentes en la playa El Calabrés (departamento de Colonia) y en Puerto Viejo (departamento de Rio Negro), se hallan noduladas por *Paraburkholderia* sp. (Pereira-Gómez et al., 2020). Por otro lado, se ha demostrado que la mayoría de *Mimosa* spp. nativas de Brasil están noduladas por rizobios pertenecientes al género *Paraburkholderia* (Bontemps et al., 2010).

Con la finalidad de estudiar la influencia del tipo de sustrato en la nodulación de distintas especies de mimosas, se realizó un ensayo de plantas trampa utilizando como sustrato tierra del Abra de Zabaleta y arena de El Calabrés.

En ese ensayo se vio que todas las mimosas sembradas en la tierra del Abra de Zabaleta fueron noduladas por *Cupriavidus* spp., con excepción de *Mimosa pilulifera*, en la cual no se encontraron nódulos aún luego de 10 meses de crecimiento en ese sustrato. En cambio, todas las especies de mimosas sembradas en la arena de El Calabrés fueron noduladas por rizobios del género *Paraburkholderia* o *Rhizobium*. Las bacterias aisladas a partir de estos nódulos, fueron almacenadas a -80°C en la colección del laboratorio para su posterior caracterización. Para ese trabajo se utilizaron tanto especies nativas de mimosas (*M. uragüensis*, *M. adpressa*, *M. pilulifera*) como especies nativas de Brasil (*M. somnians*, *M. serossa*, *M. foliolosa*, *M. clausenii*).

Objetivos

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente trabajo nos planteamos como objetivo general, profundizar el estudio del efecto del tipo de sustrato en la interacción entre rizobios y mimosas nativas.

Además, como objetivos específicos nos planteamos,

1. Confirmar que las cepas aisladas del ensayo de plantas trampa son rizobios
2. Evaluar la capacidad de promoción de crecimiento de dichas cepas.
3. Estudiar la capacidad de competencia de cepas seleccionadas.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

Las cepas empleadas en este trabajo (**Tabla 1**) estaban almacenadas en la colección del laboratorio, a -80°C en una suspensión de partes iguales de un cultivo celular bacteriano con bacterias y glicerol (al 25% v/v) cómo crioprotector.

Estas fueron transferidas a placas de Petri conteniendo medio Yeast Manitol Agar (YMA) (Vincent, 1970) cuya composición está detallada en el **Anexo 1**, las cuales fueron incubadas de 24 a 48 hs a 30°C (estufa Memmert). Posteriormente se tomó una colonia aislada de estas placas y se sembró en tubos de ensayo conteniendo 5mL de medio Yeast Manitol Broth (YMB), los cuales se incubaron durante 24 hs a 30°C con agitación (200 rpm) en Incubator Shaker Series (Innova43, Labimed).

Se determinó el número aproximado de bacterias en suspensión por turbidimetría (estimando que una DO600nm de 1, equivale a una suspensión de 10^9 bacterias por ml) utilizando un espectrofotómetro de doble haz, UV Spectrophotometer, UV-1800 (Shimadzu), empleando medio sin cultivo como referencia.

Tabla 1. Cepas estudiadas en el ensayo de confirmación de rizobios. En esta tabla se muestran las cepas utilizadas en este trabajo, separadas por su respectivo género. En la primera columna se muestra la etiqueta con la cual se nombró, en la segunda, el nombre de la cepa y en la última, la especie más cercana de acuerdo a la secuencia del gen *rrs*. El nombre de las cepas está compuesto por PT (planta trampa), seguido por sustrato utilizado (PCa [playa El Calabrés] o AZ [Abra de Zabaleta]), luego el nombre de la planta de la cual fueron aisladas (*M. somnians* [MSo], *M. serossa* [MSe], *M. foliolosa* [MFo], *M. clausenii* [MCI], *M. uragüensis* [MUr], *M. adpressa* [MAd] y *M. pilulifera* [PI]) y por último, el aislamiento que fue caracterizado (01A, 01B, etc.).

Etiqueta	Cepa	Especie	Etiqueta	Cepa	Especie	Etiqueta	Cepa	Especie
C0	PTAZMFo01A	<i>C. necator</i>	B2	PTPCaMCI01a	<i>Paraburkholderia</i> spp.	R1	PTPCaMFo01C	<i>R. caliandrae</i>
C1	PTAZMUr01A	<i>C. necator</i>	B3	PTPCaMSo02B	<i>P. Hospita</i>	R2	PTPCaMCI01C	<i>R. indigosfera</i>
C2	PTAZMUr02A	<i>C. necator</i>	B4	PTPCaMUr01A	<i>P. terrae</i>	R3	PTPCaMCI01B	<i>R. mayensis</i>
C3	PTAZMSo01A	<i>C. necator</i>	B5	PTPCaMFo01A	<i>P. terrae</i>	R4	PTPCaMSo01A	<i>R. caliandrae</i>
C4	PTAZMSo03A	<i>C. necator</i>	B6	PTPCaMFo02A	<i>P. terrae</i>	R5A	PTPCaMA03Aa	<i>R. mesoamericanum</i>
C5	PTAZMSo01A	<i>C. necator</i>	B7	PTPCaMSo01C	<i>P. terrae</i>	R5B	PTPCaMA03Ab	<i>R. mesoamericanum</i>
C6	PTAZMCI01A	<i>C. necator</i>	B8	PTPCaMSo01B	<i>P. terrae</i>			
C7	PTAZMCI01B	<i>C. necator</i>	B9	PTPCaPI01A	<i>P. terrae</i>			
C8	PTAZMSo02C	<i>C. numazuensis</i>	B10	PTPCaPI02A	<i>P. terrae</i>			
C9	PTAZMSo01B	<i>C. necator</i>	B11	PTPCaPI03B	<i>P. terrae</i>			
C10	PTAZMSo02D	<i>C. necator</i>	B12	PTPCaMUr01B	<i>Paraburkholderia</i> spp.			
C11	PTAZMA04A	<i>C. numazuensis</i>						
C12	PTAZMA03B	<i>C. necator</i>						

Procesamiento de semillas

El procesamiento de la semilla constó de los siguientes tres pasos:

Escarificación: Aproximadamente 50 semillas de *Mimosa* spp. (*M. pudica*, *M. uragüensis*, *M. pilulifera*) fueron tratadas con etanol 100% (v/v) durante 2 minutos y secadas a temperatura ambiente. Seguidamente se les adicionó H_2SO_4 concentrado (95-98%) durante 10 minutos y se realizaron seis lavados con agua destilada estéril. El objetivo de este tratamiento es de ablandar su cubierta y facilitar su germinación.

Esterilización de la superficie: La superficie de las semillas escarificadas fue esterilizada sumergiéndolas en una solución de hipoclorito al 4% (p/v) durante 5 minutos, seguido

de seis lavados con agua destilada estéril. Se verificó la ausencia de bacterias en la superficie de las semillas esterilizadas incubando dos de ellas en medio sólido LB (**Anexo 1**) a 30°C durante 3 días.

Germinación: Las semillas tratadas se colocaron en placas de Petri conteniendo agar-agua 0,8% (p/v) y se incubaron en oscuridad a 30°C en la estufa, hasta su germinación. Las plántulas se transfirieron individualmente a tubos de vidrio conteniendo 15 ml de medio Jensen-agar 0,8% (Vincent et al., 1970) (sin nitrógeno, **Anexo 1**) y se colocaron en el cuarto de cultivo vegetal a una temperatura de 24°C y fotoperíodo de 16hs de luz, 8hs de oscuridad.

Ensayos de nodulación y promoción del crecimiento vegetal

Cinco días después de la germinación, se inocularon tres plántulas con cada cepa, agregando a los tubos 1 ml de una suspensión bacteriana en agua destilada estéril, conteniendo el equivalente a 1×10^7 células bacterianas. Se realizaron cinco plántulas control con igual procedimiento sustituyendo el inóculo por 1 ml de agua destilada estéril. Las plantas se cultivaron en iguales condiciones, revisándolas diariamente para detectar la presencia de nódulos en la raíz.

Se consideró que las cepas eran simbiotes (nod+) cuando fueron capaces de inducir nódulos en las plantas inoculadas, mientras que se consideró que las cepas eran simbiotes efectivos, fijadoras de nitrógeno (nod+ fix+), cuando los nódulos formados tenían una coloración rojiza. Las cepas que indujeron nódulos blancos se consideraron (nod+, fix-), mientras que las cepas que no produjeron nódulos se consideraron (nod-) de acuerdo a Somasegaran et al. (2012).

Para evaluar la capacidad promotora del crecimiento vegetal de las cepas empleadas, se registró 2-3 meses después de la inoculación, la altura y el peso seco de la parte aérea (del ápice a la base del tallo) de las plantas individualmente. Este último, pesando la planta previamente secada durante 3 días en estufa a 60°C (estufa P. Selecta). Se compararon los datos obtenidos del peso y el tamaño promovido por cada género bacteriano respecto a las plántulas control.

Ensayo de competencia en tubo

Se eligieron dos cepas de las confirmadas en el ensayo anterior, una perteneciente al género *Cupriavidus* (C2, PTAZMUr02A, *C. necator*) y otra al género *Paraburkholderia* (B4, PTPCaMUr01A, *B. terrae*) para evaluar su capacidad de competir por la nodulación en las plantas nativas *M. uragüensis* y *M. pilulifera*. Para esto, se realizaron ensayos de nodulación tal como los descritos en el punto anterior, en los que se incluyeron plántulas que se inocularon con cada cepa por separado (5 réplicas por inóculo) y plántulas que se inocularon con una suspensión bacteriana conteniendo cantidades iguales de ambas cepas (8 réplicas). En todos los casos se empleó un volumen de inóculo de 1 ml equivalente a 1×10^7 bacterias totales, se realizaron cinco controles con igual procedimiento, sustituyendo el inóculo por 1 ml de agua destilada estéril.

Las plantas fueron revisadas periódicamente para observar y marcar la aparición del primer nódulo, considerando que el rizobio aislado de este nódulo es el más competente. Las plántulas fueron cosechadas a los dos meses de haber comenzado el ensayo, para la extracción del primer nódulo y la caracterización de los rizobios dentro de éste.

Procesamiento de nódulos

Los nódulos se extrajeron cuidadosamente de la raíz y se lavaron tres veces con agua destilada estéril previo a la esterilización de su superficie. Esta se realizó mediante un tratamiento con hipoclorito al 4% (p/v) durante 5 minutos, y cinco lavados posteriores con agua destilada estéril. Estos nódulos se maceraron individualmente con una varilla de vidrio estéril y fueron sembrados en placas conteniendo medio sólido YMA con ella. Las bacterias aisladas fueron caracterizadas fenotípicamente de acuerdo a la forma, tamaño, consistencia y color de las colonias (**Figura 6**), y genéticamente mediante rep-PCR.

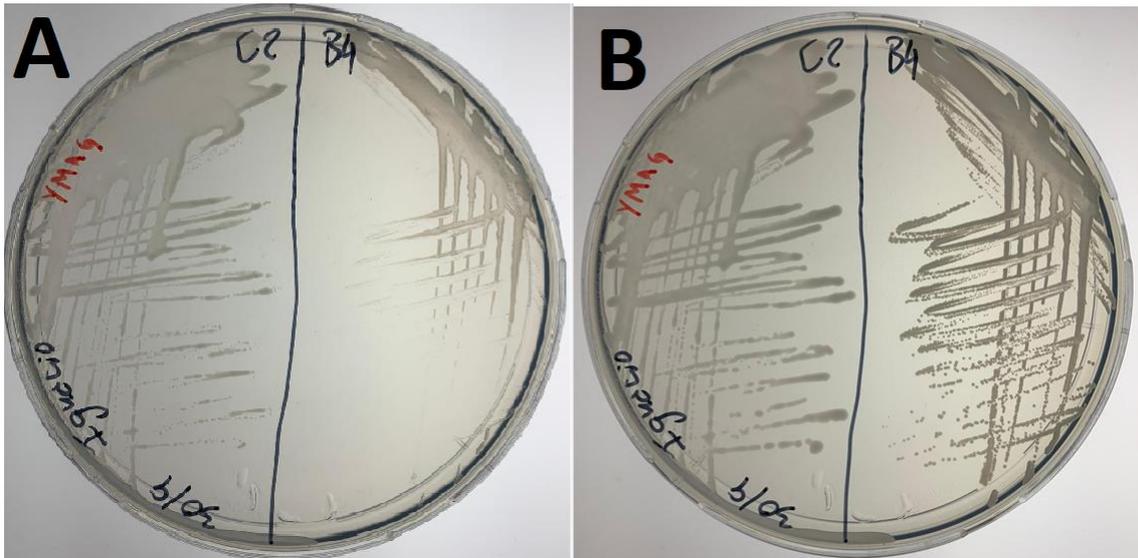


Figura 6. Morfología de las cepas utilizadas. En esta imagen se comparan la morfología de las colonias producidas por las cepas C2 y B4 en medio YMA, a distintos tiempos. Se ve en "A" las cepas luego de un día de cultivo, en la cual se observa un crecimiento mucho más rápido de la cepa C2. Se observa en "B" las cepas después de dos días de cultivo, en la que se puede ver que las colonias producidas por C2 son más grandes, mucosas y translúcidas que las producidas por B4.

Caracterización genética

Lisados bacterianos

Las bacterias se caracterizaron mediante rep-PCR, para la cual 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 a partir de un cultivo fresco en medio sólido YMA. Ésta se resuspendió en 100 μ l de H₂O estéril y se centrifugó a 10000 g durante 2 minutos. El pellet bacteriano se resuspendió en 100 μ l de NaOH 0,05 M y se incubó a 100°C durante 4 minutos, posteriormente se lo colocó 2 minutos en hielo. Luego se le agregaron 900 μ l de agua destilada estéril, se mezcló el contenido y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos. Finalmente se pasaron 500 μ l del sobrenadante a un tubo limpio, el cual se conservó a -20°C hasta su uso como molde en las reacciones de PCR.

