



Facultad de Ciencias  
*Universidad de la República*



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

**Facultad de Ciencias  
Licenciatura en Bioquímica**

# **Análisis fenotípico y genético de rizobios asociados a leguminosas presentes en los esteros de Farrapos e islas del río Uruguay**

**Paula Lagurara**

**Tutora: Dra. Elena Fabiano**

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

**Octubre 2014**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar a mi familia, quienes me enseñaron a que todo lo que vale la pena, y lo esencial que es no darse por vencido frente a las dificultades que se presentan en el camino que uno ha elegido recorrer. Pero por sobre todo, por el apoyo incondicional!

A Martín, mi compañero y amigo, quien ha sabido acompañarme con paciencia en todos los momentos de locura y mal humor.

Sin duda a Elena por darme la oportunidad de formar parte del laboratorio, y conocer un excelente grupo de personas y compañeros de trabajo. Mil gracias a todos los compañeros del Depto. de Genómica y Bioquímica Microbianas, pero sobre todo a Ceci y Cinti por la “tutoría” y el apoyo hasta último momento durante estos tres años; y obviamente a Dani y María quienes con mucha paciencia también me ayudaron en este camino.

Por último, pero no menor, a mis amigas de la facu, con quienes compartí mil horas de estudio y quienes siempre me hicieron ver que de alguna forma si era posible.

**Muchas gracias a todos!!!**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. El nitrógeno y su biodisponibilidad.....	3
1.1.2. Fijación Biológica de Nitrógeno.....	4
1.1.3. Bacterias fijadoras de nitrógeno: rizobios .....	6
1.1.4. Transferencia horizontal de genes.....	7
<b>1.2 MACROSIMBIONTE.....</b>	<b>8</b>
1.2.1. Leguminosas.....	8
1.2.2. Importancia agro-económica .....	9
1.2.3. Leguminosas en Uruguay.....	9
<b>1.3. SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA .....</b>	<b>10</b>
1.3.1. Diálogo molecular .....	10
1.3.2. Formación del nódulo.....	11
<b>1.4. ¿POR QUÉ ESTEROS DE FARRAPOS? .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5. ANTECEDENTES .....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. LEGUMINOSAS PROSPECTADAS Y COLECTA DE NÓDULOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. AISLAMIENTO DE BACTERIAS SIMBIÓTICAS.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....</b>	<b>20</b>
3.3.1. Morfología.....	20
3.3.2. Fisiología .....	20
3.3.2.1. Crecimiento en diferentes condiciones de pH y en diferentes medios ..	20

3.3.2.2. <i>Evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfato inorgánico, producción de sideróforos y celulasas</i> .....	21
<b>3.4. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA</b> .....	<b>22</b>
3.4.1. Extracción de ADN genómico .....	22
3.4.2. Amplificación del gen del ADN ribosomal 16S.....	23
3.4.3. Amplificación del gen <i>nifH</i> .....	24
<b>4.1. OBTENCIÓN DE LOS MICROSIMBIONTES</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA</b> .....	<b>26</b>
4.2.1. Secuenciación y análisis filogenético del gen ribosómico 16S .....	26
4.2.2. Amplificación y secuenciación del gen <i>nifH</i> .....	29
<b>4.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA</b> .....	<b>29</b>
4.3.1. Fisiología .....	29
4.3.1.1. <i>Crecimiento a diferentes pHs en medio sólido y líquido</i> .....	29
4.3.1.2. <i>Evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfato inorgánico de las cepas, producción de sideróforos, celulasas y crecimiento en medio TY y LB...</i>	35
4.3.2. Morfología .....	37
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>39</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>42</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>42</b>
<b>8. ANEXO</b> .....	<b>43</b>
8.1. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES .....	43
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>47</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Sistemática de rizobios basada en el análisis de la secuencia del ARN ribosomal que codifica para la subunidad 16S y algunas especies de leguminosas hospederas de los mismos.....	7
<b>Tabla 2.</b> Procedencia de los aislamientos bacterianos.....	19
<b>Tabla 3.</b> Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados. ....	24
<b>Tabla 4.</b> Género determinado para las doce cepas estudiadas y su correspondiente hospedero vegetal.....	28
<b>Tabla 5.</b> Géneros bacterianos con homólogos más cercanos a los genes <i>nifH</i> y 16S secuenciados.....	29
<b>Tabla 6.</b> Valores del tiempo de generación (g) a pH óptimo y mínimo, así como también de la fase lag para cada aislamiento.....	35
<b>Tabla 7.</b> Resultados de la morfología y los estudios fisiológicos de los doce aislamientos.....	38
<b>Tabla 8.1.</b> Composición del medio YMA+G.....	43
<b>Tabla 8.2.</b> Composición del medio LB.....	43
<b>Tabla 8.3.</b> Composición del medio TY.....	44
<b>Tabla 8.4.</b> Composición del medio CAS.....	44
<b>Tabla 8.5.</b> Composición de la solución TAE.....	45
<b>Tabla 8.6.</b> Composición del medio NBrip .....	45
<b>Tabla 8.7.</b> Composición del buffer de PCR.....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo del nitrógeno en el ecosistema terrestre.....	4
<b>Figura 2.</b> Reacciones de óxido-reducción catalizadas por los componentes I (FeMo-proteína) y II (Fe-proteína) del sistema enzimático nitrogenasa. ....	5
<b>Figura 3.</b> Reacción de reducción del N <sub>2</sub> catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa.....	5
<b>Figura 4.</b> Estructura general de los Factores Nod (A) y de los flavonoides (B).....	11
<b>Figura 5.</b> Invasión de la raíz por <i>Sinorhizobium meliloti</i> . ....	12
<b>Figura 6.</b> Proceso de endocitosis y diferenciación a bacteroide. ....	13
<b>Figura 7.</b> Ubicación de los esteros de Farrapos e islas del Río Uruguay. ....	14
<b>Figura 8.</b> Localización de los sitios de colecta de las leguminosas.....	18
<b>Figura 9.</b> Etapas en la generación de la colección de microsimbiontes.....	26
<b>Figura 10.</b> Electroforesis en gel de agarosa del gen que codifica para la subunidad ribosomal16S.....	27
<b>Figura 11.</b> Filogenia construida a partir de la secuenciación del gen ADNr 16S.....	28
<b>Figura 12.</b> Fotos de los doce aislamientos crecidos en medio sólido YMA+G a diferentes pHs. ....	31
<b>Figura 13.</b> Gráficos de D.O. de cada cepa a cada pH vs. tiempo de incubación; y gráficos de barras de la D.O. al tiempo de crecimiento óptimo para cada pH, para cada cepa. ....	34
<b>Figura 14.</b> Estudio fisiológico de los aislamientos.....	36
<b>Figura 15.</b> Foto de un cultivo en medio líquido YMA+G del aislamientoMZ23A.....	37
<b>Figura 16.</b> Estudio morfológico de los aislamientos en medio YMA+G pH 5,5.....	37

## RESUMEN

Uruguay cuenta con una gran diversidad de flora nativa ocupando la familia Fabaceae el tercer lugar en cuanto al número de especies con un total de 205 especies y 51 géneros nativos. El área esteros de Farrapos e islas del río Uruguay (EFIRU) posee una gran diversidad de especies de leguminosas nativas habiéndose encontrado al menos 30 géneros diferentes en esta región. Es por ello que nuestro grupo de trabajo se ha focalizado en identificar y caracterizar las bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a estos ejemplares vegetales. La fijación biológica de nitrógeno es el proceso por el cual el nitrógeno atmosférico,  $N_2$ , es convertido a amonio por microorganismos denominados diazótrofos. Hay bacterias que pueden llevar a cabo la fijación de nitrógeno en vida libre y otras que sólo lo hacen una vez que se asocian simbióticamente con plantas principalmente del grupo de las leguminosas. Las bacterias capaces de establecer simbiosis se conocen con el nombre de rizobios. En un principio se creía que sólo la clase  $\alpha$ -proteobacteria (*Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, etc) contenía géneros capaces de nodular, pero actualmente se sabe que los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia/Cupriavidus* de la clase  $\beta$  también incluyen cepas de rizobio. El objetivo de este trabajo fue analizar a nivel fenotípico y genético doce aislamientos presentes en la colección de rizobios obtenidos de los nódulos de 10 especies de leguminosas diferentes, colectados en EFIRU. Para ello se realizó la secuenciación de los genes *ADNr16S* y *nifH*, así como también el análisis de características promotoras del crecimiento vegetal y capacidad de crecimiento a diferentes pHs. De acuerdo al análisis del gen que codifica para la subunidad 16S ribosomal podemos concluir que se encontraron nueve aislamientos pertenecientes al grupo de los  $\alpha$ -rizobios y dentro de éste a los géneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, así como también tres aislamientos pertenecientes al género *Cupriavidus* aislados de la especie *Mimosa uruguensis*. Estos datos refuerzan otras observaciones encontradas en nuestro laboratorio que indicarían que el género *Mimosa*, en nuestro país se encuentra nodulado por  $\beta$  rizobios y que preferentemente lo está por bacterias pertenecientes al género *Cupriavidus*. La morfología de las colonias se diferenció de acuerdo al grupo al que pertenecían

encontrándose que los  $\alpha$  rizobios formaban colonias redondas y mucosas mientras que las colonias de *Cupriavidus* eran opacas. Se observó también que los doce aislamientos estudiados presentan una buena adaptación a los cambios de pH del medio si bien la morfología de las colonias podía variar. De acuerdo a la fase lag, se diferenciaron cepas con tiempo de adaptación lento (correspondientes al género *Bradyrhizobium*), rápido (*Cupriavidus*, *Sinorhizobium* y *Rhizobium*) e intermedio, (*Mesorhizobium*). El relevamiento y la conservación del germoplasma de las especies capaces de asociarse a bacterias fijadoras de nitrógeno permitirán mantener un acervo genético de una parte de nuestra biodiversidad, y con ese conocimiento poder proteger los recursos naturales y utilizarlos en beneficio del país.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

#### 1.1.1. El nitrógeno y su biodisponibilidad

Después del carbono el segundo elemento más abundante en la célula es el nitrógeno, ya que conforma moléculas esenciales para la vida como son las proteínas y los ácidos nucleicos (32). El nitrógeno es un nutriente limitante en el crecimiento vegetal ya que además de ser poco abundante en el suelo, es removido por causas naturales en cantidades superiores al resto de los nutrientes. En la capa superior del suelo este nutriente se encuentra disponible entre un 0,02%-0,04% y puede alcanzar un 2% en suelos ricos en materia orgánica. El nitrógeno en forma orgánica es el más abundante, mientras que nitratos y los nitritos, dos formas solubles asimilables por las plantas, son más escasas (15). Dada su importancia a nivel agroindustrial, frecuentemente se utilizan compuestos nitrogenados orgánicos e inorgánicos como fertilizantes. El nitrógeno adicionado por este medio o por descomposición de materia orgánica sufre determinados procesos biológicos para obtener como resultado final nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). La fertilización química utiliza materias primas no renovables, es costosa y su empleo constante ocasiona contaminación ambiental debido a que los nitratos no absorbidos por los cultivos son vertidos en los cursos de agua. Este proceso se conoce como lixiviado y continúa con el reciclaje en el sistema de agua-aire-suelo. Los nitratos son finalmente convertidos en  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$ , y el nitrógeno es liberado de nuevo a la atmósfera o bien queda formando parte de sedimentos (35).