Técnica de rep-PCR

La reacción se llevó a cabo utilizando un procedimiento ya puesto a punto en el laboratorio, en un volumen final de 25 μ l: 12,5 μ l de Taq 2X Master Mix (BioLabs

#M0270L); 1 µl de cebador BoxA1R (**Tabla 2**) y 2 µl de lisado de colonia como molde completando con agua (9,5 µl). El Master Mix está compuesto por: 20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 3,0 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 10% (v/v) Glycerol, 0,16% (v/v) IGEPAL, 0,1% (v/v) Tween y 50 U/ml de Taq polimerasa. Para esta reacción se utilizó como control positivo ADN genómico de la cepa UYMMa02A de *Cupriavidus*, mientras que como control positivo se usó el mismo mix pero sin ADN molde.

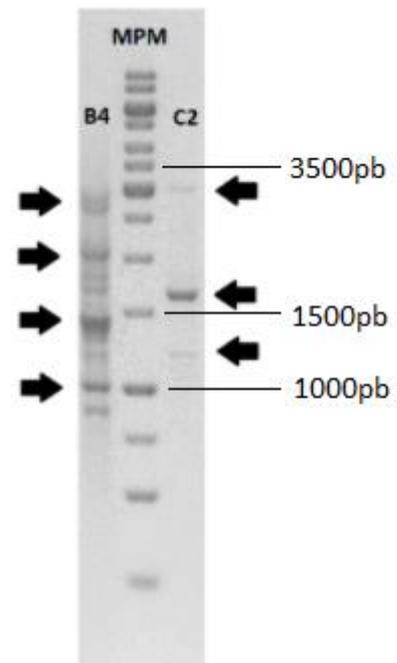
El programa de amplificación utilizado fue: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 7 minutos, seguido de 30 ciclos de: 30 segundos a 90°C, 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 52°C y 8 minutos a 65°C. Para finalizar se realiza un ciclo de extensión final de 16 minutos a 65°C. Se realizó en el termociclador Genepro del laboratorio.

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 150 minutos a 80 V y fue teñido con el intercalante Good View (Beijing SBS. Genetech Co. Ltd.), 2 µl / 50 ml de gel, para su visualización en el transiluminador, en el cual se determina si el patrón de banda corresponde al tipo *Cupriavidus*, tipo *Paraburkholderia* o indeterminado (**Figura 7**). Se utilizó el marcador de peso molecular (MPM) GeneRuler 1 kb DNA Ladder para la correcta caracterización de los aislamientos.

Tabla 2. Tabla de cebadores. En esta tabla se puede ver el cebador utilizado para la reacción de rep-PCR y su secuencia.

Cebador	Secuencia nucleotídica
BoxA1R	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'

Figura 7. Visualización del patrón de bandas obtenido por rep-PCR de las cepas control (B4 y C2). En esta figura se muestran en un gel de agarosa 1%, la amplificación por rep-PCR de las cepas control correspondientes a *Paraburkholderia* (B4) y a *Cupriavidus* (C2) y como referencia el marcador de peso molecular (MPM), en el cual se señalan como referencia algunos de los tamaños de sus bandas. Las bandas señaladas con una flecha serán las utilizadas para identificar al tipo *Cupriavidus* (C2) y *Paraburkholderia* (B4) en ensayos posteriores.



Ensayo de competencia en maceta

Se prepararon diez macetas por condición, separándolas en dos bandejas (5 macetas por bandeja), colocando 300 gramos de sustrato en cada una. El sustrato utilizado se trajo 3 días antes en recipientes estériles, de la playa El Calabrés (Departamento de Colonia) o del Abra de Zabaleta (Departamento de Lavalleja).

Para cada sustrato se realizaron los siguientes tratamientos: sustrato inoculado con cada cepa por separado (las mismas que se utilizaron en el ensayo anterior) y sustrato inoculado con una suspensión bacteriana conteniendo cantidades iguales de ambas cepas. En todos los casos se empleó un volumen de inóculo de 10 ml equivalente a 1×10^7 bacterias por gramo de sustrato. Los controles se realizaron con igual procedimiento, sustituyendo el inóculo por 10 ml de agua destilada estéril (**Tabla 3**).

Tabla 3. Condiciones estudiadas en el ensayo de competencia en macetas. En esta tabla se representan las etiquetas utilizadas para identificar cada condición estudiada en el ensayo de competencia en maceta, según el inóculo (fila 2) y el sustrato (columna 2) utilizado.

		Inoculo			
		C2	B4	Competencia	Sin Inoculo
Sustrato	Arena El Calabres	A	B	C	D
	Tierra Abra del Zabaleta	E	F	G	H

Dos días posteriores a la inoculación del sustrato, fueron sembradas las plántulas (3 plántulas por maceta), preparadas previamente siguiendo el protocolo antes expuesto. Las plántulas se colocaron en una pequeña cavidad realizada en el sustrato, rellena con turba estéril. Las macetas se cultivaron a 26 °C con un fotoperiodo de 16 hs de luz / 8 hs de oscuridad, regándolas periódicamente durante 3 meses hasta su cosecha.

Se recolectaron las plantas extrayéndose cuidadosamente y recolectando entre cuatro a seis nódulos por maceta, los cuales fueron posteriormente procesados y caracterizadas las bacterias aisladas mediante el protocolo anteriormente desarrollado.

Medición de pH de los sustratos

Para determinar el pH de los sustratos, estos se secaron durante 2 días a 40 °C (estufa Memmert) y posteriormente se tamizaron (tamiz de 2mm). Luego, se colocaron 20 g de sustrato tamizado en un vaso de bohemia conteniendo agua desionizada (50 ml) y se agitó durante 3 minutos, dejando decantar posteriormente. Se midió el pH del líquido por encima del sustrato decantado utilizando el phmetro (Beretta, et al., 2020). Además, se tomó una gota del mismo líquido y se colocó en una tira indicadora de pH (MColorHast) para confirmar el resultado. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada sustrato.

Análisis estadístico

Se utilizó la correlación de Pearson para determinar correlaciones entre variables (tamaño, peso, número de nódulos), se utilizó el análisis de t-student con varianzas iguales para determinar diferencias significativas entre las muestras (datos obtenidos de los distintos géneros bacterianos). Los análisis estadísticos se hicieron mediante el programa Infostat.

Resultados

Confirmación de simbioses

El procesamiento de las semillas para el ensayo de confirmación de las cepas simbiotes se realizó con éxito, obteniendo plantas sin contaminaciones y que crecieron normalmente en el medio como se observa en la **Figura 8**.



Figura 8. Ensayo de nodulación y promoción de crecimiento. Plantas de *Mimosa pudica* creciendo en medio Jensen, correspondiente a tres réplicas de los controles negativos de este ensayo, a los 15 días de ser sembradas.

Mediante el ensayo de nodulación, se confirmaron las cepas que fueron capaces de formar nódulos en la planta modelo *Mimosa pudica*, y se observó el fenotipo para cada una de ellas (**Tabla 4**).

Tabla 4. Resultados del ensayo de nodulación. Esta tabla ilustra las cepas utilizadas en este ensayo, identificadas con su respectiva etiqueta, seguida por un subíndice que muestra el número de réplica a la cual corresponde. En la columna siguiente, se muestra el fenotipo que generó dicha réplica al momento de extraer la planta para su medición (53 a 69 días post inoculación).

Etiqueta	Fenotipo	Etiqueta	Fenotipo	Etiqueta	Fenotipo	Etiqueta	Fenotipo	Etiqueta	Fenotipo
C0 ₁	nod+ fix+	C6 ₁	muerta	R1 ₁	nod-	B2 ₁	nod+ fix+	B8 ₁	nod+ fix+
C0 ₂	nod+ fix+	C6 ₂	nod+ fix+	R1 ₂	nod-	B2 ₂	nod+ fix+	B8 ₂	nod+ fix+
C0 ₃	nod+ fix+	C6 ₃	nod+ fix+	R1 ₃	nod-	B2 ₃	nod+ fix+	B8 ₃	nod-
C1 ₁	nod+ fix+	C7 ₁	nod+ fix+	R2 ₁	nod-	B3 ₁	nod+ fix+	B9 ₁	nod+ fix+
C1 ₂	nod+ fix+	C7 ₂	nod+ fix+	R2 ₂	nod-	B3 ₂	nod+ fix+	B9 ₂	nod+ fix+
C1 ₃	nod+ fix+	C7 ₃	nod+ fix+	R2 ₃	nod-	B3 ₃	nod+ fix+	B9 ₃	nod+ fix+
C2 ₁	nod+ fix+	C8 ₁	nod+ fix+	R3 ₁	nod-	B4 ₁	nod+ fix+	B10 ₁	nod+ fix+
C2 ₂	nod+ fix+	C8 ₂	nod+ fix+	R3 ₂	nod-	B4 ₂	nod+ fix+	B10 ₂	nod+ fix+
C2 ₃	nod+ fix+	C8 ₃	nod+ fix+	R3 ₃	nod-	B4 ₃	nod+ fix+	B10 ₃	nod+ fix+
C3 ₁	nod+ fix+	C9 ₁	nod+ fix+	R4 ₁	nod-	B5 ₁	nod+ fix+	B11 ₁	nod+ fix+
C3 ₂	nod+ fix+	C9 ₂	nod+ fix+	R4 ₂	nod-	B5 ₂	nod+ fix+	B11 ₂	nod+ fix+
C3 ₃	nod+ fix+	C9 ₃	nod-	R4 ₃	nod-	B5 ₃	nod+ fix+	B11 ₃	nod-
C4 ₁	nod+ fix+	C10 ₁	nod+ fix+	R5A ₁	nod+ fix+	B6 ₁	nod+ fix+	B12 ₁	nod+ fix+
C4 ₂	nod+ fix+	C10 ₂	nod+ fix+	R5A ₂	nod+ fix+	B6 ₂	nod+ fix+	B12 ₂	nod+ fix+
C4 ₃	nod+ fix+	C10 ₃	nod+ fix+	R5A ₃	nod+ fix+	B6 ₃	nod+ fix+	B12 ₃	nod+ fix+
C5 ₁	nod+ fix+	C11 ₁	nod+ fix+	R5B ₁	nod+ fix+	B7 ₁	nod+ fix+		
C5 ₂	nod+ fix+	C11 ₂	nod+ fix+	R5B ₂	nod+ fix+	B7 ₂	nod+ fix+		
C5 ₃	nod-	C11 ₃	nod+ fix+	R5B ₃	nod+ fix+	B7 ₃	nod+ fix+		
		C12 ₁	nod+ fix+						
		C12 ₂	nod+ fix+						
		C12 ₃	nod+ fix+						

Como se puede observar en la **Tabla 4**, todas las cepas identificadas del género *Cupriavidus* y *Paraburkholderia* generaron nódulos funcionales (nod+ fix+), menos alguna réplica, excepcionalmente. Del mismo modo, se ve que la mayoría del género *Rhizobium* no pudo generar una relación simbiótica efectiva (nod-), a excepción de R5A y R5B los cuales generan un fenotipo nod+ fix+ en todas sus réplicas.

Promoción de crecimiento vegetal

Altura de la parte aérea

En el mismo ensayo se estudió la promoción de crecimiento producida por las cepas (**Figura 9**), analizándolas en conjunto por su respectivo género. Acerca de la altura, se observa que las plantas inoculadas con bacterias del género *Cupriavidus* fueron las únicas en mostrar promoción de crecimiento respecto al control, constatándose un crecimiento mayor en sus plantas. Respecto a las cepas del género *Paraburkholderia*, se agrupó junto a los controles sin notar una diferencia significativa en la altura de las plantas inoculadas con éste género. Finalmente, las plantas inoculadas con cepas del género *Rhizobium*, mostró una disminución significativa de las alturas respecto a las plantas control (**Figura 10**).

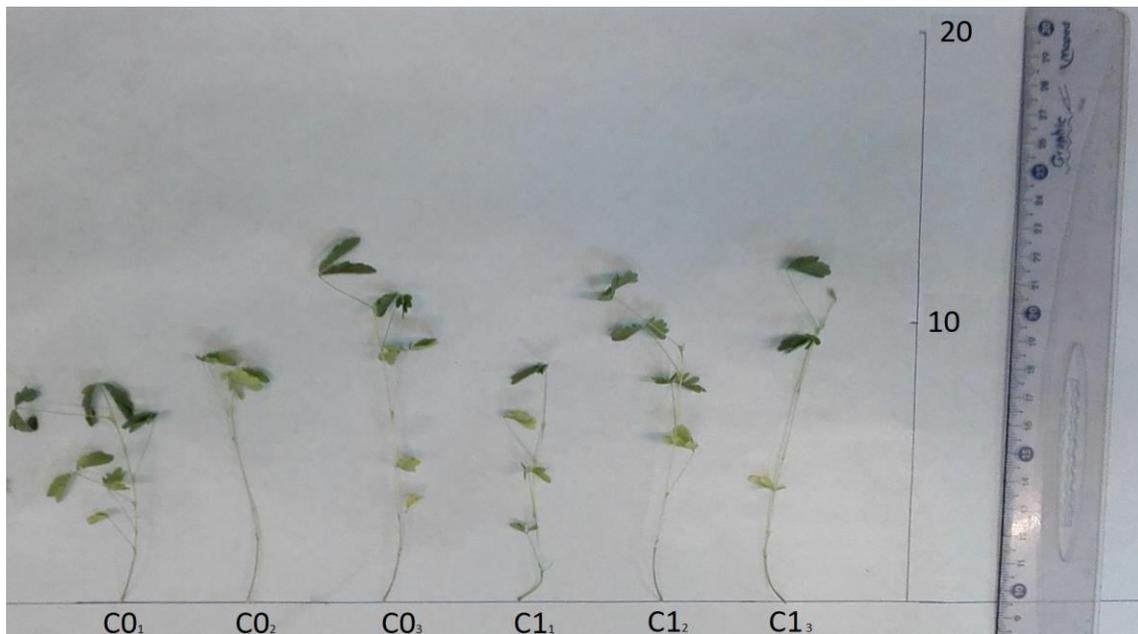


Figura 9. Medición de la parte aérea. En esta figura se ejemplifica el proceso de medición de la parte aérea de las plantas, en la medición de las plantas inoculadas con dos cepas de *Cupriavidus*. Se visualiza en el Eje Y, como referencia, 10 y 20 centímetros (cm) y a su derecha la regla utilizada para medir la altura. Sobre el Eje X están las etiquetas de las réplicas analizadas, en este caso, C0 y C1 (con sus tres réplicas cada una).

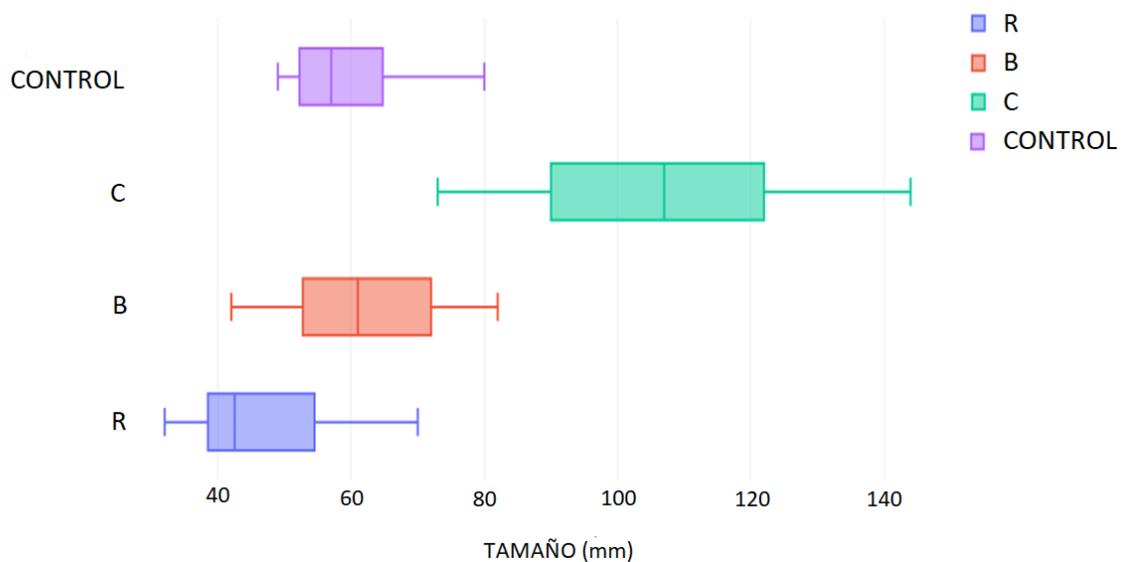


Figura 10. Altura de la parte aérea de las plántulas en función del género bacteriano inoculado. En esta gráfica se muestra la altura en milímetros (mm) de la parte aérea de las plantas, agrupadas por sus respectivos géneros, *Cupriavidus* (C, con 39 réplicas), *Paraburkholderia* (B, con 33 réplicas), *Rhizobium* (R, con 18 réplicas) y los controles de referencia (CONTROL, con 5 réplicas). El boxplot se compone de una caja limitada por los cuartiles uno y tres atravesada por una línea que representa la mediana (cuartil dos), y dos bigotes que muestran los valores máximos y mínimos obtenidos.

Peso seco de la parte aérea

Respecto al peso seco de las plantas, en el único tratamiento que se vio promoción de crecimiento en comparación con las plantas control, fue nuevamente en las plantas inoculadas con cepas del género *Cupriavidus*. En el resto no se observó una diferencia significativa respecto al control (**Figura 11**). Además, se encontró una relación de

dependencia entre estas dos variables (tamaño y peso), siendo directamente proporcionales, con un nivel de dependencia de 0,836.

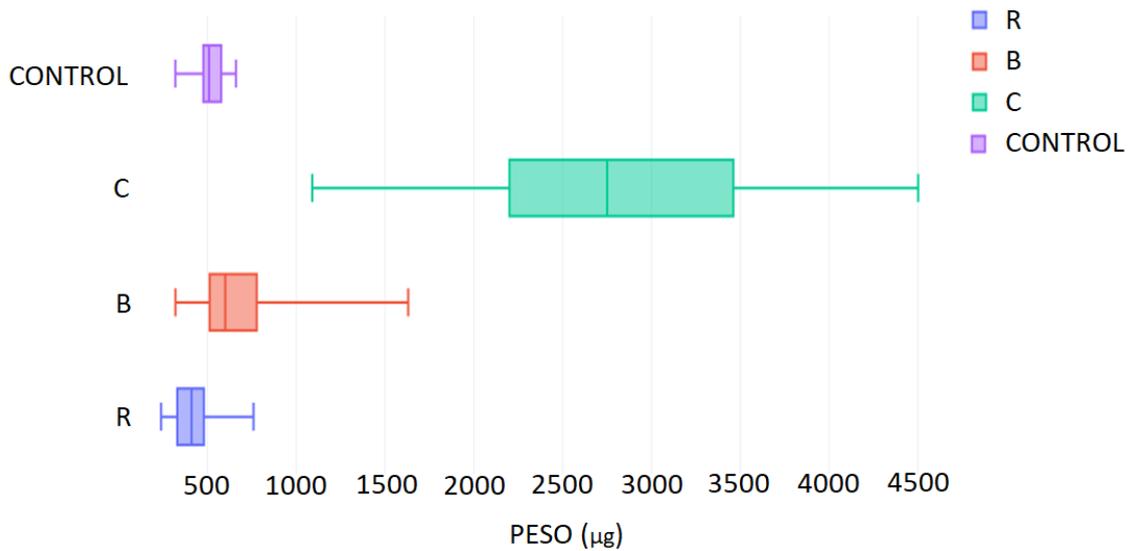


Figura 11. Peso de la parte aérea de las plántulas en función del género bacteriano inoculado. Determinación del peso seco en microgramos (μg) de la parte aérea de las plantas de *Mimos pudica* inoculadas, agrupadas por sus respectivos géneros: *Cupriavidus* (C, con 39 réplicas), *Paraburkholderia* (B, con 33 réplicas), *Rhizobium* (R, con 18 réplicas) y los controles de referencia (CONTROL, con 5 réplicas). El boxplot se compone de una caja limitada por los cuartiles uno y tres atravesada por una línea que representa la mediana (cuartil dos), y dos bigotes que muestran los valores máximos y mínimos obtenidos.

Número de nódulos

Al analizar el número de nódulos funcionales que produjeron los distintos géneros en el ensayo, observamos que las plantas de *Mimos pudica* inoculadas con bacterias del género *Cupriavidus* spp., produjeron una mayor cantidad de nódulos en comparación con las inoculadas con *Paraburkholderia* spp. o *Rhizobium* spp. (**Tabla 5**). A pesar de esto, no se obtuvo una correlación entre el número de nódulos funcionales de las plantas y su tamaño o peso.

Tabla 5. Altura de las plantas y número de nódulos obtenidos en el ensayo de nodulación. En esta tabla se muestran, separadas por su género e identificada por su etiqueta (fila 1), las cepas utilizadas. Se visualiza en la fila 2 y 3, el promedio de los nódulos observados y el tamaño promedio (cm) de las plantas, respectivamente.

Etiqueta	Nº nodulos	Tamaño	Etiqueta	Nº nodulos	Tamaño	Etiqueta	Nº nodulos	Tamaño
C0	11,67	13,27	B2	4,33	5,93	R1	0,00	3,73
C1	15,00	12,70	B3	14,00	6,00	R2	0,00	4,63
C2	11,67	8,63	B4	7,00	6,40	R3	0,00	4,00
C3	11,33	9,57	B5	8,67	5,53	R4	0,00	5,10
C4	10,50	12,45	B6	4,33	6,40	R5A	13,67	3,77
C5	8,50	9,90	B7	5,33	6,40	R5B	2,67	4,70
C6	7,50	10,50	B8	3,50	7,75			
C7	11,67	10,50	B9	5,67	7,07			
C8	6,33	8,83	B10	5,00	5,23			
C9	4,00	10,60	B11	4,50	8,10			
C10	7,00	11,07	B12	2,00	5,57			
C11	6,00	11,40						
C12	6,67	10,33						

Ensayos de competencia

Ensayo de competencia en tubo

En éste ensayo de competencia se utilizaron dos cepas, elegidas por mostrar un fenotipo nod⁺ fix⁺ en el ensayo anterior y porque fueron aislados de las plantas modelo utilizadas en este ensayo (trabajo antecedente). Una vez corroborada su identidad como rizobios, se seleccionaron las cepas PTAZMUr02A (C2) identificada como *C. necator*, y PTPCaMUr01A (B4) identificada como *P. terrae* para los siguientes ensayos. En este ensayo de competencia en tubo, como se describe en Materiales y Métodos, se utilizaron dos modelos vegetales (*M. uragüensis* y *M. pilulifera*).

Cuando se usó el modelo *M. pilulifera*, éste no desarrolló nódulos en los tiempos juzgados (60 días), con ninguna de las cepas, mientras que utilizando el modelo *M. uragüensis* sí se obtuvieron nódulos. Ambos modelos presentaron plantas con un crecimiento normal y sin contaminaciones.

Respecto a la capacidad de establecer una relación simbiótica con *Mimosa uraguensis*, ambas cepas fueron capaces de nodular esta planta. En el ensayo se observa que las plantas inoculadas con la cepa de *Cupriavidus* mostró su primer nódulo a los 14 días y terminó de nodular todas las réplicas a los 27 días. Mientras que las plantas inoculadas con la cepa de *Paraburkholderia* desarrolló el primer nódulo a los 27 días y la última réplica nodulada se observó a los 32 días, aunque no se vieron nódulos en todas las réplicas. Este comportamiento también se vio en el ensayo de confirmación de su carácter de rizobio en *Mimosa pudica*, en el cual mostraron los mismos tiempos en comenzar la nodulación. Aunque esta diferencia en la velocidad de nodulación no fue estadísticamente significativa, hay una tendencia de que la cepa C2 nodula más rápidamente que B4.

Cuando observamos el ensayo de competencia propiamente dicho, en el que se inocularon las plantas con igual número de bacterias de C2 y B4, todas las réplicas fueron noduladas. Respecto a los tiempos de nodulación, se observó el primer nódulo a los 10 días y fue nodulada la última planta a los 34 días, aunque a los 21 días siete de las ocho réplicas ya habían presentado nódulos. Estos tiempos son muy similares a los que mostró por la cepa C2, cuando fue inoculada individualmente en el mismo modelo vegetal.

Posteriormente, se extrajo el primer nódulo de cada una de las plantas y se caracterizó tanto morfológicamente como genéticamente las bacterias de su interior. De las ocho réplicas realizadas solo se obtuvieron siete aislamientos, ya que de una de las réplicas (réplica "F") no se pudieron aislar satisfactoriamente las bacterias del interior del nódulo.

Se comenzó con una caracterización morfológica de las colonias bacterianas, en la cual se sembraron en medio YMA, las cepas C2 y B4, y una de las extracciones problema (**Figura 12**). Como se puede ver en la **Figura 12**, la morfología de colonia obtenida de dichos aislamientos se asemeja a las colonias blanquecinas, translúcidas, mucosas y de crecimiento lento de B4. Este resultado se observó para todos los aislamientos realizados del ensayo. Se continuó con la caracterización genética de dichos aislamientos, caracterizando por duplicado cada aislamiento (**Figura 13**). Como se observa en la **Figura 13** todos los aislamientos presentan un patrón de bandas idéntico al mostrado por B4.

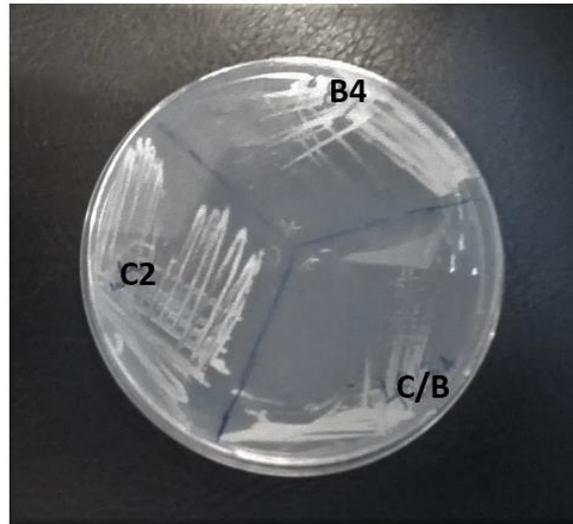


Figura 102. Morfología de las colonias de cepas utilizadas en los ensayos de competencia. En esta figura se muestran comparativamente los fenotipos de colonia que presentan C2, B4 y un aislamiento problema del ensayo de competencia en tubo (C/B). Se observa un fenotipo de colonia similar a B4 en la muestra problema.

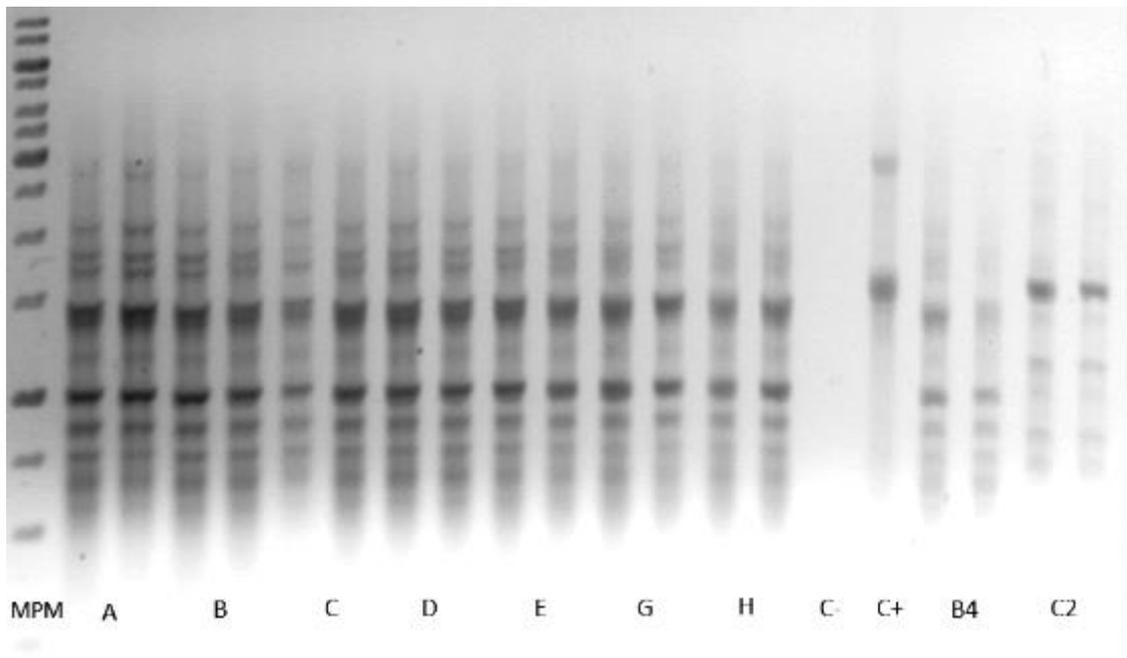


Figura 13. Gel de agarosa 1% del rep-PCR obtenido del ensayo de competencia. En este gel se muestran los productos de la rep-PCR utilizada para la caracterización de las bacterias nodulantes del ensayo de competencia en tubo. Se muestra de izquierda a derecha, el marcador de peso molecular (MPM), los siete aislamientos analizados por duplicado (A-H), el control negativo (C-), el control positivo de la reacción (C+) y las cepas utilizadas en el ensayo (B4, C2) también por duplicado.