El verdadero problema con este nutriente no radica en la poca abundancia del mismo (el  $\text{N}_2$  constituye un 78% del volumen de la atmósfera) sino en que en general se encuentra en una forma no metabolizable por la mayoría de los organismos. Sólo un grupo restringido de microorganismos son capaces de metabolizar el  $\text{N}_2$  en un proceso conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) (36).

Junto con la amonificación, nitrificación y desnitrificación, la FBN es un proceso que forma parte del ciclo de nitrógeno como se muestra en la Figura 1 (16).

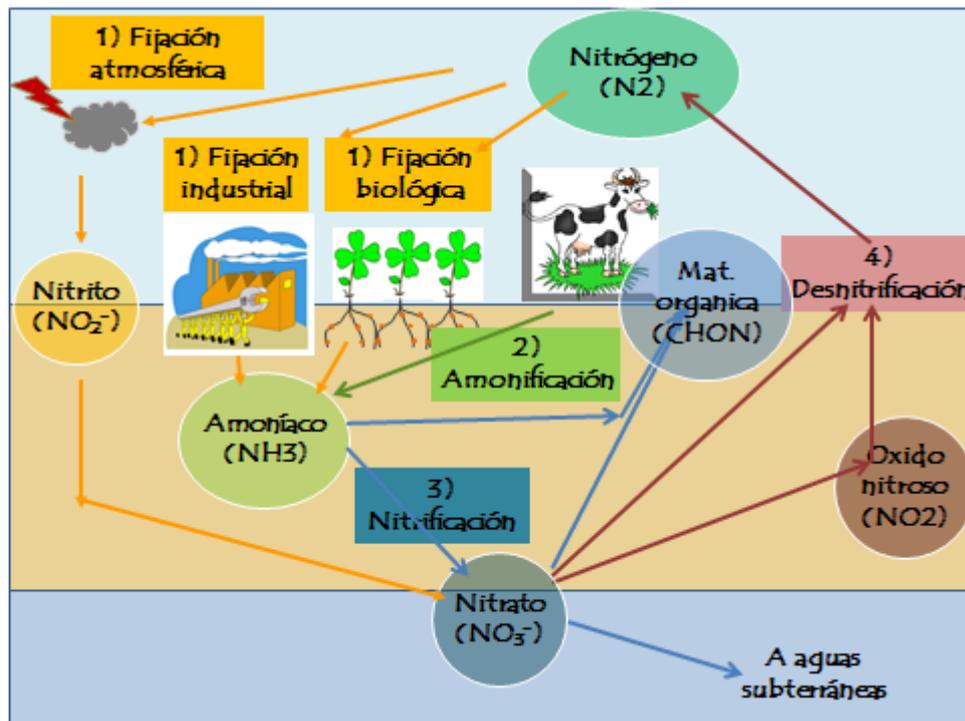
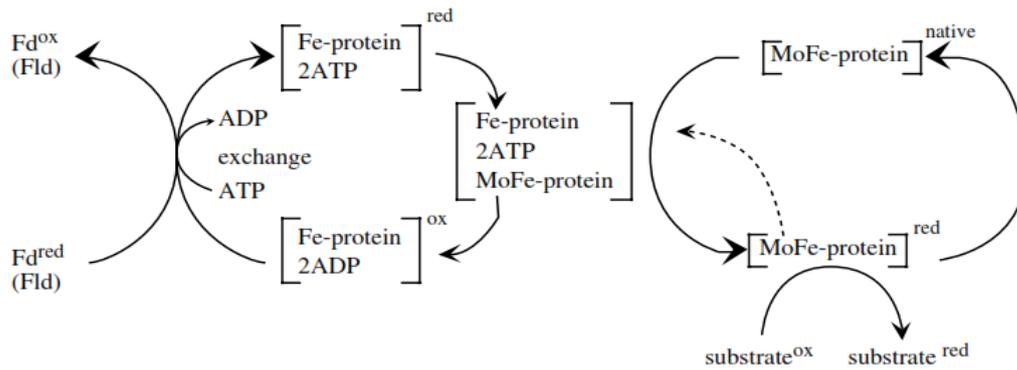


Figura 1. Ciclo del nitrógeno en el ecosistema terrestre.

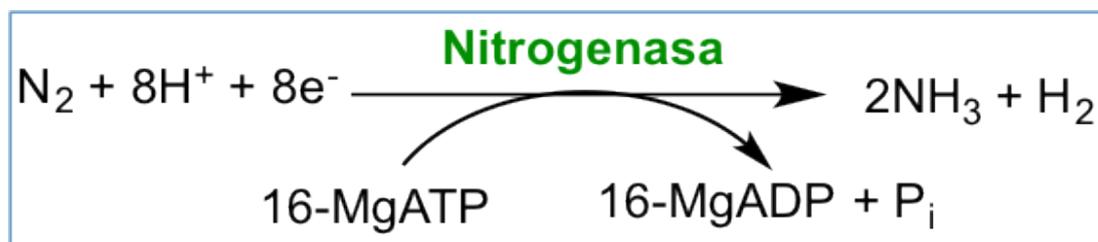
### 1.1.2. Fijación Biológica de Nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno es el proceso por el cual el nitrógeno atmosférico,  $N_2$ , es convertido a amonio por un grupo reducido de procariontas de los dominios Archea y Bacteria, denominados diazótrofos. Este grupo está conformado por bacterias heterótrofas aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas; bacterias quimioautótrofas y microorganismos fotosintéticos (15). Estos microorganismos presentan un sistema enzimático llamado nitrogenasa (Figura 2), el cual está formado por dos metaloproteínas, una ferro-molibdenoproteína (FeMo-proteína, componente I) y una ferroproteína (Fe-proteína, componente II). La FeMo-proteína es un tetrámero  $\alpha_2\beta_2$  (donde las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son homologas) de aprox. 240 kDa, contiene el sitio activo para la reducción del sustrato ( $N_2$ ) y esta codificada por los genes *nifD* ( $\alpha$ ) y *nifK* ( $\beta$ ). Este componente cataliza la reducción de una molécula de nitrógeno a amonio en un proceso dependiente de ATP. Por otro lado, la Fe-proteína media la hidrólisis de ATP acoplada a la transferencia de electrones, es el único donador de electrones que hace capaz la acción de la FeMo-proteína, y está codificada por el gen *nifH*. Este componente enzimático es un dímero,  $\alpha_2$ , de subunidades idénticas (peso molecular 60 kDa) (41).



**Figura 2.** Reacciones de óxido-reducción catalizadas por los componentes I (FeMo-proteína) y II (Fe-proteína) del sistema enzimático nitrogenasa.

Este complejo enzimático cataliza la reacción de reducción del  $N_2$  a  $NH_4^+$  utilizando energía metabólica (ATP) a presión y temperatura normales (38). El proceso de FBN conlleva un gran gasto energético debido a la gran estabilidad que presenta el triple enlace en la molécula de nitrógeno, como se aprecia en la Figura 3 (48).



**Figura 3.** Reacción de reducción del  $N_2$  catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa.

La nitrogenasa es sensible al oxígeno y por este motivo los diferentes microorganismos que realizan la FBN han desarrollado mecanismos de protección. En algunos casos se produce un aumento en la tasa respiratoria celular y en otros el cambio es conformacional (59).

Los diazótrofos pueden fijar nitrógeno en forma libre o en asociaciones simbióticas con eucariotas como es el caso de los rizobios y las leguminosas, relación de suma importancia a nivel ecológico y agroindustrial (19, 21).

Como el  $N_2$  es el elemento más fácilmente perdido cuando la mineralización de la materia orgánica del suelo es estimulada por el arado del suelo, es frecuente que este elemento controle la materia orgánica del suelo y, por lo tanto, su fertilidad. La

aplicación continua de fertilizantes no puede ser una opción a largo plazo ya que los precios de producción de estos productos son muy elevados y los mismos contaminan los mantos acuíferos con metales pesados, sales nitrogenadas, y en muchos casos acidifican los suelos (10). Aproximadamente  $3 \times 10^{14}$  g de nitrógeno se fijan anualmente en amonio, el cual es utilizado por las plantas para su crecimiento (44). Por este motivo la FBN es el método más efectivo, menos costoso y no contaminante, para mejorar la fertilidad del suelo.

Por otro lado, la relación microorganismo-planta no sólo es beneficiosa en cuanto a la obtención de nitrógeno, sino que también es positiva a nivel de captación de otros nutrientes como el fósforo o el hierro, y en algunos casos el microorganismo asociado actúa como controlador biológico de patógenos (54).

### **1.1.3. Bacterias fijadoras de nitrógeno: rizobios**

La interacción más estudiada entre microorganismo y plantas es aquella en la que intervienen los rizobios y las leguminosas. Como el término lo indica son bacterias que se asocian en general a las raíces de las plantas. Los rizobios son bacilos Gram son negativos, presentan un metabolismo aerobio y heterótrofo en su mayoría. En la actualidad, la taxonomía de los rizobios se basa en un enfoque polifásico que incluye caracterización de la morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia, entre otros aspectos. La filogenia establecida a través de la secuencia nucleotídica del gen del ARN ribosomal que codifica para la subunidad 16S (ADNr16S) agrupaba hasta hace unos años a los rizobios en la división Proteobacteria dentro de la clase  $\alpha$ -proteobacteria ( $\alpha$ -rizobios). En la actualidad a través de estudios comparativos del ADNr16S es posible agrupar a los  $\alpha$ -rizobios en al menos siete géneros: *Devosia*, *Methylobacterium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* (Tabla 1) (29).

Si bien la simbiosis entre las leguminosas y los rizobios pertenecientes a las  $\alpha$ -proteobacterias ha sido la más caracterizada, no es la única interacción que da como resultado la fijación biológica de nitrógeno. Este proceso también puede ser llevado a cabo por los actinomicetes del género *Frankia*, bacterias de la clase alfa pero no consideradas rizobios. Estas interacciones son con hospederos vegetales que no necesariamente pertenecen a la familia de las Fabaceas. Más recientemente

se han encontrado rizobios pertenecientes a las  $\beta$ -proteobacteria o  $\beta$ -rizobios (14, 57), que en un principio se consideraron diazotófos de vida libre incapaces de nodular conocidos como endófitos (33, 50). En los últimos años se ha comprobado que algunas especies sí son capaces de vivir como simbiotes. Esto fue publicado por primera vez por Chen y colaboradores (8, 9) y por Moulin y colaboradores (37). Estas bacterias se ubican dentro de dos géneros: *Burkholderia* y *Cupriavidus* (anteriormente llamada *Ralstonia*) (2, 3, 20).

La clasificación actual de rizobios y algunos ejemplos de las leguminosas que los hospedan se detalla en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Sistemática de rizobios basada en el análisis de la secuencia del ARN ribosomal que codifica para la subunidad 16S y algunas especies de leguminosas hospederas de los mismos. Información obtenida de (29).