Como los aislamientos de todos los nódulos caracterizados en el ensayo se identificó tanto morfológicamente como genéticamente con B4 (**Figura 12 y 13** respectivamente), vemos que en las condiciones de este ensayo la cepa más competente es la cepa B4.

Ensayo de competencia en maceta

En este ensayo de competencia en macetas se utilizaron las cepas C2 y B4, y dos modelos vegetales (*M. uragüensis* y *M. pilulifera*), al igual que en el ensayo anterior. Esta vez sembrándolas en arena de la playa El Calabrés o tierra del Abra de Zabaleta (Tabla 3).

En este ensayo no se obtuvieron resultados a partir del modelo *M. pilulifera*, ya que la mayoría de las semillas sembradas no lograron germinar correctamente. Mientras que el modelo *Mimosa uragüensis* creció satisfactoriamente en ambos sustratos, por lo cual se pudieron extraer los nódulos de estas plantas para su posterior caracterización (Figura 14). De las plantas extraídas sólo cinco de éstas no presentaron nódulos, cuatro pertenecientes a la condición B y una a la condición A.

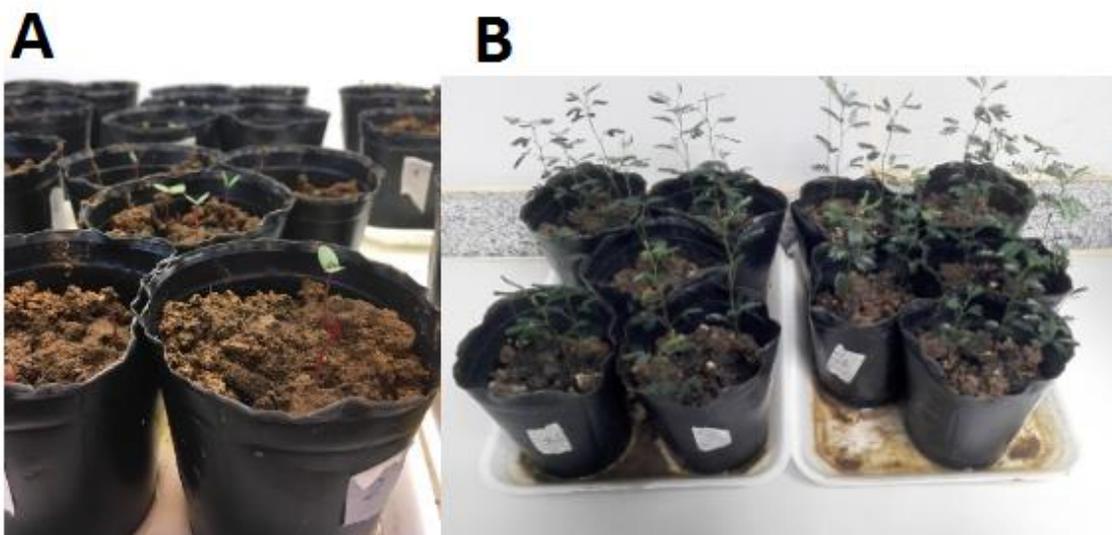


Figura 14. Visualización del ensayo de competencia en macetas. En esta figura se visualiza en “A” las macetas conteniendo *Mimosa uragüensis* a las dos semanas de ser sembradas. Mientras que en “B”, es una imagen tomada a los dos meses de haber comenzado el ensayo, al momento de cosechar las plantas para la extracción de sus nódulos.

De los nódulos extraídos, se aislaron correctamente los rizobios nodulantes y se caracterizaron entre doce y veinte aislamientos por condición mediante rep-PCR (Tabla 6, Anexo 9.3), los cuales se tomaron de diferentes bandejas y macetas.

Tabla 6. Resultado del ensayo de competencia en macetas. En esta tabla se visualizan las condiciones utilizadas: los distintos sustratos y los diferentes inóculos, aclarando entre paréntesis las etiquetas utilizadas para cada condición (Tabla 3). Además, se indican las caracterizaciones en las que se discriminan según el patrón de bandas observado en el rep-PCR (Anexo 9.3), las muestras que no amplificaron correctamente se identifican con N.A. En la última fila se muestran el número total de aislamientos analizados por condición.

		Condiciones							
		El Calabrés				Abra del Zabaleta			
		C2 (A)	B4 (B)	Competencia (C)	Control (D)	C2 (E)	B4 (F)	Competencia (G)	Control (H)
Caracterización	tipo <i>Cupriavidus</i>	9	0	17	0	14	0	19	2
	tipo <i>Paraburkholderia</i>	2	12	2	2	0	2	0	0
	Indeterminado	2 (N.A.)	1 (N.A.)	1	10	1	11	1	13
	Total	13	13	20	12	15	13	20	15

Las condiciones control, D y H, fueron inoculados con agua estéril en lugar de una suspensión bacteriana. Los aislamientos de dichos tratamientos mostraron patrones de

bandas diversos, la mayoría de estos indeterminados, aunque se encontraron aislamientos caracterizados como tipo *Cupriavidus* y tipo *Paraburkholderia*. De los aislamientos identificados como indeterminados, algunos de ellos presentaban patrones de bandas compartidos (hasta 40% de los aislamientos de estas condiciones).

Finalmente, los aislamientos caracterizados como indeterminados en las condiciones que fueron inoculadas con diferentes suspensiones bacterianas (A, B, C, E, F y G), presentaron algunos de los patrones de bandas observados de aislamientos de las condiciones control.

Caracterización de los sustratos

Se determinó por duplicado el pH de los sustratos utilizados (**Tabla 7**), obteniendo resultados muy similares entre las réplicas. Además, la confirmación mediante tiras reactivas dio valores muy similares a los obtenidos con el pHímetro.

Tabla 7. pH de los sustratos empleados en el ensayo de competencia. En esta tabla se muestran los sustratos utilizados (Columna 1) y la medición de pH de cada réplica (columna 2), con la medida obtenida mediante las tiras indicadoras de pH entre paréntesis.

Sustratos	pH	
Arena playa El Calabrés	5,75 (6)	5,8 (6)
Tierra Abra del Zabaleta	4,98 (5)	4,97 (5)

Discusión

El estudio de las leguminosas y sus rizobios asociados se ha desarrollado desde hace décadas, ya que muchas especies de leguminosas son una gran fuente de alimento tanto para humanos como animales. Debido a esto poseen una gran importancia económica, además de ser de interés ecológico por su potencial como aportadores naturales de nitrógeno al suelo y como colonizadores de suelos pobres o sobreexplotados. El estudio de esta interacción simbiótica comenzó en las especies de leguminosas con mayor importancia productiva, como el poroto, garbanzo, lenteja, trébol, alfalfa, soja, etc., las cuales pertenecen a la subfamilia *Papilionoideae* y son noduladas principalmente por alfarizobios. Por esta razón, el conocimiento sobre esta interacción se concentra principalmente en estas especies de leguminosas y sus rizobios, mientras que el conocimiento de otros modelos, como las *Mimosa* sp. y sus rizobios, se vio postergado (Hassen et al., 2020).

Cuando se reportaron los betarizobios como organismos diazótrofos se abrió todo un nuevo campo de estudio, ya que, aunque algunas especies ya eran estudiadas y solo cambió su taxonomía, también se descubrieron nuevos rizobios. Los betarizobios tienen similitudes con los alfarizobios pero también tienen peculiaridades, quedando muchos aspectos por aclarar sobre cómo establecen esta relación simbiótica, promoción de crecimiento, historia evolutiva, competencia, etc. Además, muchos de estos estudios se desarrollan en organismos modelo de estas bacterias, como son *Paraburkholderia phymatum* o *Cupriavidus taiwanensis*, los cuales, aunque ayudan a su entendimiento, no dejan de ser un caso particular dentro de los betarizobios (Angus et al., 2010).

Este trabajo tiene como enfoque original el estudiar la competencia de cepas nativas de *Cupriavidus* y *Paraburkholderia*, que se desconoce cómo se comportan respecto a los organismos modelo. A esto se suma que se analiza tanto en condiciones gnotobióticas como también en condiciones más naturales, utilizando suelos de nuestro país (de los cuales habían sido aisladas dichas cepas). Esto contribuye a conocer la aptitud de estos rizobios nativos en diferentes condiciones ambientales, porque como ya se sabe, la competitividad de los rizobios es fuertemente dependiente de las condiciones en las que se produce la simbiosis. Además, este trabajo se realiza utilizando modelos vegetales nativos principalmente, como *Mimosa uraguënsis* y *Mimosa pilulifera*, de los cuales hay poca información en la bibliografía. Por estas razones creemos que este trabajo contribuye a un mejor entendimiento de estos organismos y cómo se comportan en las condiciones analizadas, y aportan al conocimiento de la rizósfera de nuestras plantas nativas.

La confirmación como rizobios propiamente dichos se dio para todos los aislamientos pertenecientes a los géneros *Cupriavidus* y *Paraburkholderia*. Esto era esperado, ya que estas bacterias fueron aisladas del interior de nódulos de *Mimosa* spp. Aunque el ensayo se realizó en la planta modelo *Mimosa pudica*, de la cual no fueron aisladas estas cepas, esta planta se caracteriza por su promiscuidad para establecer esta relación, pudiendo establecerla con rizobios de diferentes géneros (Andrews, et al., 2017). Además, estos géneros bacterianos son los preferidos para el establecimiento de esta relación simbiótica con *Mimosa* sp. (Liu, et al., 2012).

Se vieron solo cuatro réplicas que no pudieron nodular, pertenecientes tanto al género *Cupriavidus* (C53, C93) como a *Paraburkholderia* (B83, B113). Sin embargo, en todos los casos, el resto de las réplicas de estas cepas nodularon normalmente, por lo cual se

tomó en conjunto como un fenotipo nod+ fix+. La incapacidad de estas réplicas de establecer esta relación, pudo deberse a errores experimentales como haber inoculado con un menor número de células, o a una varianza fenotípica dentro de las *Mimosa pudica*, que las haya vuelto menos susceptible al establecimiento de ésta relación en estas condiciones particulares.

Respecto a las cepas utilizadas del género *Rhizobium*, la mayoría de éstas no pudieron establecer nódulos (R1 al R4) con *Mimosa pudica*, solo dos cepas identificadas como *Rhizobium mesoamericanum* (R5A y R5B) generaron un fenotipo nod+ fix+. Ya se ha determinado que ciertas especies de *Rhizobium* como *Rhizobium tropici* son incapaces de nodular este modelo (Elliott, et al., 2009). Aunque por el carácter promiscuo de *Mimosa pudica*, ya se ha identificado que establece esta relación con muchas especies de α rizobios (Moulin et al., 2001, Taulé et al., 2012, Klonowska et al., 2012). Además, conociendo la procedencia de dichas cepas (aisladas del interior de nódulo de mimosas) y con su identificación como posibles *Rhizobium* spp. (mediante la secuencia del gen *rrs*), suponemos que no se pudo confirmar su carácter como rizobio propiamente dicho por problemas con el modelo utilizado. Por esta razón, para terminar de confirmar que estas cepas son rizobios propiamente dicho, se debería probar nuevamente en otro modelo vegetal, por ejemplo, de los que fueron aislados (*Mimosa adpressa*, *Mimosa foliolosa* y *Mimosa clausenii*).

Los resultados del ensayo de promoción de crecimiento deben ser considerados teniendo en cuenta que se obtuvieron utilizando la planta modelo *Mimosa púdica*. Ya que la planta utilizada es un factor muy importante que afecta a este ensayo, ya que, si se utilizara otro modelo se podrían obtener resultados completamente diferentes. Para evaluar la promoción de crecimiento de las cepas de este ensayo, se analizó el peso seco y la altura de la parte aérea de las plantas inoculadas con ellas, comparándolo con el control negativo, el cual fueron tratadas con agua destilada estéril únicamente. Ambos parámetros (altura y peso), presentaron una gran dependencia entre sí (de 0,84), dependencia que ya fue encontrada en proporción similar en la planta del maní (*Arachis hypogaea*) (Natera, 2002).

A pesar que la técnica por la cual obtuvimos el peso seco de las plantas estaba muy cerca y hasta por debajo de la apreciación del instrumento (1 mg), se obtuvo una correlación significativa entre las variables, como está informado en la bibliografía (Natera, 2002). Igualmente, esto sirve para futuros ensayos, ya que modificando un poco el procedimiento, como puede ser medir las réplicas en conjunto, se obtendrá un dato más certero y confiable.

Las cepas del género *Cupriavidus* fue el que mostró mayor promoción de crecimiento, el cual agrupó a la cepa que promovió el mayor tamaño y peso de la parte aérea de sus plántulas. Lo siguió el género *Paraburkholderia*, el que no mostró una promoción de crecimiento significativo respecto al tamaño ni al peso de las plantas control. Aunque no hubo promoción de crecimiento significativa, la morfología de los nódulos era de nódulos efectivos y poseía un color rojizo, sugiriendo la presencia de leghemoglobina. La leghemoglobina es una proteína producida por la planta dentro de los nódulos, que proporciona las condiciones ideales para la fijación de nitrógeno. Para que este proceso suceda, tiene que estar presente la nitrogenasa y debe ser funcional, la ausencia de esta enzima o un problema con su funcionalidad pueden explicar la ausencia de promoción observado en dichas cepas.