Familia	Género	Leguminosa hospedera
<b><math>\alpha</math>-proteobacteria</b>		<i>Medicagae sp.</i>
<b>Rhizobiaceae</b>	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Melilotus sp.</i> <i>Glycine max</i>
	<i>Rhizobium</i>	<i>Trifolium sp.</i> <i>Viciae sp.</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>Allorhizobium</i>	<i>Sesbania sp.</i>
<b>Bradyrhizobiaceae</b>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Lotus sp.</i> <i>Glycine max</i>
	<i>Blastobacter</i>	<i>Aeschynomene indica</i>
<b>Hypomicrobiaceae</b>	<i>Devosia</i>	<i>Pueraria lobata</i>
	<i>Azorhizobium</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<b>Phyllobacteriaceae</b>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Lotus sp.</i>
	<i>Phyllobacterium</i>	<i>Trifolium pratense</i> <i>Trifolium repens</i> <i>Lupinus</i>
<b>Brucelleae</b>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<b>Methylobacteriaceae</b>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Lotononis bainesi</i>
<b><math>\beta</math>-proteobacteria</b>		
<b>Burkholderiaceae</b>	<i>Cupriavidus</i>	<i>Mimosa pudica</i>
	<i>Burkholderia</i>	<i>Aspalathus carnosa</i> <i>Machaerium lunatum</i>

#### 1.1.4. Transferencia horizontal de genes

En algunos rizobios muchas de las funciones simbióticas son codificadas por genes localizados en el plásmido Sym o simbiótico. Dentro del mismo, se encuentran los

genes *nif* (fijación biológica de nitrógeno) y los *nod* (nodulación). Por este motivo, la transferencia horizontal de genes simbióticos es un evento que ha sido evidenciado entre rizobios, que le confiere una ventaja ecológica a aquellas que lo han adquirido, para establecer una simbiosis efectiva con especies de leguminosas introducidas o exóticas (4). También se ha sugerido que la transferencia horizontal de genes simbióticos puede ocurrir entre rizobios y géneros bacterianos no simbióticos filogenéticamente relacionados. Esto se ha evidenciado mediante el análisis del ADN<sub>r</sub>16S de bacterias pertenecientes al género *Methylobacterium*, que forman nódulos y fijan nitrógeno en leguminosas del género *Crotalaria*. El gen *nodA* de *Methylobacterium nodulans* está estrechamente relacionado al gen *nodA* de *Bradyrhizobium* (47). Asimismo cuando se analizó el genoma del  $\beta$ -rizobio *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424 se observó que contiene genes plasmídicos involucrados en la nodulación, pudiendo de esta forma reforzar la hipótesis de que los genes necesarios para la nodulación han sido transferidos horizontalmente de bacteria a bacteria convirtiendo a los diazótrofos de vida libre en simbioses (22).

## 1.2 MACROSIMBIONTE

### 1.2.1. Leguminosas

Las leguminosas pertenecen a la familia de las Fabaceas, la cual está conformada por árboles, arbustos y hierbas perennes o anuales, fácilmente reconocibles por su fruto tipo legumbre y sus hojas compuestas y estipuladas. Es una familia de distribución cosmopolita con aproximadamente 730 géneros y unas 19.400 especies, lo que la convierte en la tercera familia con mayor riqueza de especies después de las compuestas (Asteraceae) y las orquídeas (Orchidaceae). Esta familia a su vez se divide en tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae o Faboideae; siendo las dos últimas las que presentan una mayor riqueza de especies (28).

El éxito de esta familia puede ser atribuido a su habilidad de formar asociaciones con bacterias capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Si bien estas bacterias por lo general son rizobios, también se descubren cada vez más casos en los cuales la interacción se da entre leguminosas y endófitos (1, 14, 53).

Actualmente, luego de varios años de investigación, se sabe que más del 90% de las especies en las subfamilias *Papilionoideae* y *Mimosoideae* son noduladas, mientras esto ocurre en menos del 25% de las especies de *Caesalpinioideae* (1).

### **1.2.2. Importancia agro-económica**

Las Leguminosas son las únicas plantas que pueden fijar y acumular el nitrógeno del aire en sus raíces y aportar de esta manera uno de los nutrientes más importantes para el suelo. Algunas especies pueden fijar hasta 300 kg de nitrógeno por hectárea, lo cual permite una importante disminución en la utilización de fertilizantes químicos. Además, las leguminosas tienen mucha capacidad de producir follaje (biomasa vegetal) y son muy importantes para la producción de forrajes o abonos verdes, lo cual es esencial para la alimentación tanto humana como de ganado (17, 55). De acuerdo con un análisis estadístico realizado por la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) en el 2011, la cosecha de leguminosas en América Latina aumentó cerca de un 20% en diez años (<http://www.fao.org/home/en/>).

### **1.2.3. Leguminosas en Uruguay**

La suma de poblaciones de plantas conforma la especie vegetal de un país y constituye la base de los recursos fitogenéticos del mismo.

Durante miles de años la naturaleza ha seleccionado genéticamente a las especies vegetales nativas, motivo por el cual son fuente de información invaluable para conocer la especialización y adaptación de los ejemplares vegetales a las condiciones ambientales del país. Las leguminosas ocupan un sitio valioso dentro de la pradera y el bosque o monte, dos de los ecosistemas que cubren entre ambos, la mayor parte de la superficie del país.

Uruguay cuenta con una gran diversidad de flora nativa, siendo una de las de mayor importancia las pertenecientes a la familia Fabaceae, ya que la utilización de leguminosas forrajeras causa una mejora en las pasturas y por lo tanto en la agricultura y ganadería del país. Las praderas mejoradas han tenido un incremento sostenido en el transcurso de las últimas décadas, al igual que el cultivo de cereales. En este último caso las hectáreas cultivadas han triplicado su número en menos de diez años, así ha ocurrido con la soja (principal leguminosa cultivada en el país)

pasando de sembrarse 309.000 hectáreas en el período de años 2005-2006 a 1.050.000 en el período 2012-2013 (DIEA. Anuario 2013. <http://www.mgap.gub.uy>). El relevamiento y la conservación del germoplasma de las especies fijadoras de nitrógeno y sus bacterias asociadas permitirán mantener un acervo genético de una parte de nuestra biodiversidad, y con ese conocimiento poder proteger los recursos naturales y utilizarlos en beneficio del país.

### 1.3. SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA

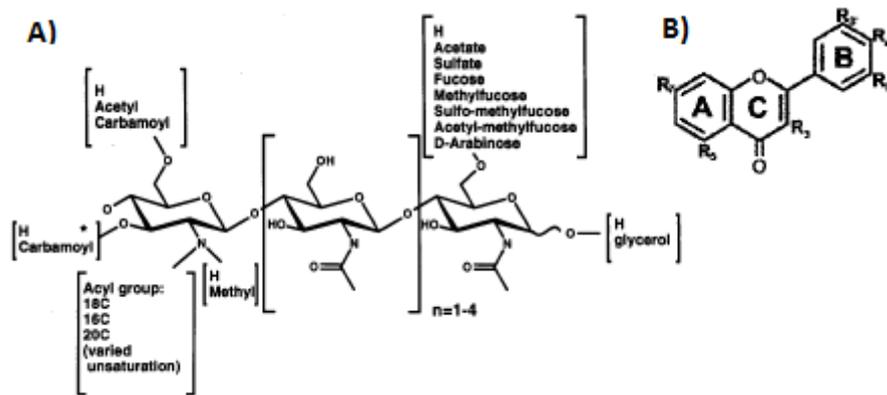
#### 1.3.1. Diálogo molecular

La comunicación o diálogo molecular entre los rizobios y las leguminosas, es un conjunto de interacciones primarias que ocurren en la rizósfera (parte del suelo inmediata a la raíz). El diálogo comienza con la liberación por parte de la leguminosa de metabolitos secundarios contenidos en exudados de semilla y raíz. Estos compuestos son de naturaleza flavonoide (Figura 4A), más específicamente derivados del 2-fenil-1,4-benzopirona (46). Una vez que éstos son reconocidos por los rizobios dan lugar al inicio de la transcripción de genes de nodulación (genes *nod*). Dicho proceso involucra a una proteína reguladora, NodD, que actúa tanto de sensor del entorno como de activador de la transcripción. Luego de activada, la proteína se une al promotor de la caja que contiene los elementos *nod* y da comienzo a la síntesis de lipoquitinolisacáridos más conocidos como factores Nod (Figura 4B) (6, 31, 40).

No cualquier flavonoide es reconocido por cualquier rizobio, hay especificidad y ésta radica tanto en las sustituciones de los anillos del flavonoide como en las del factor Nod. Por ejemplo, los isoflavonoides producidos por *Glycine max* (daidzeína y genisteína) son inductoras de factores Nod en *Bradyrhizobium japonicum* pero son inhibitorios de los factores de *Sinorhizobium meliloti* (22, 34).

Algunos componentes de la superficie celular bacteriana tienen un rol importante en esta interacción específica; en particular polisacáridos extracelulares (EPS) y lipopolisacáridos (LPS). El LPS de bacterias gram-negativas consiste en una parte lipídica o lípido A, un oligosacárido que forma el núcleo y una cadena lateral con el antígeno O. Se cree que el LPS de los rizobios puede estar involucrado en el reconocimiento y unión de específica de estas bacterias a las células del pelo

radicular de las plantas hospedantes compatibles, y que esta interacción estaría mediada por la unión de la lectinas (43).



**Figura 4.** Estructura general de los Factores Nod (A) y de los flavonoides (B).

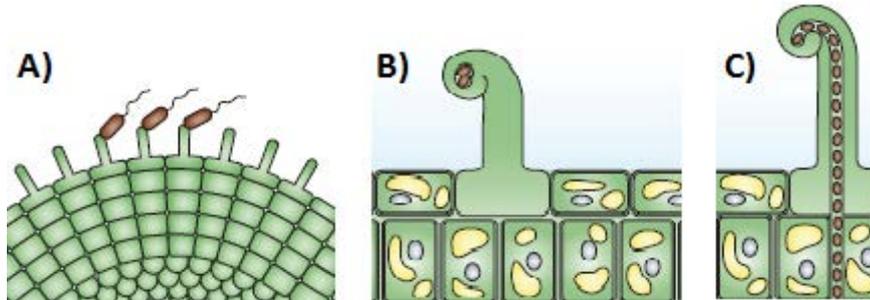
Tomado de (22) y (30).

Una vez secretados por la bacteria (en cantidades muy pequeñas, pico y nanomoles), los factores Nod y los EPS simbióticos son reconocidos por la planta hospedera e inducen una serie de cambios morfológicos y fisiológicos en los pelos radicales de la planta (5). Dentro de las respuestas inducidas por los factores Nod específicos en los pelos radicales, se encuentran cambios en los niveles del influjo y eflujo de ciertos iones como calcio, cloro, potasio y protones, a través de la membrana del pelo radical, sucesos que en la mayoría de los casos darán lugar a la formación del nódulo (23).

### 1.3.2. Formación del nódulo

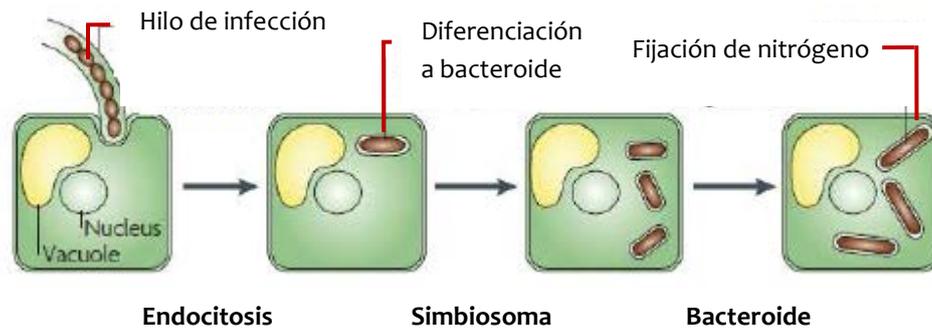
Una vez que el diálogo molecular entre el rizobio y la leguminosa ha mostrado compatibilidad de especies, para que la bacteria ingrese en el pelo radical se requiere de la formación de una nueva estructura conocida como *hilo de infección* (Figura 5). Para ello lo primero que ocurre es la división de células corticales en el hospedero, proceso fomentado por los factores Nod que de alguna manera alteran los niveles de fitohormonas. Además del aumento de los iones calcio en respuesta a la presencia de factores Nod, también se ha observado que hay un incremento en la expresión de un gran número de genes de la planta, entre los que se incluyen

aquellos que codifican proteínas llamadas nodulinas, las cuales están involucradas en el desarrollo y funcionamiento del nódulo (11).



**Figura 5.** Invasión de la raíz por *Sinorhizobium meliloti*. **A:** Diálogo molecular rizobio-leguminosa. **B:** Inicio del hilo de infección. **C:** Penetración a través del hilo de infección. Adaptado de (23).

El primer efecto morfológico producido por los factores Nod, previo a la formación del hilo de infección, es un hinchamiento en la zona apical del pelo que eventualmente da lugar a un enroscamiento del mismo, el cual ayuda a atrapar las bacterias localizadas en esta zona y generar un nuevo sitio de crecimiento, ahora hacia adentro del pelo, en forma de túnel (hilo de infección) que crece desde el ápice del pelo hasta la base del mismo. Una vez dentro las bacterias se dividen a la vez que se desplazan por el hilo hasta llegar a las células del primordio del nódulo, dónde son endocitadas y a la vez exocitadas por el hilo. Como resultado de la endocitosis se genera el *simbiosoma*, dentro de éste los rizobios sufren una serie de cambios para dar lugar al *bacteroide*, en el cual ocurre la fijación del nitrógeno atmosférico. Debido a la continua proliferación de bacteroides (rizobios desarrollados) y células corticales, se forman unos crecimientos tumorales (el nódulo) donde se produce un transporte activo de nutrientes hacia y desde el nódulo (Figura 6) (11, 18, 23, 30).



**Figura 6.** Proceso de endocitosis y diferenciación a bacteroide. Dentro del hilo de infección las bacterias se multiplican y avanzan hacia las células del primordio del nódulo, donde son endocitadas. De esta forma se genera el simbiosoma dentro del cual los rizobios se diferencian conformando el bacteroide, donde se lleva a cabo la FBN. Adaptado de (23).

Cuando el nódulo se deteriora las bacterias pasan al suelo. En algunos casos los bacteroides no tienen capacidad de división, pero los nódulos contienen siempre algunos rizobios en estado de latencia. Estas formas proliferan en el suelo utilizando como nutrientes algunos de los productos del nódulo destruido y las bacterias pueden iniciar la infección en otras raíces o mantenerse en estado libre en el suelo. Durante el proceso de formación del bacteroide aumenta la expresión de proteínas involucradas en el desarrollo y funcionamiento del nódulo, denominadas nodulinas. Entre ellas, la leghemoglobina, una hemoproteína esencial para la FBN, está constituida por un grupo hemo, sintetizado por la bacteria, y una proteína, codificada por los genes de la planta. Una de sus funciones es la de mantener bajas las tensiones parciales de oxígeno, lo que crea un ambiente microanaeróbico que permite a su vez la actividad de la enzima nitrogenasa del bacteroide y la FBN. A su vez, cuando la enzima no está fijando nitrógeno cumple la función de proporcionar un nivel de oxigenación suficiente que le permita a la nitrogenasa obtener la energía necesaria para funcionar con una mayor eficiencia (36).

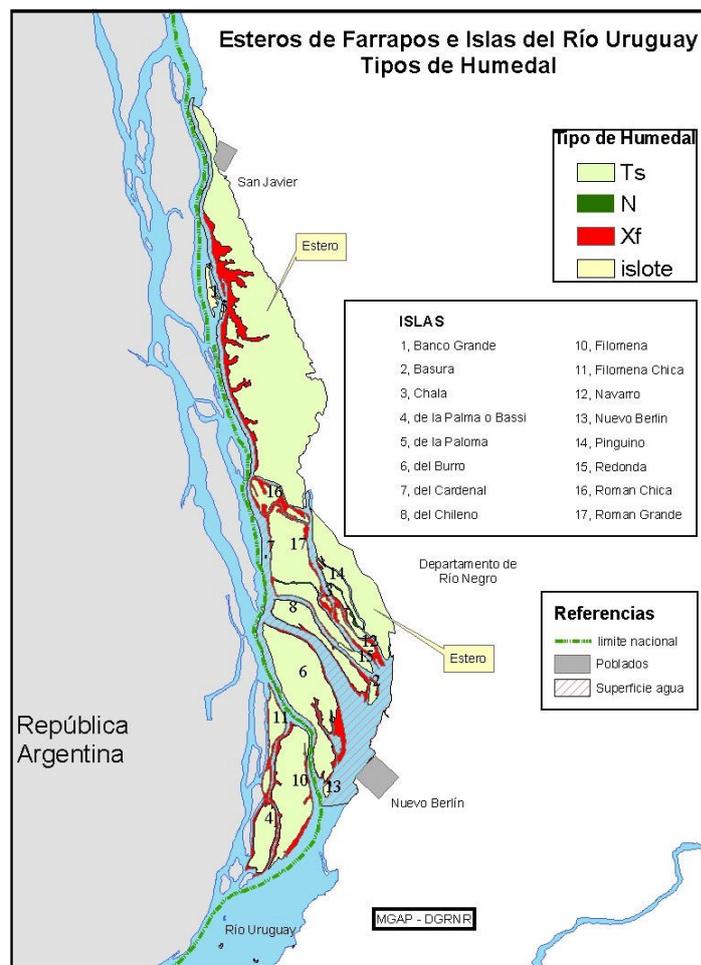
Cabe destacar que existen dos clases de nódulos: diferenciados o indiferenciados. Los del primer grupo contienen un meristemo persistente resultando en formas cilíndricas y a menudo ramificadas, mientras que los del segundo no contienen dicho meristemo y tienen forma redondeada.

#### 1.4. ¿POR QUÉ ESTEROS DE FARRAPOS?

El término farrapos proviene probablemente del portugués y significa “estamos emfarrapos” o lo que es igual “estamos en harapos”; y estero es el terreno pantanoso que suele llenarse de agua por la lluvia o por la filtración de un río o laguna cercana y en el que abundan las plantas acuáticas.

Los Esteros de Farrapos se ubican en el Departamento de Río Negro, por la ruta 24 a la altura del kilómetro 364 de la ruta 3 (Figura 7).

El área esteros de Farrapos e islas del río Uruguay que comprende los esteros de Farrapos y 24 islas e islotes bajo jurisdicción uruguaya, con una superficie de más de 20000 hectáreas ha sido declarado sitio RAMSAR en el año 2004. En noviembre del 2008 ingresa formalmente al Sistema nacional de Áreas Protegidas, como Parque Nacional (7).



**Figura 7.** Ubicación de los esteros de Farrapos e islas del Río Uruguay.

El terreno está ocupado por caraguatales, pajonales, carrizales, praderas y monte nativo. En el monte ribereño se encuentran sarandíes, sauces criollos, mataojos, laureles, ceibos, plumerillos, sangre de drago, guayabos blancos, viraró, amarillos, blanquillos, chal-chales, palos cruz. También hay orquídea criolla, plumerillo rojo y rosado en el bosque de parque, además de varias especies de leguminosas nativas del Uruguay. Entre la fauna del lugar pueden observarse pumas y el aguaraguazú. También abundan los carpinchos, el ciervo axis y los zorros de monte; además de varias especies de aves como los chajaes, garzas, cuervillos, espátulas rosadas, patos criollos, gallaretas, entre otros. Los humedales son ecosistemas muy diversos no solamente por el paisaje sino también por la riqueza y abundancia de las formas de vida que contienen. Estos ambientes son actualmente considerados de particular importancia debido a su rol fundamental en el control de inundaciones, retención de carbono, purificación de los suministros de agua y recarga de acuíferos, así como también por su riqueza de fauna y flora nativa.

### 1.5. ANTECEDENTES

El equipo de trabajo cuenta con una amplia experiencia e infraestructura para el estudio de microorganismos del suelo de uso potencial para el mejoramiento de plantas, especialmente en bacterias fijadoras de nitrógeno que nodulan leguminosas. El equipo se ha enfocado en gran parte en profundizar el conocimiento de las rizobacterias nativas, por considerar que constituyen una riqueza natural de nuestro suelo, sobre la cual existe muy escasa información. Una de las líneas de trabajo se ha centrado en el estudio de una leguminosa arbórea nativa (*Parapiptadenia rigida* o angico) y los rizobios asociados a esta especie. Hace ya unos años que se ha iniciado una línea de investigación enfocada al estudio de la diversidad botánica y microbiológica en los esteros de Farrapos e islas del río Uruguay. Se ha trabajado en esta zona debido a su riqueza florística, interés ambiental y geopolítico. Con esta finalidad, se realizaron varias giras de prospección colectándose nódulos presentes en 28 especies diferentes de leguminosas. Se dispone actualmente de una colección de aproximadamente 190 microsimbiontes aislados de nódulos provenientes de: *Aeschynomene denticulata*, *Aeschynomene montevidensis*, *Arachis villosa*, *Calliandra parvifolia*, *Chamaecrista flexuosa*, *Collaea*

*stenophylla*, *Erythrina crista-galli*, *Galactia striata*, *Geoffroea decorticans*, *Indigofera suffruticosa*, *Inga vera*, *Latyrus sp.*, *Lotus corniculatus*, *Lotus sp.*, *Mimosa adpressa*, *Mimosa pilulifera*, *Mimosa uruguensis*, *Neptunia pubescens*, *Ornithopus micranthus*, *Senegalia bonariensis*, *Sesbania punicea*, *Sesbania sp.*, *Stylosanthes leiocarpa*, *Tephrosia cinerea*, *Trifolium sp.*, *Vachellia caven*, *Vicia platensis* y *Vigna luteola*.

## 2. OBJETIVOS

El **objetivo** del trabajo es generar conocimientos sobre bacterias fijadoras de nitrógeno simbiotes de leguminosas nativas. En particular, nos focalizamos en el estudio de un grupo de bacterias obtenidas a partir de nódulos de leguminosas presentes en diferentes unidades ambientales de EFIRU e inmediaciones.