Para confirmar la presencia de una nitrogenasa funcional se puede desarrollar un experimento de ARA (actividad reductora de acetileno). La enzima nitrogenasa, responsable universalmente de la fijación biológica de N₂, también puede reducir el

acetileno (C₂H₂) a etileno (C₂H₄), los cuales se cuantifican fácilmente mediante cromatografía de gases (Hardy et al. 1968). Este ensayo, proporciona una medida sensible de la actividad de la nitrogenasa en un momento determinado y aunque se puede cuantificar la magnitud de la fijación de N₂ en los nódulos radiculares, este es un proceso tedioso y poco repetitivo.

Finalmente, las cepas pertenecientes al género *Rhizobium* no solo no mostraron promoción de crecimiento vegetal respecto al peso, sino que cuando se analizó el tamaño de las plantas, se vio una disminución significativa respecto al control.

En cuanto al número de nódulos que se produjeron, no se obtuvo una correlación con el tamaño de dichas plantas, en conjunto ni individualmente por género, correlación que esperaríamos a priori. Esto también se puede deber a la funcionalidad de los nódulos y su capacidad de fijar nitrógeno, aspectos que se podrían analizar con un experimento de ARA, como ya se ha dicho anteriormente. Esto permitiría no solo ver la funcionalidad o no de dichos nódulos, sino también la eficiencia para la fijación de nitrógeno que genera cada cepa. A pesar de que no se encontró esta correlación, se observó que las cepas del género *Cupriavidus* fueron las que produjeron un mayor número de nódulos en el ensayo.

Entrando en los ensayos de competencia, se eligieron dos cepas para dichos ensayos, una perteneciente al género *Cupriavidus* (C2, *C. necator*) y otra al género *Paraburkholderia* (B4, *P. terrae*), teniendo en cuenta que presentaron un fenotipo nod+ fix+ en el ensayo anterior y conociendo que fueron extraídas de las plantas modelo utilizadas en estos ensayos. Se usaron dos especies de mimosas para los ensayos de competencia: *M. uragüensis*, de donde se aislaron las dos cepas a probar y *M. pilulifera*, la cual establece relaciones simbióticas preferentemente con *Paraburkholderia* (Pereira-Gómez et al., 2020), observación que nos pareció interesante poner a prueba.

Lamentablemente, no se pudieron obtener datos concluyentes a partir de los ensayos con *M. pilulifera*, tanto en el ensayo en tubo como en macetas. En el primero, no se observaron nódulos con ninguna de las dos cepas utilizadas a los tiempos evaluados (individualmente ni en competencia). Mientras que en el ensayo en macetas la mayoría de las semillas no germinaron correctamente, por lo que se obtuvo un número insuficiente de ejemplares como para realizar el estudio. Respecto a lo observado en el ensayo de competencia en tubo, esto pudo deberse a que la planta no sea capaz de establecer relaciones simbióticas con las cepas analizadas en el ensayo. Esto es posible para la cepa del género *Cupriavidus*, la cual no se ha descrito que nodule este modelo, pero no es probable para la cepa del género *Paraburkholderia*. Para esta última, se vio que bacterias del mismo género nodularon este modelo en el trabajo antecedente. Otra explicación para este suceso es que pueda deberse a que los tiempos juzgados no hayan sido los suficientes y más en las condiciones de estrés hídrico en que se tienen las plantas. Estrés que puede retrasar el proceso de nodulación (Vuong, et al., 2017), aunque en el ensayo se regó únicamente este modelo con agua destilada estéril. Por estas razones, no sabemos con seguridad si estas cepas son incapaces de nodular este modelo o es un resultado producido por un error experimental.

Respecto a la planta modelo *Mimosa uragüensis*, creció satisfactoriamente en ambos ensayos y fue nodulada normalmente, por lo que se obtuvieron resultados a partir de este modelo.

Comenzando con el ensayo de competencia en tubo, ambas cepas fueron capaces de nodular las plantas en estas condiciones, produciendo un fenotipo nod+ fix+. Respecto a los tiempos de nodulación, tanto en *Mimosa púdica* (en el ensayo de nodulación

previo) como en *Mimosa uragüensis* (en este ensayo) mostró una tendencia de que la cepa de *Cupriavidus nodula* más rápidamente que la cepa de *Paraburkholderia*, aunque no fue estadísticamente significativo.

Para analizar la competencia entre cepas, se aislaron y caracterizaron las bacterias presentes en el primer nódulo funcional producido por la planta, asumiendo que las bacterias presentes en el primer nódulo son las más competentes ya que estas bacterias fueron las primeras en establecer esta relación simbiótica. Aunque se han visto modelos en los que las plantas pueden ser noduladas por más de una especie bacteriana, son más la excepción que la regla, por lo que es lógico suponer que las bacterias de los siguientes nódulos iban a ser iguales a las aisladas en este ensayo, aunque sería interesante confirmarlo en un trabajo futuro.

Al ver el resultado de dichos aislamientos, observamos que tanto por el fenotipo de colonia como por los patrones de bandas producidos por el rep-PCR, concluimos que para todas las réplicas, las bacterias dentro del primer nódulo pertenecían al género *Paraburkholderia*. Esto sigue con la línea de resultados obtenidos por Elliott et al. (2009) en los que vieron que *Paraburkholderia phymatum* era ampliamente más competente que *Cupriavidus taiwanensis*, en condiciones controladas. Aunque modificando ciertos parámetros del ensayo, como la disponibilidad de nitrógeno o el pH del medio, esta relación se podía ver un poco modificada, pero nunca invirtiéndose en la misma proporción. Además, aunque C2 resultó ser mejor promotor de crecimiento que B4, esto no implica tener una ventaja sobre su capacidad competidora, ya que este no es un aspecto que afecte la competencia de las cepas directamente porque son procesos separados. Porque, como toda relación mutualista, ésta puede permitir una relación de “engaño” entre la planta y la bacteria y, por lo tanto, que la planta sea nodulada por cepas ineficaces o hasta bacterias que no son rizobios (Le Roux, et al., 2017).

Finalmente, cuando analizamos los tiempos de nodulación del ensayo de competencia, los primeros nódulos aparecen a los 10 días, incluso más rápido que cuando se inoculó C2 únicamente, pero pertenecen a la cepa de *Paraburkholderia*. Este resultado, aunque no tiene una confirmación estadística, quizá por el bajo número de réplicas, mostraría que la competencia entre bacterias favorece el establecimiento de esta relación simbiótica. Ya que, aunque había el mismo número de bacterias por tubo en el ensayo de competencia que los controles con las cepas individuales, esta relación se establece más rápidamente. Además, muestra que la competitividad de las cepas no depende de su velocidad de nodulación individualmente, observación que se sigue debatiendo (Triplett, et al., 1992). Este resultado abre muchas preguntas de porque se observe un aumento en la competitividad de la cepa B4 al ser coinoculada con C2, una hipótesis que planteamos para responder esto es que la cepa de *Paraburkholderia* esta aprovechando de la interacción C2-*Mimosa uragüensis*, como puede ser la producción de factores nod de C2, para luego desplazarla y ella nodular la planta.

El ensayo de competencia en maceta tuvo resultados muy distintos a los que acabamos de analizar, lo cual nos sorprendió, teniendo en cuenta los resultados del ensayo de competencia previos y lo descrito en la bibliografía. Comenzando con este ensayo, vemos que al inocular las cepas individualmente en los sustratos, los aislamientos en estas condiciones son principalmente las cepas inoculadas. Solo la cepa B4 en la tierra del Abra de Zabaleta se obtuvo minoritariamente (dos de trece aislamientos). Esto último es muy peculiar, porque, aunque las cepas nativas están adaptadas a este sustrato, lo que las hace más competentes en él (Vuong, et al., 2017), el sustrato es inoculado con un alto número de bacterias, por lo que se favorece a la cepa inoculante. Esto es lo que sucede en el caso de ambos sustratos inoculados con C2, en los que vemos una amplia mayoría del fenotipo tipo *Cupriavidus*, y en el caso de B4 en el sustrato de la playa El

Calabrés. Esto sugiere que en la tierra del Abra de Zabaleta existirían factores (bióticos o abióticos) que están limitando fuertemente a dicha cepa en particular.

En la competencia en la tierra del Abra de Zabaleta, luego de ver lo que había sucedido con las cepas inoculadas individualmente, era lógico esperar que C2 superara ampliamente a B4, ya que esta última no era competitiva en este sustrato. Respecto a la competencia en la arena de la playa El Calabrés, en este caso no podíamos inferir ningún resultado *a priori*, ya que cuando se inocularon ambas cepas individualmente en este sustrato, ambas fueron las predominantes en los aislamientos en estas condiciones. Al ver el resultado de los rep-PCR de estas muestras, se vio una amplia dominancia de la cepa C2 sobre B4, resultado que nos sorprendió, ya que la cepa B4 fue aislada de nódulos de *Mimosa uragüensis* en este sustrato, por lo que ya se vio que era competente en estas condiciones. Mientras que C2 se enfrentaba por primera vez a este ambiente, aun así, la cepa C2 fue la mayoritaria. Viendo estos resultados podemos concluir que la cepa de *Cupriavidus* es ampliamente más competente que la cepa *Paraburkholderia* en estas condiciones. En el mismo ensayo, se encontró un aislamiento con una cepa identificada como indeterminada, la que mostro un patrón de bandas el cual también fue identificado en la condición control (sin inóculo) en el mismo sustrato. Esta cepa nativa del suelo mostro ser competente aun cuando al sustrato se inoculo con una alta concentración de nuestras bacterias de interés, mostrando que las cepas potencialmente más competentes son las que habitan naturalmente estos sustratos y por lo tanto las que están mas adaptadas a ellos.

Estos ensayos de competencia (en tubo y en maceta) muestran que la cepa de *Paraburkholderia* ve modificada su performance según las condiciones ambientes en las cuales se experimenta. Como ya se ha mencionado antes, el pH del medio es un factor que afecta la competencia de los rizobios. Por esta razón, analizamos el pH tanto de la tierra como de la arena, ambos resultaron con un pH levemente ácidos. Suelos con pH ácidos pueden favorecer la competencia a cepas del género *Paraburkholderia*, mientras que pH neutros o alcalinos se ha visto que favorecen a cepas de *Cupriavidus* (Garau et al., 2009, Estrada-de los Santos et al., 2012). Aunque en teoría este factor estaría favoreciendo la nodulación de la cepa B4, esto no es lo que sucede, por lo que puede ser que nuestras cepas no se comporten como las estudiadas en la bibliografía o posiblemente estén afectando por otros factores como la disponibilidad de nutrientes, la cantidad de materia orgánica, la concentración de nitrógeno, fósforo y metales pesados, entre otros, aspectos que afectan la competitividad de los rizobios (Vuong et al., 2017, Elliott et al., 2009, Guasch- Vidal et al., 2012, Estévez et al., 2009, dos Reis et al., 2010). Teniendo en cuenta las características contrastantes que tienen los suelos, siendo uno un suelo arenoso (playa El Calabrés), mientras que el otro es un suelo sumamente arcilloso (Abra de Zabaleta) con mayor disponibilidad de nutrientes entre otras características, es suposible que hay más factores además del pH que estarían alterando la competencia de estas cepas.

Otro aspecto que contribuye a la competencia entre rizobios, es la especie vegetal con la cual se establecerá esta interacción. Se ha visto que, pares simbióticos con una historia evolutiva compartida, es decir que co-evolucionaron juntos, se ven favorecidos a la hora de establecer esta relación (Rodríguez-Echeverría et al., 2012). Aunque no sea la única especie de rizobio capaz de nodular a esa especie vegetal, ya que se ha visto que la transferencia horizontal de genes relacionados con el establecimiento de esta interacción simbiótica es muy común entre rizobios, hasta con especies no rizobiales (Le Roux et al., 2017). Este aspecto de la interacción no afectaría en este caso, ya que vemos que *Mimosa uragüensis* puede ser nodulada por ambos rizobios. Además, observamos que en diferentes ensayos de competencia, en la cual se inoculan ambas cepas en este modelo, la planta elige a una o otra cepa dependiendo las

condiciones en el cual se da esta interacción. Por lo que inferimos que lo que está afectando principalmente el establecimiento de esta relación simbiótica son las condiciones ambientales del estudio.

Estos resultados hacen cuestionarse la observación del trabajo antecedente, en el cual las cepas aisladas de nódulos de plantas sembradas en la arena de la playa El Calabrés, pertenecen a especies del género *Paraburkholderia* o *Rhizobium*. Esto podría deberse a que en esta playa se encuentran principalmente *Mimosa pilulifera*, que como se vio en el mismo trabajo, se ve nodulada únicamente por especies de *Paraburkholderia*. Esta selección continua hacia este género por parte de la planta, puede llevar al aumento y diversificación de este género bacteriano. Sumado a la adaptación a las condiciones ambientales del medio, pueden lograr que, en estas condiciones naturales, las cepas de *Paraburkholderia* sean las más competitivas en este sustrato en competencia con otros rizobios. Tampoco se puede descartar la hipótesis de que en este sustrato no haya presencia de rizobios más competitivos, como la cepa de *Cupriavidus* analizadas en este trabajo.

Conclusiones y Perspectivas

Como conclusiones de este trabajo, confirmamos el carácter de rizobio para todos los aislamientos de los géneros *Cupriavidus* y *Paraburkholderia*, pero no así para los aislamientos del género *Rhizobium* (solo se confirmó para dos de ellas). Además, el género *Cupriavidus* mostró ser el género con mayor promoción de crecimiento. Respecto a los ensayos de competencia, concluimos que en condiciones gnotobióticas la cepa de *Paraburkholderia*, B4, es más competente que la cepa de *Cupriavidus*, C2, para las plantas estudiadas. En cambio, en el ensayo en macetas, en el cual se suman otros factores, esta relación se invirtió. Como conclusión general de estos ensayos, confirmamos que la competitividad de las cepas nativas estudiadas varía dependiendo del ambiente en que se estudie.