Los **objetivos específicos** fueron:

- Aislar bacterias simbióticas de nódulos presentes en leguminosas colectadas en EFIRU.
- Identificar los géneros a los que pertenecen estos simbiotes a partir de los genes *ADNr 16S* y *nifH*, y analizar la filogenia.
- Caracterizar fenotípicamente los aislamientos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. LEGUMINOSAS PROSPECTADAS Y COLECTA DE NÓDULOS



**Figura 8.** Localización de los sitios de colecta de las leguminosas empleadas en este trabajo.

Las especies utilizadas en este estudio forman parte de la familia Fabaceae, perteneciente al clado Rosidea I. En este trabajo en particular se trabajó con especies de la subfamilia Faboideae: *Aeschynomene montevidensis*, *Indigofera suffruticosa*, *Lotus sp.*, *Melilotus indicus*, *Ornithopus micranthus* y *Sesbania sp.*, y de la subfamilia Mimosoideae: *Calliandra parvifolia*, *Mimosa uruguensis*, *Senegalia bonariensis* (anteriormente *Acacia bonariensis*) y *Vachellia caven* (anteriormente *Acacia caven*) (Tabla 2). Los sitios de colecta se muestran en la Figura 8.

Se tomaron muestras de los ejemplares vegetales portadores de los nódulos y se llevaron al laboratorio para su herborización y posterior identificación botánica (58).

**Tabla 2.** Procedencia de los aislamientos bacterianos.

Aislamiento	Subfamilia de planta hospedero	Especie de planta hospedero	Ubicación geográfica	Sitio de colecta
DC 12	<i>Papilionoideae</i>	<i>Sesbaniasp.</i>	S32°40'37.9" W58°07'43.6"	ISLETAS
DC 32	<i>Papilionoideae</i>	<i>Ornithopus micranthus</i>	S32°38'18.52"W58°8'53.51"	PUERTO VIEJO
EF 36	<i>Papilionoideae</i>	<i>Melilotusindicus</i>	S32°36'0.77" W58°8'59.26"	LA PONDEROSA
EF 48	<i>Mimosoideae</i>	<i>Mimosa urugüensis</i>	S32°38'18.52"W58°8'53.51"	PUERTO VIEJO
EF 62	<i>Papilionoideae</i>	<i>Aeschynomene montevidensis</i>	S32°38'18.52"W58°8'53.51"	PUERTO VIEJO
EF 67	<i>Mimosoideae</i>	<i>Calliandra parvifolia</i>	S32°59'02.00" W58°03'49.20"	Nuevo Berlín SUR
EF 88	<i>Papilionoideae</i>	<i>Lotus sp.</i>	S32°59'02.00" W58°03'49.20"	Nuevo Berlín SUR
FB 11	<i>Mimosoideae</i>	<i>Vachellia caven</i>	S32°59'02.00" W58°03'49.20"	Nuevo Berlín SUR
GA 1	<i>Mimosoideae</i>	<i>Mimosa urugüensis</i>	-	Vivero liceo
GA 2	<i>Mimosoideae</i>	<i>Mimosa urugüensis</i>	-	Vivero liceo
GA 3	<i>Mimosoideae</i>	<i>Senegalia bonariensis</i>	-	Vivero liceo
MZ 23	<i>Papilionoideae</i>	<i>Indigofera suffruticosa</i>	S32°38'20.2" W58°08'52.1"	Arenal al lado motel Puerto Viejo

### 3.2. AISLAMIENTO DE BACTERIAS SIMBIÓTICAS

Se procesaron, cuando fue posible, 3 nódulos de aspecto rosado (como indicación de presencia de leghemoglobina asociada a la fijación de nitrógeno). Para la esterilización de la superficie de los nódulos primero se realizó la inmersión de éstos en etanol 95% (v/v) durante unos segundos y luego se trataron con HgCl<sub>2</sub> 2 mM, HCl 0,1 N durante dos minutos seguido de 6 lavados con agua destilada estéril.

Posteriormente como máximo tres nódulos por ejemplar fueron macerados por separado con ayuda de una varilla de vidrio estéril y la suspensión resultante se sembró en medio sólido YMA+G (Yeast Extract Mannitol Glutamate), pH 6,8 (56). La composición del medio se describe en el Anexo. Las placas se incubaron a 28°C hasta observar aparición de colonias (no más de una semana luego de inoculadas). A partir de las mismas se realizaron aislamientos por agotamiento en estría para finalmente obtener cultivos puros. Las cepas se almacenaron en glicerol 25% (v/v) a -80 °C.

### 3.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

#### 3.3.1. Morfología

Se observó la morfología (tamaño, forma, textura) y la pigmentación de las colonias obtenidas luego de 6 días de incubación a 28°C en medio sólido YMA+G.

Para conocer la forma celular de las bacterias se partió de cultivos en medio líquido YMAG. Se colocó una gota del cultivo en un portaobjetos, la gota se cubrió con un cubreobjetos y se observó en un microscopio invertido Olympus IX81 con un objetivo de 100x, utilizando aceite de inmersión.

#### 3.3.2. Fisiología

##### 3.3.2.1. Crecimiento en diferentes condiciones de pH y en diferentes medios

El crecimiento a diferentes pHs se evaluó inoculando las cepas aisladas en medio YMA+G líquido y sólido a pHs 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; y 8,0. En el caso de los cultivos en medio líquido, se partió de un inóculo primario realizado por resuspensión de una ansada de células provenientes de un cultivo en medio sólido, en 5 ml de medio YMA+G líquido. Estos tubos se incuban con agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 620 nm de aproximadamente 1 (luego de aproximadamente cinco días de crecimiento). Se tomaron 500 µl de cultivo y se diluyeron a la mitad con medio fresco en placas de 96 pocillos (capacidad 2ml cada uno). Para determinar la densidad óptica se tomaron alícuotas de 200 µl las cuales se pasaron a una nueva placa de microtitulación de 96 pocillos de 300 µl cada uno. Las medidas se tomaron a 620 nm a las 0, 48, 96 y 120 hs en un Varioskan® Flash, Thermo Scientific. El diseño de cada placa multipocillo se hizo de forma tal de que en cada fila hubiera un medio de un pH determinado (en total se ensayaron 8 valores de pH diferentes) y en cada columna un aislamiento bacteriano (doce cepas). Se utilizó como blanco medio YMA+G. Cada muestra se realizó por duplicado así como también se hizo con el blanco.

En el caso de los cultivos en medio sólido se sembraron alícuotas de 10 µl de cada una de las doce cepas por duplicado y se observó el crecimiento de las mismas a distintos pH en comparación con el de las colonias producidas en medio YMA+G pH 6,8.

También se evaluó de crecimiento de las doce cepas en medio TY y LB (Luria Bertani). El medio TY contiene como fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y aminoácidos, triptona además de extracto de levadura. El medio LB se caracteriza por tener una mayor concentración salina (NaCl) que el medio YMA o TY. En este caso, los ensayos se realizaron en medio sólido de pH 5,5 ya que todos los aislamientos tuvieron un buen crecimiento a este pH en medio sólido YMA+G. La composición de ambos medios se describe en el Anexo.

### **3.3.2.2. Evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfato inorgánico, producción de sideróforos y celulasas**

Para el estudio de la capacidad de los aislamientos de solubilizar fosfato inorgánico se utilizó el medio NBrip (Anexo) el cual contiene fosfato tricálcico. Aquellas cepas capaces de solubilizar el precipitado de fosfato tricálcico mediante la producción de ácidos orgánicos y la consiguiente disminución del pH del medio, generarán un halo translúcido alrededor de la colonia. Las placas fueron incubadas a 28°C durante dos semanas.

La producción de sideróforos se detectó utilizando un medio indicador para dichos compuestos según el método descrito por Schwyn y Neylands (45). Básicamente, la técnica consiste en agregar al medio de cultivo un compuesto quelante de hierro, el cromo azurol S (CAS), el cual forma un complejo en presencia del detergente HDTMA de coloración azul cuando se encuentra unido al hierro y de color naranja cuando está libre. Las colonias productoras de sideróforos se identificaron por la presencia de un halo naranja sobre el fondo azul del medio. Cabe destacar que este medio de cultivo no se preparó agregando CAS al medio YMA+G, ya que las cantidades de hierro presentes en el medio deben estar en una relación estequiométrica con el complejo y el pH rigurosamente ajustado. Los medios CAS inoculados, se incubaron a 28°C durante dos semanas.

Para evaluar la capacidad de las cepas de producir celulasas, se ensayó el crecimiento en medio YMA+G con CMC (carboximetilcelulosa) como fuente de carbono. En particular, este ensayo permite evaluar la presencia de una clase de celulasas llamada endoglucanasa, la cual es capaz de actuar al azar hidrolizando los

enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos. Para llevar a cabo este ensayo, las cepas en estudio se crecieron aproximadamente una semana en el medio YMA+G con CMC, luego las colonias se removieron de la placa con un algodón humedecido en agua destilada estéril y se agregó sobre el medio Rojo Congo 0,05% (p/v). Luego de 15 minutos se descartó el líquido y se incubó a 4°C al menos 24hs. La capacidad de hidrolizar la celulosa del medio, se evidenció por la aparición de un halo de color anaranjado en el lugar donde se encontraba la colonia. Esto se debe a que el Rojo Congo interactúa directamente con los  $\beta$ -D-glucanos, lo cual permite detectar la presencia de actividad  $\beta$ -D-glucanohidrolasa (51).

### **3.4. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA**

#### **3.4.1. Extracción de ADN genómico**

Las cepas se crecieron en medio de YMA+G hasta la fase de crecimiento exponencial tardío (dos o cuatro días dependiendo de la cepa). Se centrifugaron 1,5ml de cultivo 10 min a 10.000 rpm se descartó el sobrenadante y las células se re-suspendieron en 740  $\mu$ l de una solución amortiguadora Tris 10 mM (pH 8), EDTA 1 M (T10E1). Ya que el EDTA es un agente quelante de cationes divalentes como el calcio y el magnesio, la membrana celular se desestabiliza, mientras que la función principal del Tris es mantener el pH estable e interactuar con el lipopolisacárido (LPS), contribuyendo así a desestabilizar la membrana. A la suspensión obtenida se le agregaron 20  $\mu$ l de lisozima 100 mg/ml, se agitó e incubó 5 min a temperatura ambiente. Esta enzima rompe la pared celular bacteriana a través de la hidrólisis de los enlaces  $\beta$  1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina del peptidoglicano. Posteriormente se agregaron 40  $\mu$ l de SDS (dodecilsulfato sódico) 10% (p/v) y 8  $\mu$ l de proteinasa K 10 mg/ml. Se incubó una hora a 37°C para permitir que el detergente solubilice los lípidos de las membranas y la enzima degrade las proteínas celulares.