Respecto a las perspectivas hacia futuro de este trabajo, nos planteamos estudiar el carácter de rizobio de las cepas del género *Rhizobium* en otro modelo vegetal y estudiar la funcionalidad de los nódulos producidos por las cepas de este trabajo, mediante ensayos de ARA. Además, podríamos caracterizar la composición de la rizósfera de los suelos estudiados y profundizar en los factores que influyen en la competencia, por ejemplo, modificando las condiciones en las cuales se realiza el ensayo de competencia en tubo. Finalmente queda pendiente estudiar la competitividad de otras cepas de rizobios nativos.

Anexo

Medios de cultivo y soluciones

Medio YMA

Componentes	Cantidad por litro
Manitol	10,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
YE	0,5 g
Agar	8,0 g
H ₂ O c.s.p.	1 litro

Se ajusta el pH a 6,8 – 7 y se esteriliza a 121°C por 10 minutos. Si no se le coloca el agar se produce el YMB (Yeast Manitol Broth)

Medio Jensen

Componentes	Cantidad por litro
CaHPO ₄	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃	0,1 g
Solución de micronutrientes	1,0 ml
Agar	8,0 g
H ₂ O c.s.p.	1 litro

Se ajusta el pH a 6,8 – 7 y se esteriliza a 121°C por 20 minutos.

Solución de micronutrientes

Componentes	Cantidad por litro
H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ . 3H ₂ O	2,03 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,08 g
MoO ₃ . H ₂ O	0,09 g

Agar-agua

Componentes	Cantidad por litro
Agar	8,0 g
H ₂ O c.s.p.	1 litro

Se esteriliza a 121°C por 20 minutos.

Buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X

Componentes	Cantidad por litro
Tris Base	54,0 g
Acido Borico	27,5 g
EDTA 0,5M	20,0 ml
H ₂ O c.s.p.	1 litro

Se trabajó con una solución 0,5X obtenida por dilución de la solución stock 5X.

LB

Componentes	Cantidad por litro
Triptona	10,0 g
NaCl	10,0 g
YE	5,0 g
Agar	8,0 g
H ₂ O c. s. p.	1 litro

Se ajusta el pH a 6,8 – 7 y se esteriliza a 121°C por 20 minutos.

Geles de electroforesis

En las siguientes figuras se muestran los geles realizados para visualizar el producto de los rep-PCR obtenidos del ensayo de competencia en macetas. Se visualizan las muestras bajo la condición de la cual fue aislada (A: tierra inoculada con C2, B: tierra inoculada con B4, C: tierra inoculada con ambas cepas, D: tierra inoculada con agua estéril, E: arena inoculada con C2, F: arena inoculada con B4, G: arena inoculada con ambas cepas, H: arena inoculada con agua estéril), la cepas control (C2 y B4) y el marcador de peso molecular (MPM).

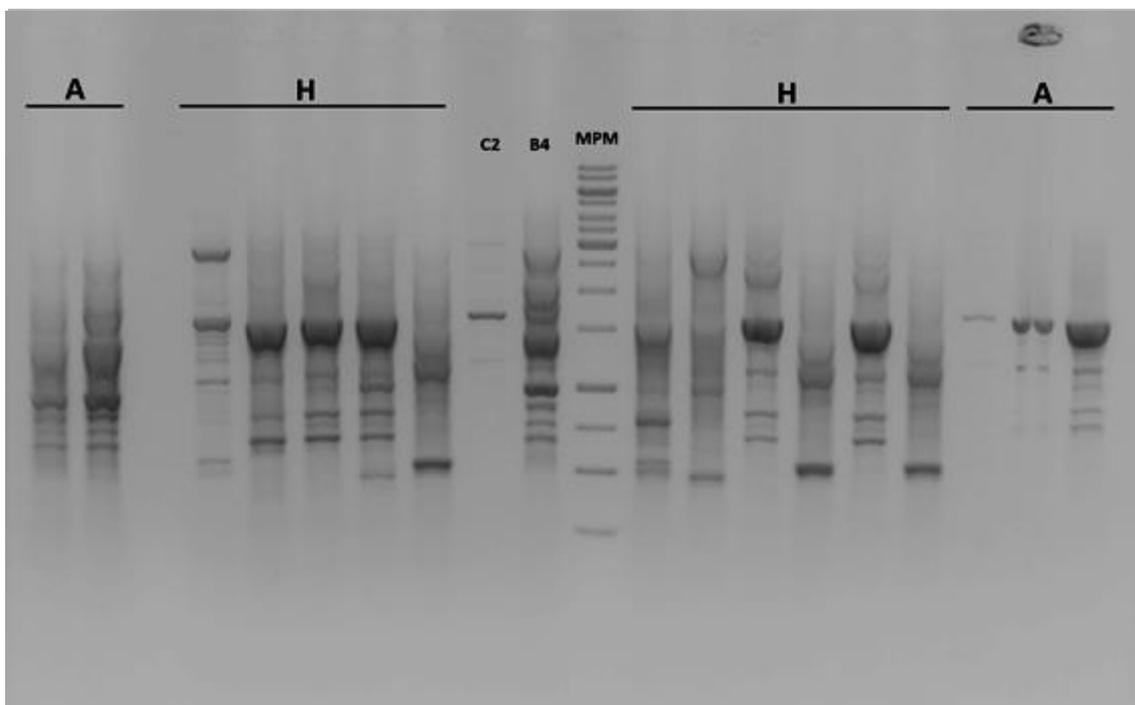


Figura 1. Gel rep-PCR. En este gel se muestran las dos cepas a prueba (C2 y B4) seguidas del marcador de peso molecular (MPM), además se ve el resultado de la rep-PCR de cinco aislamientos de la condición A y diez aislamientos de la condición H.

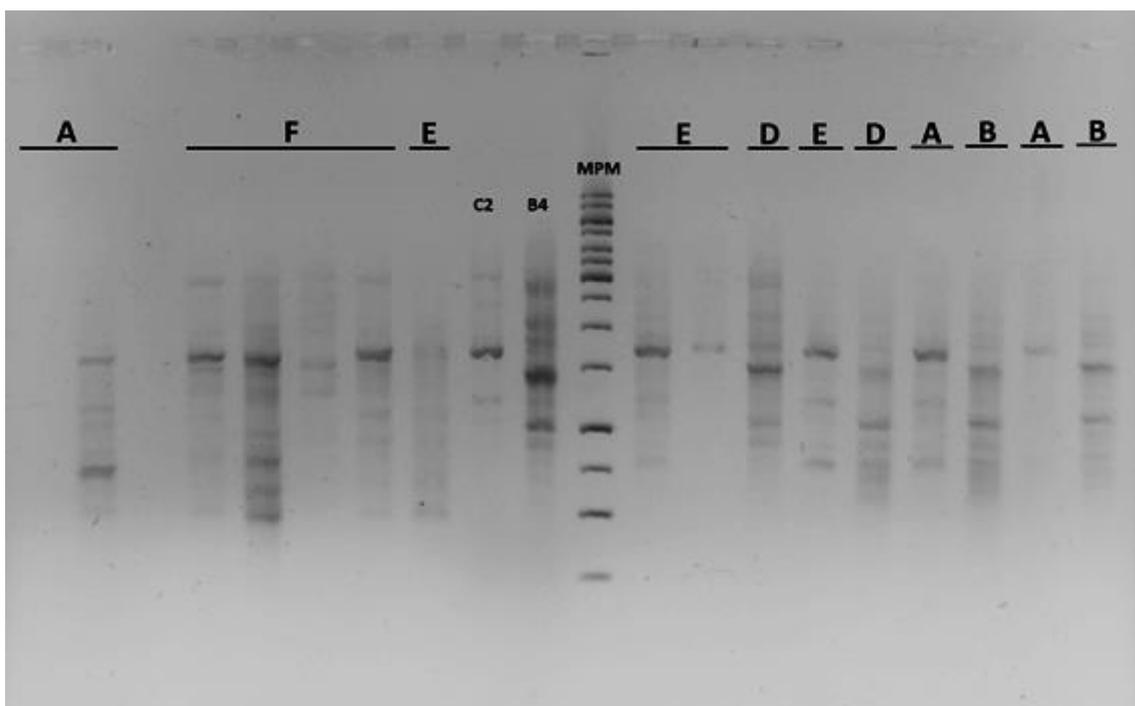


Figura 2. Gel rep-PCR. En este gel se muestran las dos cepas a prueba (C2 y B4) seguidas del marcador de peso molecular (MPM), además se ve el resultado de la rep-PCR de cuatro aislamientos de las condiciones E, A y F, y dos aislamientos de las condiciones D y B.

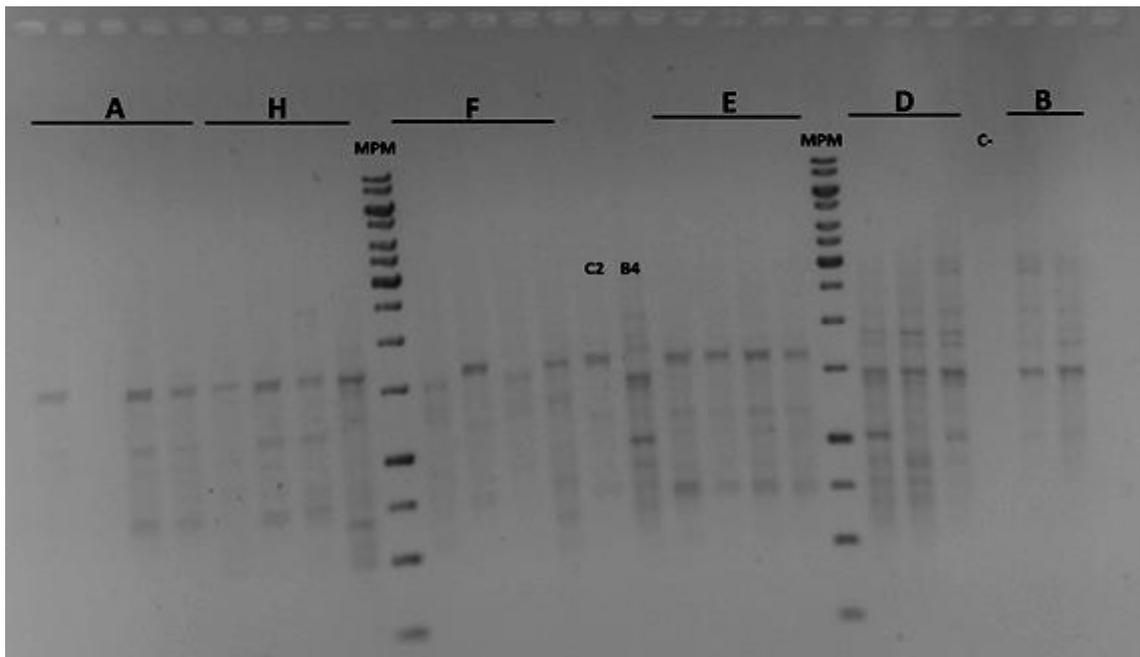


Figura 3. Gel rep-PCR. En este gel se muestran las dos cepas a prueba (C2 y B4), el marcador de peso molecular (MPM), además se ve el resultado de la rep-PCR de cuatro aislamientos de las condiciones A, H, E y F, dos aislamientos de la condición B, y tres aislamientos de la condición D.

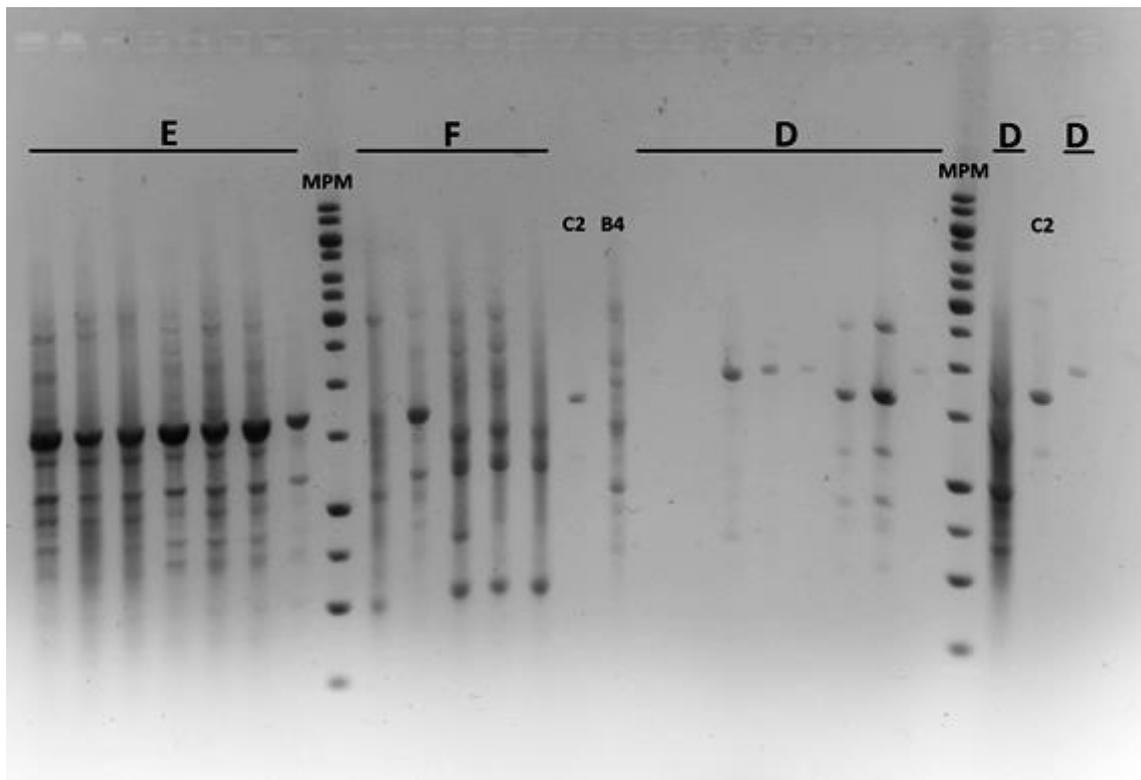


Figura 4. Gel rep-PCR. En este gel se muestran las dos cepas a prueba (C2 y B4), el marcador de peso molecular (MPM), además se ve el resultado de la rep-PCR de siete aislamientos de la condición E, diez aislamientos de la condición D y cinco de la condición F.

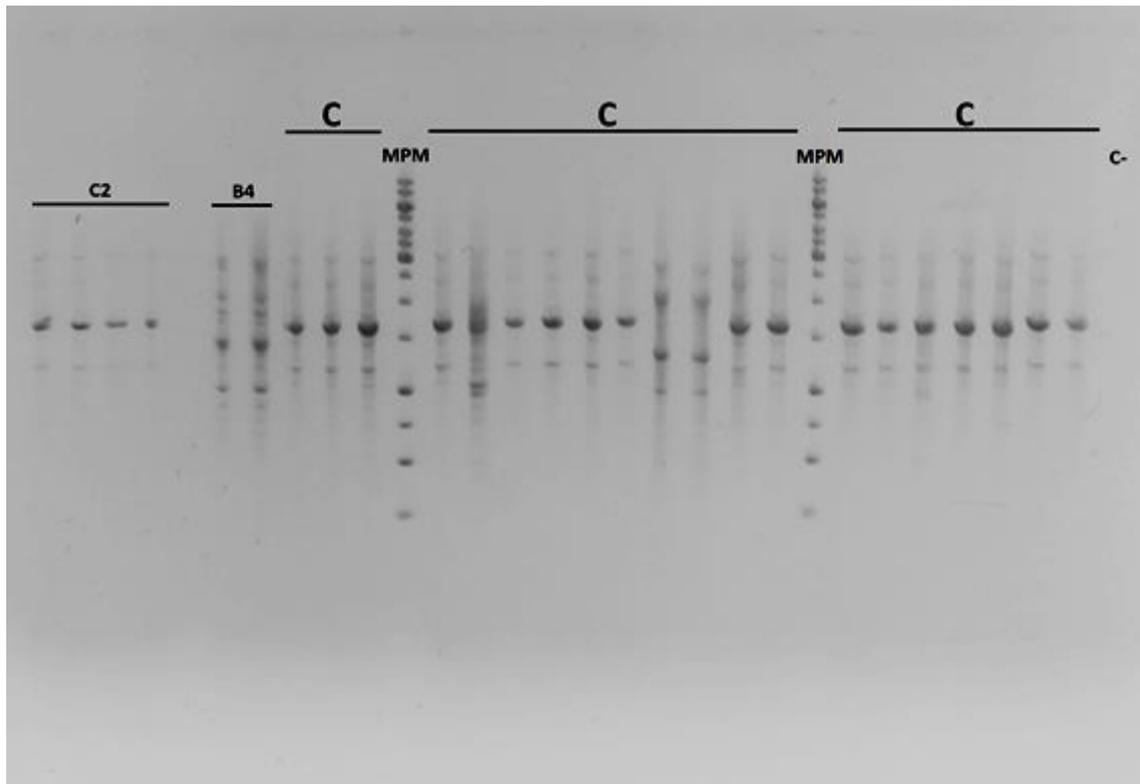


Figura 5. Gel rep-PCR. En este gel se muestran las dos cepas a prueba (C2 y B4), el marcador de peso molecular (MPM), además se ve el resultado de la rep-PCR de veinte aislamientos de la condición A.

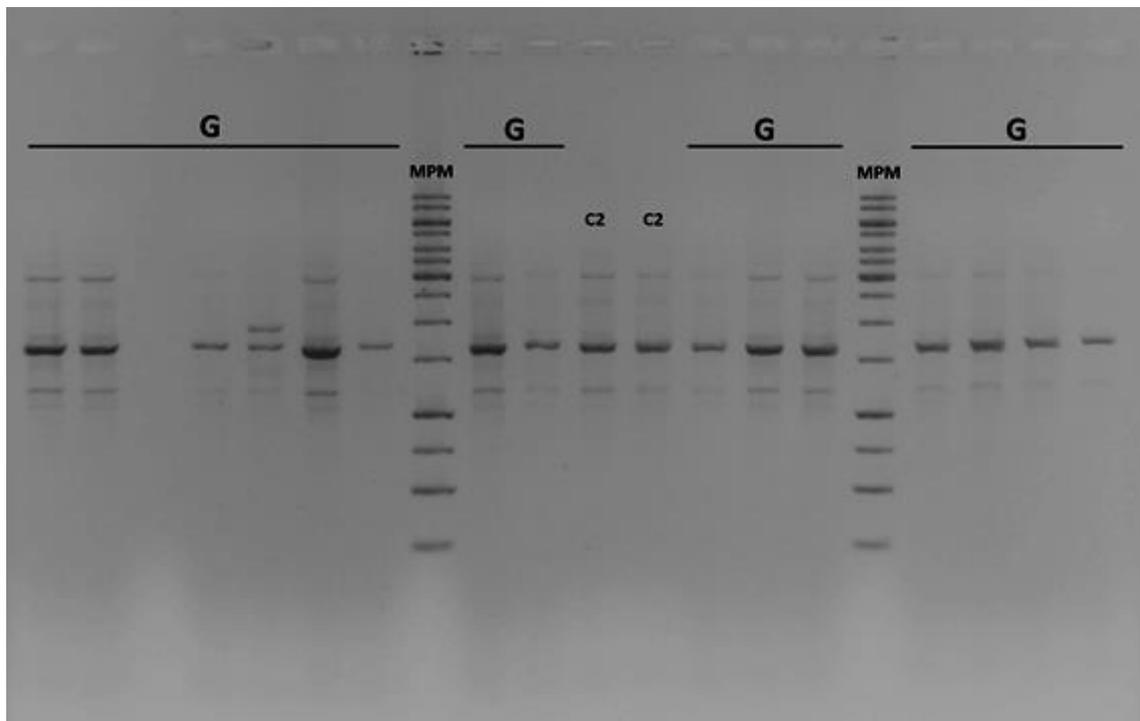


Figura 6. Gel rep-PCR. En este gel se muestran las dos cepas a prueba (C2), el marcador de peso molecular (MPM), además se ve el resultado de la rep-PCR de quince aislamientos de la condición G.

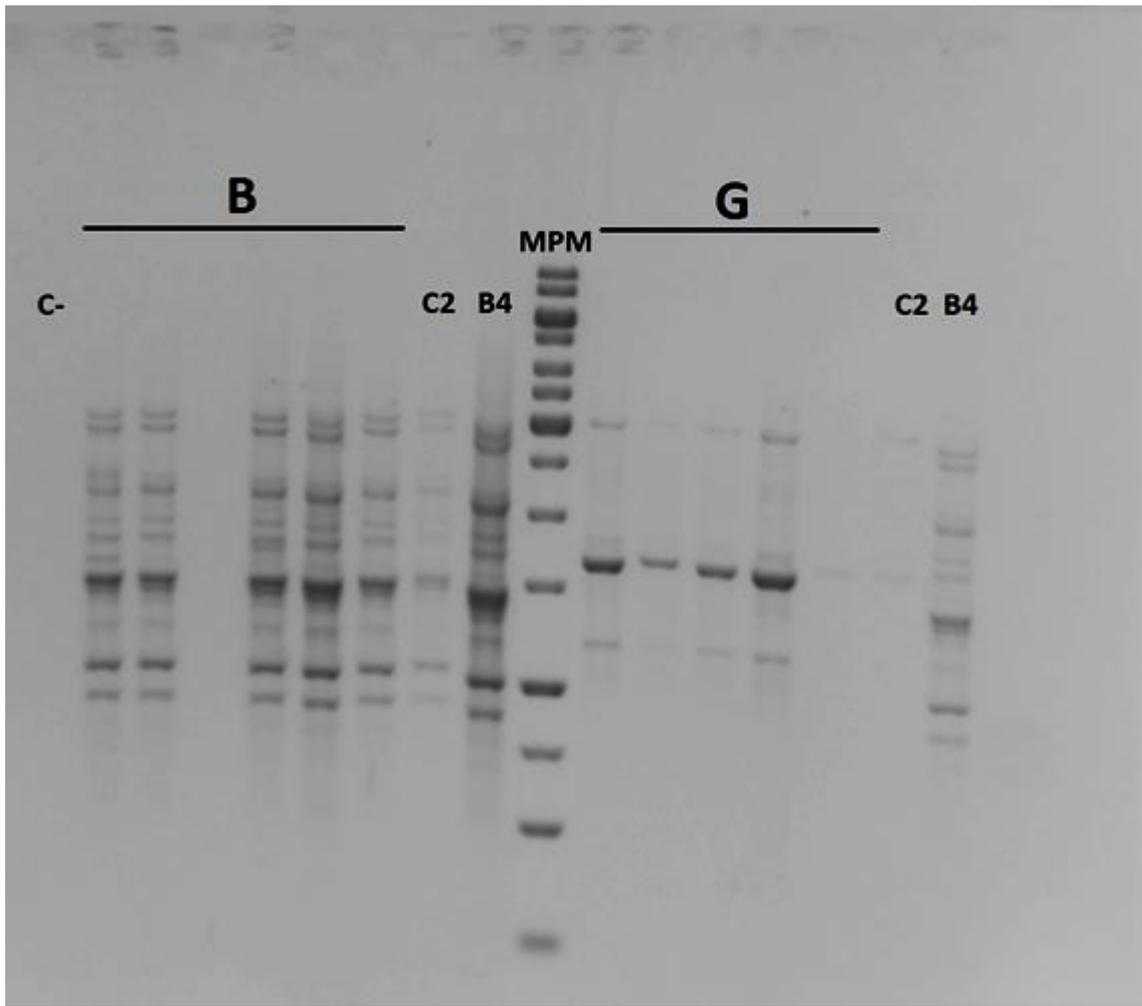


Figura 7. Gel rep-PCR. En este gel se muestran las dos cepas a prueba (C2 y B4), el marcador de peso molecular (MPM), además se ve el resultado de la rep-PCR de cinco aislamientos de las condiciones B y G.

Bibliografía

1. Andrews, Mitchell, y Morag E. Andrews. 2017. «Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses». *International Journal of Molecular Sciences* 18(4).
2. Angus, Annette A., y Ann M. Hirsch. 2010. «Insights into the history of the legume-betaproteobacterial symbiosis». *Molecular Ecology* 19(1): 28-30.
3. Azcón-Bieto, J. & Talón, M. 2003. *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGrawHill. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
4. Beretta, Andrés, Daniel Bassahum, y Raquel Musselli. 2014. «¿Medir el pH del suelo en la mezcla suelo: agua en reposo o agitando?» *Agrociencia Uruguay* 18(2): 90-94.
5. Bontemps, Cyril et al. 2010. «Burkholderia species are ancient symbionts of legumes». *Molecular Ecology* 19(1): 44-52.
6. Burgess, Barbara K., y David J. Lowe. 1996. «Mechanism of Molybdenum Nitrogenase». *Chemical Reviews* 96(7): 2983-3012.
7. Caetano-Anollés, G., y P. M. Gresshoff. 1991. «Plant genetic control of nodulation». *Annual Review of Microbiology* 45: 345-82.
8. Camargo-Ricalde, Sara Lucía et al. 2015. «Especies útiles del género Mimosa (Fabaceae-Mimosoideae) en México». *Botanical Sciences* (68): 33-44.
9. Chen, W. M. et al. 2001. «*Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51(Pt 5): 1729-35.
10. Crews, T. E, y M. B Peoples. 2004. «Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs». *Agriculture, Ecosystems & Environment* 102(3): 279-97.
11. Darnajoux, Romain et al. 2019. «Molybdenum threshold for ecosystem scale alternative vanadium nitrogenase activity in boreal forests». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(49): 24682-88.
12. de Bruijn, F.J., 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58, 2180–2187.
13. Elliott, Geoffrey N. et al. 2009. «*Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of Mimosa, particularly under N-limited conditions». *Environmental Microbiology* 11(4): 762-78.
14. Estévez, J., M. S. Dardanelli, M. Megías, y D. N. Rodríguez-Navarro. 2009. «Symbiotic performance of common bean and soybean co-inoculated with rhizobia and *Chryseobacterium balustinum* Aur9 under moderate saline conditions». *Symbiosis* 49(1): 29-36.
15. Estrada-de los Santos, Paulina et al. 2018. «Whole Genome Analyses Suggests that *Burkholderia* sensu lato Contains Two Additional Novel Genera (*Mycetohabitans* gen. nov., and *Trinickia* gen. nov.): Implications for the Evolution of Diazotrophy and Nodulation in the Burkholderiaceae». *Genes* 9(8): 389.