Una vez realizados los pasos de lisis celular, se agregaron 100  $\mu$ l de NaCl 5M junto con 100  $\mu$ l de CTAB/NaCl se incubó 10 min a 65°C. El bromuro de hexadeciltrimelamonio (CTAB) es un detergente catiónico que en presencia de altas concentraciones salinas tiene la propiedad de precipitar polisacáridos con lo que se

logran purificaciones de ADN más puras. Para proseguir con la separación de los componentes celulares, se agregaron 500  $\mu$ l de cloroformo y se centrifugó 10 min a 12.000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un ependorff limpio y se agregó una mezcla de fenol-cloroformo-álcool isopropílico en una proporción 25:24:1. Se centrifugó 10 min a 12.000 rpm y se pasó la fase acuosa a un ependorff nuevo. A esta segunda fase acuosa se le agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol para deshidratar el ADN y precipitarlo. La suspensión se incubó 30 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó 15 min a 12.000 rpm. El precipitado obtenido se lavó con etanol 70% (v/v), se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min. El precipitado se secó por centrifugación al vacío durante 10 min utilizando una SpeedVac LABCONCO. Los ácidos nucleicos así obtenidos se re-suspendieron en 20  $\mu$ l de buffer TE con ARNasa (99  $\mu$ l buffer TE + 1  $\mu$ l ARNasa 10 mg/ml) para eliminar el ARN de la solución y se incubó 20 min a 37°C. Finalmente la muestra se almacenó a -20°C para posteriores ensayos genotípicos.

#### **3.4.2. Amplificación del gen del ADN ribosomal 16S**

La amplificación del gen ADNr16S se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*), a través de la cual se obtuvieron fragmentos de 1498 pares de bases, usando los cebadores universales Eub27f y Eub1525r (27). La secuencia de los cebadores utilizados se especifica en la Tabla 4. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25  $\mu$ l conteniendo 2,5  $\mu$ l de buffer de reacción de PCR 10x, 1  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1,25  $\mu$ l de deoxi-nucleótido trifosfatos (dNTPs) 5 mM, 0,8  $\mu$ l de cada cebador en una concentración de 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ l de BSA (1 mg/ml), 0,25  $\mu$ l de Taq polimerasa y 0,5  $\mu$ l de ADNg con una concentración promedio de 500 ng/ $\mu$ l. Para la reacción de amplificación se utilizó el siguiente programa: un ciclo de inicio de 5 minutos a 94°C para activar a la ADN polimerasa, seguido de 10 ciclos de 45 segundos a 94°C, un minuto a 60°C y un minuto a 72°C; estos tres pasos son para desnaturalizar al ADN, unión del cebador y extensión de la cadena de ADN, respectivamente. Luego 25 ciclos de 45 segundos a 94°C, un minuto a 59°C y un minuto a 72°C para volver a realizar los tres pasos anteriores. Por último un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72 °C para finalizar la elongación de las cadenas de ADN.

El producto de amplificación se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,6 % (p/v) en buffer TAE sometido a 90 V, teñido con Syber Green según las indicaciones del proveedor y observado mediante exposición a UV. La composición del buffer TAE se detalla en el Anexo 1.

Se secuenció el amplicón correspondiente al gen ADNr 16S de los doce aislamientos mediante uso del cebador Eub27f. Las reacciones de secuenciación, así como también la purificación del ADN fueron realizadas por Macrogen Inc. (Corea). Las secuencias resultantes se compararon con las disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando el algoritmo BLASTn (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) en el sitio <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>.

A partir de estudios *in silico* realizados con la información obtenida en este trabajo y la disponible en la base de datos del NCBI, se construyeron árboles filogenéticos utilizando el sitio web Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Una vez obtenido el árbol filogenético éste se analizó utilizando el programa Mega 4 (49).

**Tabla 3.** Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados.

Nombre	Secuencia
Eub27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
Eub1525r	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'
Eufornif	5'-ATYGTCCGYTGYGAYCCSAARGC-3'
Eurevnif	5'-ATGGTGTGGCGGCRTAVAKSGCC-3'

### 3.4.3. Amplificación del gen *nifH*

Se realizó la amplificación por PCR de un fragmento 327 pb correspondientes al gen estructural de la nitrogenasa (*nifH*) de los 12 aislamientos bacterianos, mediante el uso de los cebadores Eufornif y Eurevnif (39). La secuencia de los cebadores utilizados se indica en la Tabla 3.1. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 ul conteniendo 2,5 ul de buffer 10 X de PCR, 1,5 ul de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2,5 ul de una

mezcla dNTPs de 2 mM, 0,625 ul de cada cebador 20 uM, 1,0 ul de BSA 0,5%, 0,1 ul de Taq polimerasa (5U ml<sup>-1</sup>) y 0,5 ul de ADNg (aprox. 500 ng/ul).

El siguiente programa fue utilizado para la reacción de amplificación: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de un minuto a 95°C (desnaturalización del ADN), un minuto a 55°C (hibridación de los cebadores al molde de ADN) y un minuto a 72 °C (etapa de polimerización del ADN) y por último se realizó un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72 °C.

El producto de amplificación se visualizó mediante una electroforesis en gel de agarosa 0,6 % (p/v) en buffer Tris-Acético-EDTA (TAE) sometido a 90 V. Para la secuenciación del amplicón de interés se siguieron los mismos pasos que en el caso de los productos del gen ADNr 16S empleando el los cebadores especificados en la Tabla 3.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. OBTENCIÓN DE LOS MICROSIMBIOTES

A partir de nódulos obtenidos de *Sesbania sp.*, *Ornithopus micranthus*, *Melilotus indicus*, *Lotus sp.*, *Indigofera suffruticosa*, *Aeschynomene montevidensis*, *Calliandra parvifolia*, *Vachellia caven*, *Senegalia bonariensis* (en total 9 plantas) y de tres ejemplares de *Mimosa uruguensis* se obtuvieron cultivos bacterianos puros en medio YMA+G sólido. Se logró seleccionar un aislamiento de cada planta los cuales se usaron en los ensayos posteriores.

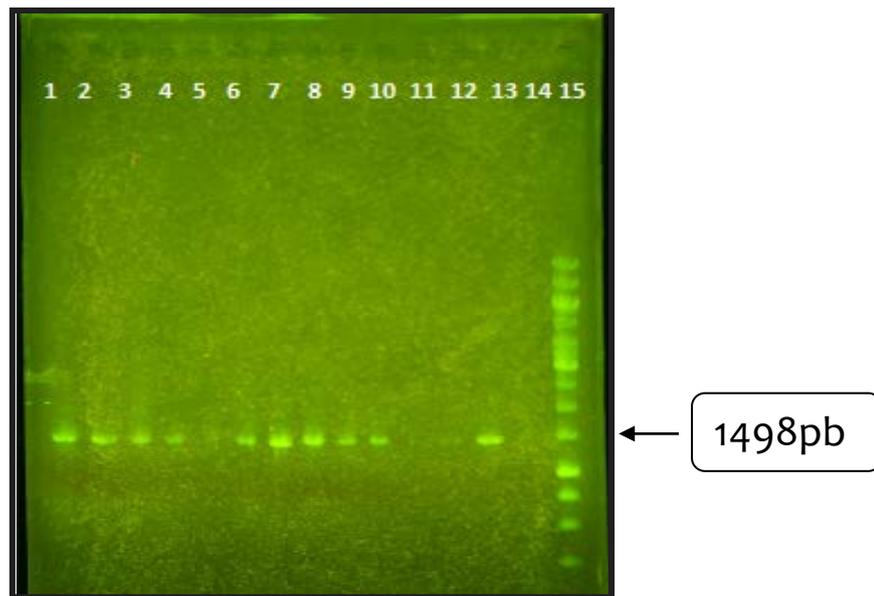


**Figura 9.** Etapas en la generación de la colección de microsimbiontes. a) colecta de ejemplares vegetales y posterior identificación a nivel de especie; b) colecta de los nódulos; c) obtención de aislamientos bacterianos en medio YMA+G a partir de los nódulos colectados.

### 4.2. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

#### 4.2.1. Secuenciación y análisis filogenético del gen ribosómico 16S

Se realizó la extracción del ADN de los doce aislamientos y se comprobó la calidad y concentración del ADN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa. A partir de estas muestras de ADN se realizó una amplificación del gen ADNr16S mediante PCR. El producto de la amplificación se observó luego de la electroforesis en un gel de agarosa (Figura 10). Se consideraron positivas todas las bandas que coincidieron aproximadamente con la del marcador molecular para 1500 pb, debido a que la región del gen del ADNr16S que se quería amplificar presenta 1498 pb.



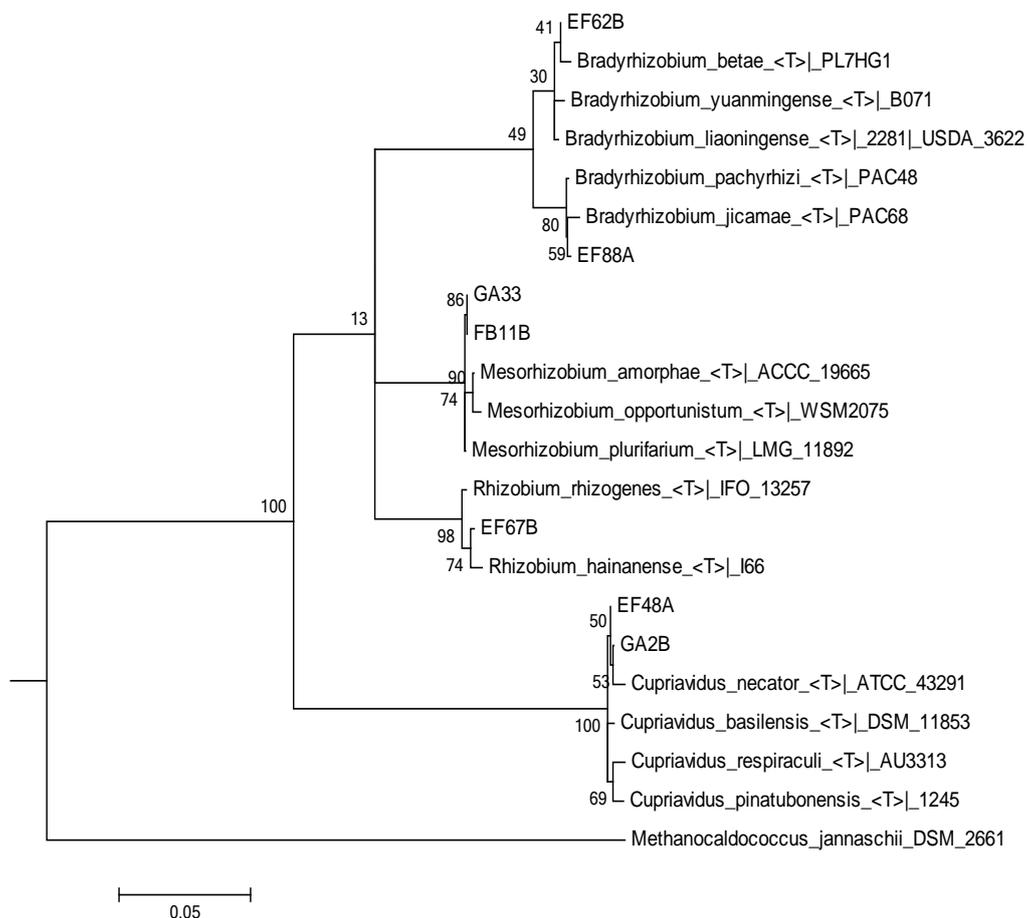
**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S. 1) GA33; 2) FB11B; 3) EF62B; 4) EF67B; 5) MZ23A; 6) EF88A; 7) EF36B; 8) GA12; 9) GA23; 10) EF48A; 11) DC32A; 12) DC12A; 13) control positivo; 14) control negativo; 15) marcador de peso molecular (MPM).