16. Estrada-de Los Santos P, Martínez-Aguilar L, López-Lara IM, Caballero-Mellado J. 2012. *Cupriavidus alkaliphilus* sp. nov, a new species associated with agricultural plants that grow in alkaline soils. *Syst Appl Microbiol* 35:310–314. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2012.05.005>.
17. Fernández-Pascual, Mercedes, Nuria de María, y M^a Rosario de Felipe. 2002. «Fijación biológica del nitrógeno: factores limitantes». <https://digital.csic.es/handle/10261/128283>
18. Franche, Claudine, Kristina Lindström, y Claudine Elmerich. 2009. «Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants». *Plant and Soil* 321(1): 35-59.
19. Gage, Daniel J. 2004. «Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes». *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 68(2): 280-300.
20. Garabato, Florencia. 2018. «Descripcion de nuevos rizobios asociados a leguminosas nativas». <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/21379>
21. Garau, G., Yates, R. J., Deiana, P., & Howieson, J. G. 2009. Novel strains of nodulating Burkholderia have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(1), 125–134. doi:10.1016/j.soilbio.2008.10.011
22. Grether, Rosaura, Sara Lucía Camargo-Ricalde, y Angélica Martínez-Bernal. 2015. «Especies Del Género Mimosa (Leguminosae) Presentes En México». *Botanical Sciences* (58): 149-52.
23. Guasch -Vidal, B. et al. 2012. «High NaCl Concentrations Induce the nod Genes of *Rhizobium tropici* CIAT899 in the Absence of Flavonoid Inducers». *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 26(4): 451-60.
24. Hardy, R. W. F., R. D. Holsten, E. K. Jackson, y R. C. Burns. 1968. «The Acetylene-Ethylene Assay for N₂ Fixation: Laboratory and Field Evaluation». *Plant Physiology* 43(8): 1185-1207.
25. Hassen, A.I., Lamprecht, S.C., Bopape, F.L., 2020. Emergence of β -rhizobia as new root nodulating bacteria in legumes and current status of the legume-rhizobium host specificity dogma. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 40. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-2811-x>
26. Hirsch, Ann M., Michelle R. Lum, y J. Allan Downie. 2001. «What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special?» *Plant Physiology* 127(4): 1484-92.
27. Hoffman, Brian M. et al. 2014. «Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage». *Chemical Reviews* 114(8): 4041-62.
28. Hoffman, Brian M., Dmitriy Lukoyanov, Dennis R. Dean, y Lance C. Seefeldt. 2013. «Nitrogenase: a draft mechanism». *Accounts of Chemical Research* 46(2): 587-95.
29. Izaguirre, P., y R. Beyhaut. 1998. «Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte 1: Papilionoideae». <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=UY2006004890>

30. Izaguirre, P., y R. Beyhaut.. 2003. «Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte 2: Caesalpinioideae. Parte 3: Mimosoideae». <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=UY2006004891>
31. Izaguirre, P., y R. Beyhaut.. 2009. «Nuevas especies del género Mimosa de las subseries Axillares y Reptantes (Mimosoideae - Leguminosae) en el distrito uruguayense de la Región Neotropical». *ResearchGate* 44 (3-4): 351-59.
32. Jones, Kathryn M. et al. 2007. «How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium – Medicago model». *Nature Reviews Microbiology* 5(8): 619-33.
33. Kergoat, Gael J. et al. 2011. «Phylogenetics, species boundaries and timing of resource tracking in a highly specialized group of seed beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59(3): 746-60.
34. Klonowska, Agnieszka et al. 2018. «Transcriptomic profiling of Burkholderia phymatum STM815, Cupriavidus taiwanensis LMG19424 and Rhizobium mesoamericanum STM3625 in response to Mimosa pudica root exudates illuminates the molecular basis of their nodulation competitiveness and symbiotic evolutionary history». *BMC Genomics* 19(1): 105.
35. Klonowska, A., Chaintreuil, C., Tisseyre, P., Miché, L., Melkonian, R., Ducouso, M., Laguerre, G., Brunel, B., Moulin, L., 2012. Biodiversity of Mimosa pudica rhizobial symbionts (Cupriavidus taiwanensis, Rhizobium mesoamericanum) in New Caledonia and their adaptation to heavy metal-rich soils. *FEMS Microbiol Ecol* 81, 618–635. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01393.x>
36. Lewis, G. P. et al. 2013. «A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context — A tool for collections management and taxon sampling». *South African Journal of Botany* 89: 76-84.
37. Lira, Mario A., Luciana R. S. Nascimento, y Giselle G. M. Fracetto. 2015. «Legume-rhizobia signal exchange: promiscuity and environmental effects». *Frontiers in Microbiology* 6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4561803/>
38. Liu, XiaoYun et al. 2012. «Burkholderia and Cupriavidus Spp. Are the Preferred Symbionts of Mimosa Spp. in Southern China». *FEMS microbiology ecology* 80(2): 417-26.
39. Lloret, Lourdes, y Esperanza Martínez-Romero. 2005. «Evolution and phylogeny of rhizobia». *Revista Latinoamericana De Microbiologia* 47(1-2): 43-60.
40. Lodeiro, A.; Lopez García, S; Mongiardini, E; Quelas, J. y Peticari, A. (2003). Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación simbiótica de nitrógeno. *Microbiología Agrícola*. 275 pp.
41. Louws, F J, D W Fulbright, C T Stephens, y F J de Bruijn. 1994. «Specific genomic fingerprints of phytopathogenic Xanthomonas and Pseudomonas pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR.» *Applied and Environmental Microbiology* 60(7): 2286.
42. Mackay, Duncan. 2010. «The Ecology and Evolution of Ant–plant Interactions». *Austral Ecology* 35(1): 116-17.

43. Martínez-Romero, Esperanza. 2009. «Coevolution in Rhizobium-legume symbiosis?» *DNA and cell biology* 28(8): 361-70.
44. Mathesius, U. et al. 1998. «Auxin Transport Inhibition Precedes Root Nodule Formation in White Clover Roots and Is Regulated by Flavonoids and Derivatives of Chitin Oligosaccharides». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 14(1): 23-34.
45. McKhann, H. I., y A. M. Hirsch. 1994. «Does Rhizobium avoid the host response?» *Current Topics in Microbiology and Immunology* 192: 139-62.
46. Meeks, John C., y Jeff Elhai. 2002. «Regulation of Cellular Differentiation in Filamentous Cyanobacteria in Free-Living and Plant-Associated Symbiotic Growth States». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(1): 94-121.
47. Miller, A. J., y M. D. Cramer. 2005. «Root Nitrogen Acquisition and Assimilation». *Plant and Soil* 274(1): 1-36.
48. Moulin, L., Mornico, D., Melkonian, R., Klonowska, A., 2013. Draft Genome Sequence of *Rhizobium mesoamericanum* STM3625, a Nitrogen-Fixing Symbiont of *Mimosa pudica* Isolated in French Guiana (South America). *Genome Announc* 1. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00066-12>
49. Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus, y C. Boivin-Masson. 2001. «Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria». *Nature* 411(6840): 948-50.
50. Mus, Florence et al. 2018. «Exploring the alternatives of biological nitrogen fixation». *Metallomics: Integrated Biometal Science* 10(4): 523-38.
51. Mus, Florence, Daniel R. Colman, John W. Peters, y Eric S. Boyd. 2019. «Geobiological feedbacks, oxygen, and the evolution of nitrogenase». *Free Radical Biology and Medicine* 140: 250-59.
52. Natera, Jesús Rafael Méndez. 2002. «Relación entre el peso seco total y los caracteres vegetativos y la nodulación de plantas de maní (*Arachis hypogaea* L.)». *Revista Científica UDO Agrícola* 2(1): 46-53.
53. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2006, «Datos sorprendentes sobre las legumbres que quizás desconocías», <http://www.fao.org/zhc/detail-events/es/c/358239/>
54. Pallás, V., C. Escobar, P. Rodríguez.Palenzuela, y J.F Marcos. 2008. «Herramientas Biotecnológicas en Fitopatología». *Ciencia e investigación agraria* 35(1): 87-87.
55. Pankievicz, Vânia C. S., Thomas B. Irving, Lucas G. S. Maia, y Jean-Michel Ané. 2019. «Are we there yet? The long walk towards the development of efficient symbiotic associations between nitrogen-fixing bacteria and non-leguminous crops». *BMC Biology* 17(1): 99.
56. Penttinen, Petri, Leena A. Räsänen, Gilles Lortet, y Kristina Lindström. 2013. «Stable isotope labelling reveals that NaCl stress decreases the production of Ensifer (*Sinorhizobium*) *arboris* lipochitooligosaccharide signalling molecules». *FEMS Microbiology Letters* 349(2): 117-26.
57. Pereira-Gómez, M., Ríos, C., Zabaleta, M., Lagurara, P., Galvalisi, U., Iccardi, P., Azziz, G., Battistoni, F., Platero, R., Fabiano, E., 2020. Native legumes of the

- Farrapos protected area in Uruguay establish selective associations with rhizobia in their natural habitat. *Soil Biology and Biochemistry* 148, 107854. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107854>
58. Perret, X., C. Staehelin, y W. J. Broughton. 2000. «Molecular basis of symbiotic promiscuity». *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 64(1): 180-201.
 59. Peters, John W., Karl Fisher, y Dennis R. Dean. 1995. «Nitrogenase Structure and Function: A Biochemical-Genetic Perspective». *Annual Review of Microbiology* 49: 335-67.
 60. Polhill, Roger. 1981. *Advances in Legume Systematics*. ed. P. H. Raven. Royal Botanic Gardens.
 61. Raymond, Jason, Janet L. Siefert, Christopher R. Staples, y Robert E. Blankenship. 2004. «The natural history of nitrogen fixation». *Molecular Biology and Evolution* 21(3): 541-54.
 62. dos Reis, Fábio Bueno et al. 2010. «Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil». *The New Phytologist* 186(4): 934-46.
 63. van Rhijn, P, y J Vanderleyden. 1995. «The Rhizobium-plant symbiosis.» *Microbiological Reviews* 59(1): 124-42.
 64. Ríos Mendaro, Cecilia. 2014. «Estudio de bacterias simbiotes de leguminosas nativas : aportes para la conservación de la biodiversidad en un área protegida de Uruguay». UR. FC. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/6403>
 65. Roche, P. et al. 1991. «Molecular Basis of Symbiotic Host Specificity in *Rhizobium Meliloti*: NodH and NodPQ Genes Encode the Sulfation of Lipooligosaccharide Signals». *Cell* 67(6): 1131-43.
 66. Richardson, A. E., Djordjevic, M. A., Rolfe, B. G., & Simpson, R. J. 1988. Effects of pH, Ca and Al on the exudation from clover seedlings of compounds that induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, 109(1), 37–47. doi:10.1007/bf02197578
 67. Rodríguez-Echeverría, Susana, Susana Fajardo, Beatriz Ruiz-Díez, y Mercedes Fernández-Pascual. 2001. «Differential effectiveness of novel and old legume–rhizobia mutualisms: implications for invasion by exotic legumes». *Oecologia* 170(1): 253-61.
 68. Roux, Johannes J. Le, Cang Hui, Jan-Hendrik Keet, y Allan G. Ellis. 2017. «Co-introduction vs ecological fitting as pathways to the establishment of effective mutualisms during biological invasions». *New Phytologist* 215(4): 1354-60.
 69. Rubiales, Diego, y Aleksandar Mikic. 2015. «Introduction: Legumes in Sustainable Agriculture». *Critical Reviews in Plant Sciences* 34(1-3): 2-3.
 70. Rubio, Luis M., y Paul W. Ludden. 2005. «Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle». *Journal of Bacteriology* 187(2): 405-14.
 71. Safronova, Vera et al. 2019. «Two Broad Host Range Rhizobial Strains Isolated From Relict Legumes Have Various Complementary Effects on Symbiotic

- Parameters of Co-Inoculated Plants». *Frontiers in Microbiology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00514/full>
72. Sandes Bufano, Laura. 2015. «Análisis de Cupriavidus aislados de mimosas nativas de Uruguay». UR. FC. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/8226>
 73. Schue, Mathieu et al. 2011. «Modulation of Metabolism and Switching to Biofilm Prevail over Exopolysaccharide Production in the Response of Rhizobium Alamii to Cadmium». *PLOS ONE* 6(11): e26771.
 74. Somasegaran, Padma, y Heinz J. Hoben. 2012. *Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium Technology*. Springer Science & Business Media.
 75. Sprent, J. I., J. K. Ardley, y E. K. James. 2013. «From North to South: A latitudinal look at legume nodulation processes». *South African Journal of Botany* 89: 31-41.
 76. Sprent, J. I. 1989. Which steps are essential for the formation of functional legume nodule?. *New Phytologist*, 111: 129-153. doi:10.1111/j.1469-8137.1989.tb00675.x
 77. Sprent, J.I. 1979. *The Biology of Nitrogen-fixing Organisms*. McGraw-Hill. <https://books.google.com.uy/books?id=YJIFAQAIAAJ>.
 78. Streng, Arend, Rik op den Camp, Ton Bisseling, y René Geurts. 2011. «Evolutionary origin of rhizobium Nod factor signaling». *Plant Signaling & Behavior* 6(10): 1510-14.
 79. Stevens, P. F. 2001. *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 14, July 2017, <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
 80. Taiz, L., Zeiger, E., 2010. *Plant Physiology*. Sinauer Associates
 81. Taulé, C., Zabaleta, M., Mareque, C., Platero, R., Sanjurjo, L., Sicardi, M., Frioni, L., Battistoni, F., Fabiano, E., 2012. New Betaproteobacterial Rhizobium Strains Able To Efficiently Nodulate Parapiptadenia rigida (Benth.) Brenan. *Appl Environ Microbiol* 78, 1692–1700. <https://doi.org/10.1128/AEM.06215-11>
 82. The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *TAXON* 66(1): 44-77.
 83. The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). 2013. «Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades». *TAXON* 62(2): 217-48.
 84. Triplett, E. W., y M. J. Sadowsky. 1992. «Genetics of competition for nodulation of legumes». *Annual Review of Microbiology* 46: 399-428.
 85. Valavanidis, Athanasios, y Thomais Vlachogianni. 2013. «Chapter 8 - Plant Polyphenols: Recent Advances in Epidemiological Research and Other Studies on Cancer Prevention». En *Studies in Natural Products Chemistry, Studies in Natural Products Chemistry*, ed. Atta-ur-Rahman. Elsevier, 269-95. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444626158000084>

86. Velazquez, Encarna, y Luis R. Silva and Alvaro Peix. 2010. 6 Legumes: A Healthy and Ecological Source of Flavonoids. 2.^a ed. [10.2174/157340110791233247](https://doi.org/10.2174/157340110791233247)
87. von Rozycki, T., Nies, D.H., 2009. Cupriavidus metallidurans: evolution of a metal-resistant bacterium. Antonie Van Leeuwenhoek 96, 115–139. <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9284-5>
88. Vuong, Holly B., Peter H. Thrall, y Luke G. Barrett. 2017. «Host species and environmental variation can influence rhizobial community composition». Journal of Ecology 105(2): 540-48.
89. Wais, R. J., Keating, D. H. y Long, S. R. 2002. Structure-Function Analysis of Nod Factor-Induced Root Hair Calcium Spiking in Rhizobium-Legume Symbiosis. PLANT PHYSIOLOGY, 129(1), 211–224. doi:10.1104/pp.010690
90. Wang, Wei-Lei, J. Keith Moore, Adam C. Martiny, y François W. Primeau. 2019. «Convergent estimates of marine nitrogen fixation». Nature 566(7743): 205-11.