Para determinar el género al que pertenecían las cepas aisladas de los nódulos se secuenció el producto de amplificación de PCR utilizando el cebador Eub27. Una vez obtenidas las secuencias de los amplicones se las editó con el programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x y luego se las comparó con la base de datos del NCBI mediante el algoritmo BLAST. Se identificaron de esta forma los géneros de los 12 aislamientos, los cuales se detallan en la Tabla 4.

Se construyó un árbol filogenético a partir de las secuencias obtenidas (Figura 11) utilizando el programa disponible en la página <http://rdp.cme.msu.edu/> (Ribosomal Data Project) y el programa Mega 4. Como era de esperarse, se observó que la filogenia del gen ADNr16S agrupa a los aislamientos según el género determinado por homología de secuencias.

**Tabla 4.** Género determinado para las doce cepas estudiadas y su correspondiente hospedero vegetal.

Cepa	Hospedero	Gènero
GA 33	<i>Senegalia bonariensis</i>	<i>Mesorhizobium</i>
FB11B	<i>Vachellia caven</i>	<i>Mesorhizobium</i>
EF62B	<i>Aeschynomene montevidensis</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
EF67B	<i>Calliandra parvifolia</i>	<i>Rhizobium</i>
MZ23A	<i>Indigofera suffruticosa</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
EF88A	<i>Lotus sp.</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
EF36B	<i>Melilotus indicus</i>	<i>Sinorhizobium</i>
GA12	<i>Mimosa urugüensis</i>	<i>Cupriavidus</i>
GA23	<i>Mimosa urugüensis</i>	<i>Cupriavidus</i>
EF48A	<i>Mimosa urugüensis</i>	<i>Cupriavidus</i>
DC32A	<i>Omithopus micranthus</i>	<i>Rhizobium</i>
DC12A	<i>Sesbania sp</i>	<i>Azorhizobium</i>



**Figura 11.** Filogenia construida a partir de la secuenciación del gen ADNr 16S utilizando la página <http://rdp.cme.msu.edu/> y el programa Mega 4. Los valores de bootstrap están indicados en los nodos de las ramas y el algoritmo utilizado fue el weighted neighbor joining.

#### 4.2.2. Amplificación y secuenciación del gen *nifH*

Empleando cebadores específicos para el gen *nifH*, se comprobó la presencia de un amplicón del tamaño esperado en once de las doce cepas en estudio (con excepción de la cepa D32A proveniente de *O. micranthus*). Los fragmentos fueron secuenciados a partir de un solo extremo (cebador Eufornif). La calidad de las secuencias permitió obtener tener información de cinco aislamientos. En la tabla 5 se muestran las cepas en las que se obtuvieron secuencias de buena calidad y los géneros bacterianos donde se encontraron los homólogos más cercanos. Como se puede observar dos genes (cepas EF62B y GA12) presentaban alta homología con genes *nifH* pertenecientes a géneros distintos a los obtenidos de acuerdo al análisis del ADNr16S.

**Tabla 5.** Géneros bacterianos con homólogos más cercanos a los genes *nifH* y 16S secuenciados.

Cepa	Género según gen <i>nif H</i>	Género según ADNr16S
EF62B	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
EF36B	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Sinorhizobium</i>
FB11B	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>
GA12	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Cupriavidus</i>
MZ23A	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>

### 4.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

#### 4.3.1. Fisiología

##### 4.3.1.1. Crecimiento a diferentes pHs en medio sólido y líquido

El estudio del crecimiento a diferentes pHs en medio YMA+G sólido, reveló que casi todos los aislamientos estudiados crecieron en un rango de pH entre 4,5 y 8 (Figura 12). Las excepciones fueron las cepas *Azorhizobium* sp. DC12A y *Mesorhizobium* sp. FB11B, cuyo crecimiento se vio favorecido en medios ácidos.

La cepa *Mesorhizobium* sp. GA33 presentó un crecimiento similar bajo todos los valores de pH trabajados. La colonia era chica, de borde ondulado y elevado bajo el rango de pH 4,5-5,5; a valores más básicos (6,0-7,5) la morfología cambiaba,

pasando a ser una colonia irregular, plana y con mayor crecimiento en la periferia. Cuando se alcanzó un valor de 8,0 la colonia volvió a ser redonda pero plana y de borde liso. Cabe destacar el cambio notorio de morfología cuando se pasa de un pH ácido (4,5) a uno básico (8,0).

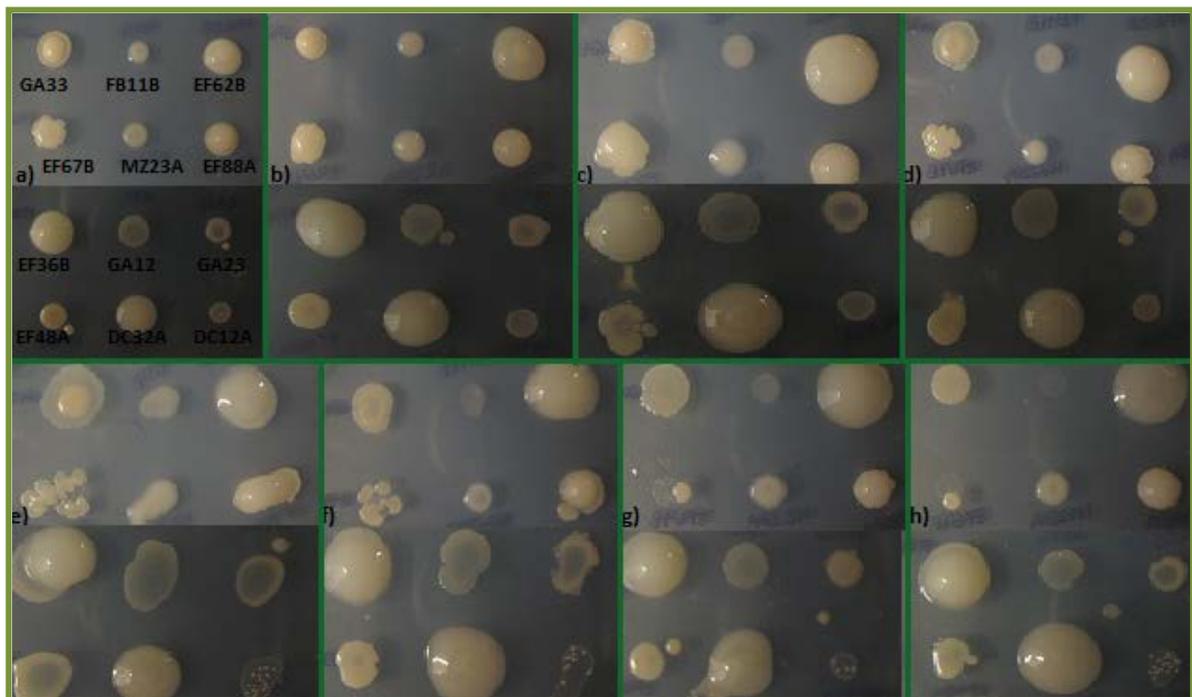
Las cepas *Mesorhizobium sp.* FB11B y *Bradyrhizobium sp.* MZ23A presentaron colonias chicas, redondas, de borde liso y convexo; a valores de pH ácidos (4,5-6,0). El primero de estos aislamientos creció levemente a partir de un valor de pH de 5,0 pero el tamaño disminuyó cuando los valores aumentaron, hasta que a pH 7,0 ya casi no se observó crecimiento. Por otro lado, el aislamiento *Bradyrhizobium sp.* MZ23A creció a pH neutros y básicos pero el cambio en su morfología en comparación con valores más ácidos fue evidente, la colonia continuó siendo redonda y lisa pero de menor tamaño y con mayor concentración de células en la periferia.

Los aislamientos *Cupriavidus sp.* GA23 y *Azorhizobium sp.* DC12A mostraron un crecimiento reducido a pH ácido 4,5, pero se observó un aumento del diámetro de ambas colonias en relación al pH, siendo este cambio más pronunciado en la segunda cepa. Este aumento se observó hasta un valor de pH de 6,0 ya que luego a valores mayores la cepa *Azorhizobium sp.* DC12A permaneció de tamaño mediano y la *Cupriavidus sp.* GA23 en cambio era más pequeña. Ambas presentaron una morfología similar en el rango de pH de 4,5-6,0, el crecimiento es mayor en la periferia. Para la cepa *Cupriavidus sp.* GA23 a valores de pH mayores de 6,0 el crecimiento es casi nulo, sólo se observaron colonias pequeñas aisladas.

Las cepas *Rhizobium sp.* EF67B y la *Cupriavidus sp.* EF48A no pudieron ser agrupadas de acuerdo a su crecimiento en el rango de pH estudiado. El primero de estos dos aislamientos presentó un crecimiento reducido a valores de pH ácidos (4,5-6,0), las colonias fueron de borde irregular y poco mucosas. A pH neutro la colonia se observó como un aglomerado de colonias pequeñas, para luego disminuir nuevamente al aumentar el pH. En el caso de la cepa *Cupriavidus sp.* EF48A cuando se la sembró en placas con pH 4,5, se obtuvo una colonia de borde liso, pequeña y redonda. Luego a valores de pH más cercanos al neutro (7,0) la colonia alcanzó un tamaño mediano, para finalmente volver a decrecer a partir de un valor de 7,0. En

todo el rango de pH la colonia fue poco mucosa y en varios de los pH trabajados se observó un mayor crecimiento en la periferia de la colonia.

Las cepas restantes (*Bradyrhizobium* sp. EF88A, *Bradyrhizobium* sp. EF62B, *Sinorhizobium* sp. EF36B y *Rhizobium* sp. DC32A) a pH ácido presentaron colonias chicas, redondas, convexas y mucosas de color crema. Para estos aislamientos, con excepción de *Bradyrhizobium* sp. EF88Aa medida que aumenta el pH hacia valores neutros, también lo hace el diámetro de la colonia gradualmente y se estabiliza a pH neutro. Estas colonias también se tornan más mucosas con el aumento de pH. Por otro lado la cepa *Bradyrhizobium* sp. EF88A proveniente de *Lotus* sp. aumentó su tamaño de colonia cuando se la crece en medio con pH 5,0 y 5,5, pero luego las colonias vuelven a ser de diámetro reducido. Este resultado se observó en el resto de las placas con valores de pH mayores a 5,5, al aumentar el pH también se dio un aumento de mucosidad en las colonias de esta cepa.



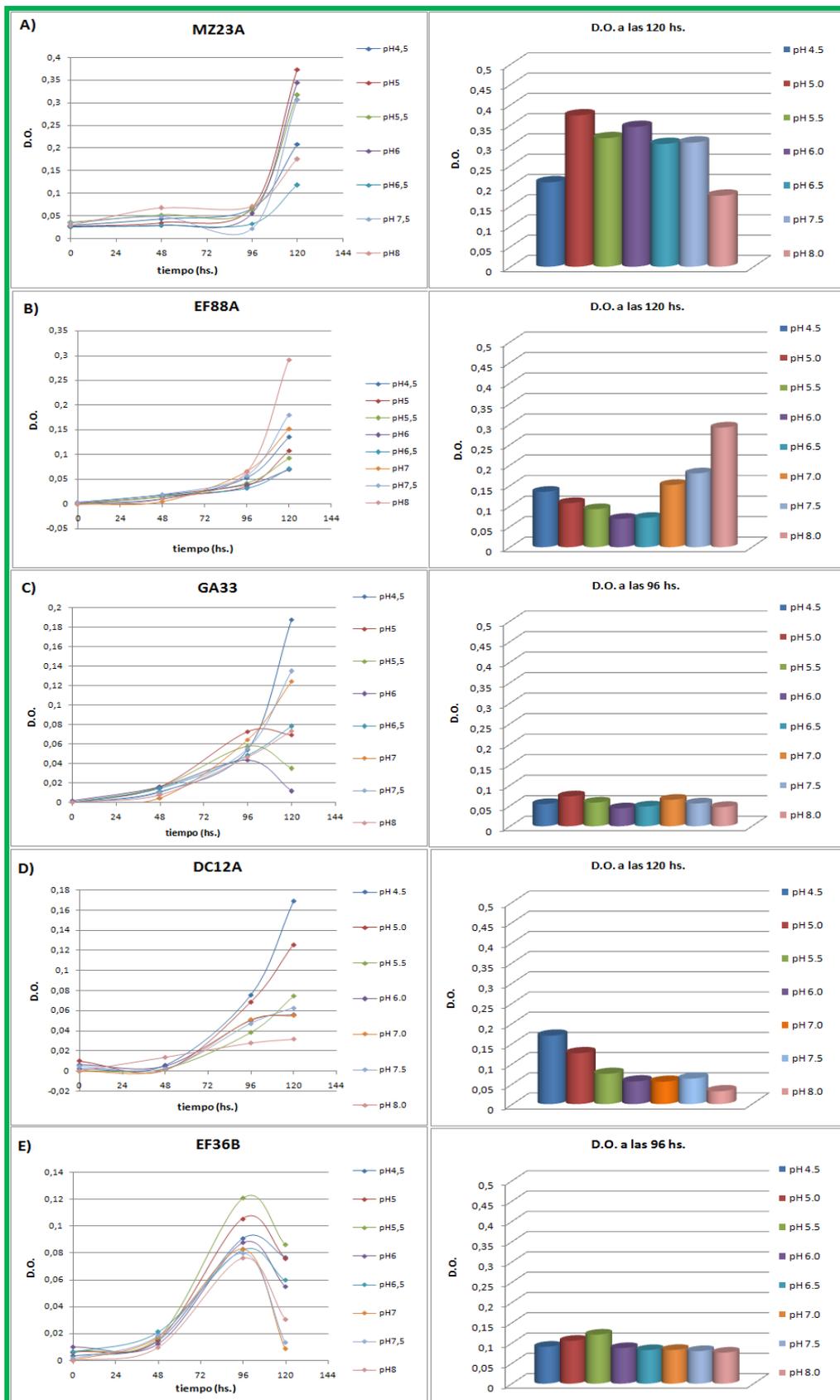
**Figura 12.** Fotos de los doce aislamientos crecidos en medio sólido YMA+G a diferentes pHs. **a)** cepas a pH 4,5; **b)** pH 5,0; **c)** pH 5,5; **d)** pH 6,0; **e)** pH 6,5; **f)** pH 7,0; **g)** pH 7,5; **h)** pH 8,0.

A partir de los datos obtenidos de las curvas de crecimiento de los aislamientos en medio YMA+G líquido se comparó la D.O. en fase exponencial para los distintos valores de pH (de 4.5 a 8.0) (Figura 13). Las cepas se diferenciaron claramente en dos grupos según su fase lag un grupo presentó una fase de adaptación lenta y el otro grupo una fase de adaptación mucho más corta. Las cepa aislada de *Indigofera suffruticosa* (*Bradyrhizobium* sp. Mz23A) y la de *Lotus* sp. (*Bradyrhizobium* sp. EF88A) mostraron una fase lag extendida para todos los pH trabajados de aproximadamente 96 hs. Ambas cepas generaron colonias chicas y mucosas cuando fueron crecidas en medio sólido y necesitaron de 7-9 días para tener un buen crecimiento. En el caso de la cepa *Bradyrhizobium* sp. MZ23A (Figura 13A) puede observarse en la Figura 13.G que para todos los pHs trabajados, con excepción del 7.0, la cepa mostró un crecimiento similar, siendo éste mayor en el rango de pH 5,0-7,5. La misma tendencia en el crecimiento se observó en la cepa *Bradyrhizobium* sp. EF88A (Figura 13B), sin embargo a las 120 hs. los valores de D.O. en este caso fueron menores, observándose a pHs básicos un mayor crecimiento.

En el grupo de crecimiento rápido podemos diferenciar algunos aislamientos con una fase lag más corta que otros, éste es el caso de la cepa aislada de *Senegalia bonariensis* (*Mesorhizobium* sp. GA33, Figura 13C), *Melilotus indicus* (*Sinorhizobium* sp. EF36B) y las tres de *Mimosa urugüensis* (*Cupriavidus* sp. GA12, *Cupriavidus* sp. GA23 y *Cupriavidus* sp. EF48A; Figura 13H, I, J respectivamente). En el caso de las cepas *Cupriavidus* sp. GA12 (Figura 13H) y *Sinorhizobium* sp. EF36B (Figura 13E) se observa un crecimiento máximo a valores de pH cercanos a 5,5, y una fase lag algo menor a las 50 hs. Las cepas GA23 (Figura 13I), EF48A (Figura 13J) y GA33 (Figura 13C) no mostraron un crecimiento uniforme en el rango de pH estudiado.

Los aislamientos restantes; *Rhizobium* sp. EF67B (obtenido de *Calliandra parvifolia*), *Azorhizobium* sp. DC12A (obtenido de *Sesbania* sp.) y *Rhizobium* sp. DC32A (obtenido de *O. micranthus*) presentan un crecimiento algo mas lento con una fase lag de aproximadamente 50 hs. La cepa *Rhizobium* sp. EF67B (Figura 13G) presentó un crecimiento en el rango de pH de trabajo muy similar al de la cepa *Bradyrhizobium* sp. MZ23A pero con valores de D.O. menores. Mientras que el aislamiento *Rhizobium* sp. DC32A (Figura 13F) mostró un mayor crecimiento a pH 6,0 y 6,5; la

cepa *Azorhizobium* sp. DC12A (Figura 13.D) prefirió valores de pH más ácidos (4,5 y 5,0).



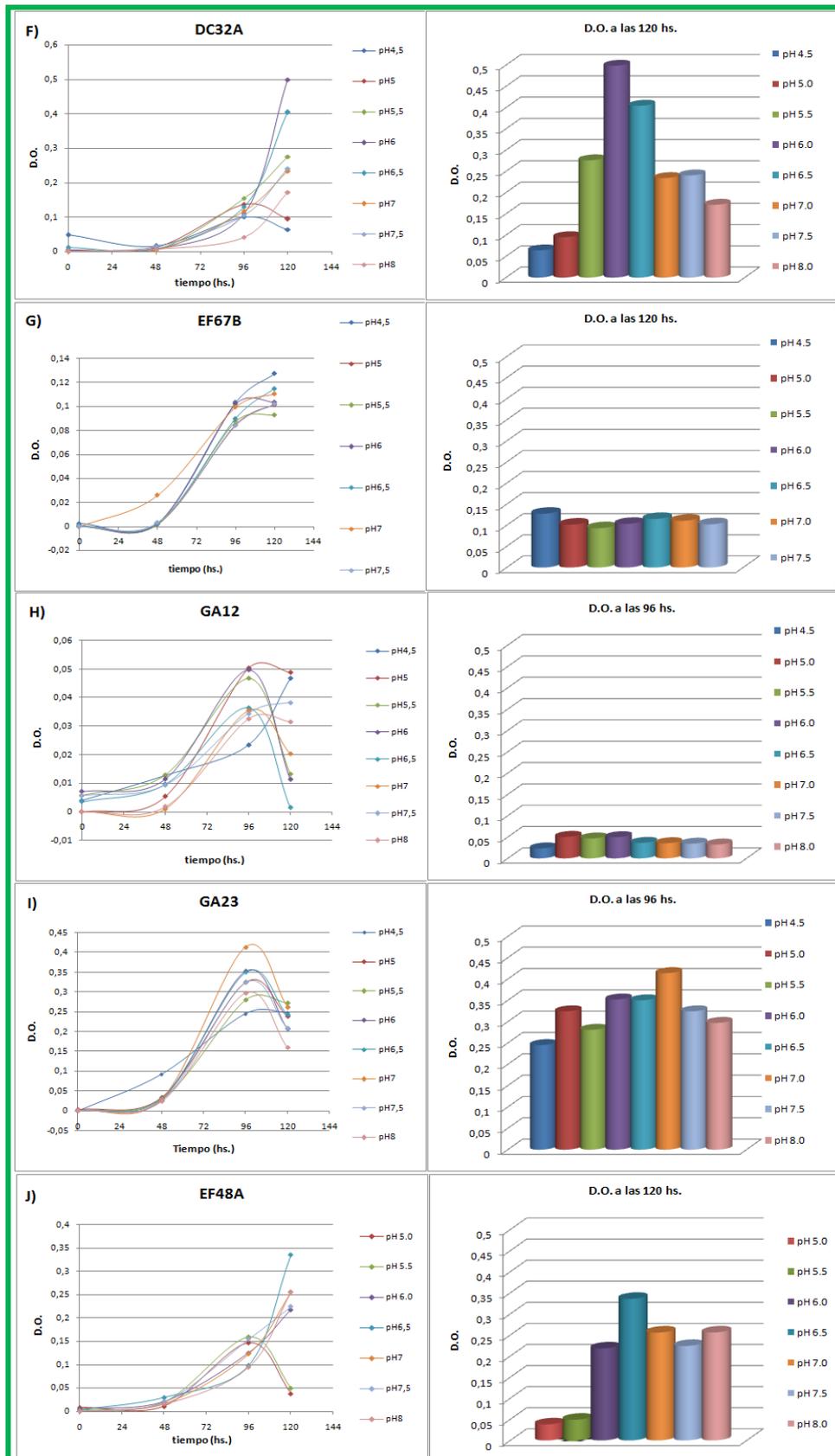


Figura 13. Gráficos de D.O. de cada cepa a cada pH vs. tiempo de incubación; y gráficos de barras de la D.O. al tiempo de crecimiento óptimo para cada pH, para cada cepa.

En la Tabla 6 se detallan los valores del tiempo de generación para cada cepa creciendo a pH óptimo y al pH que tuvo menor crecimiento, así como también la fase de adaptación o lag, y el rango de pH al que crece cada aislamiento.

**Tabla 6.** Valores del tiempo de generación (g) a pH óptimo y mínimo, así como también de la fase lag para cada aislamiento. Se presenta también el rango de pH al que crecen las cepas.

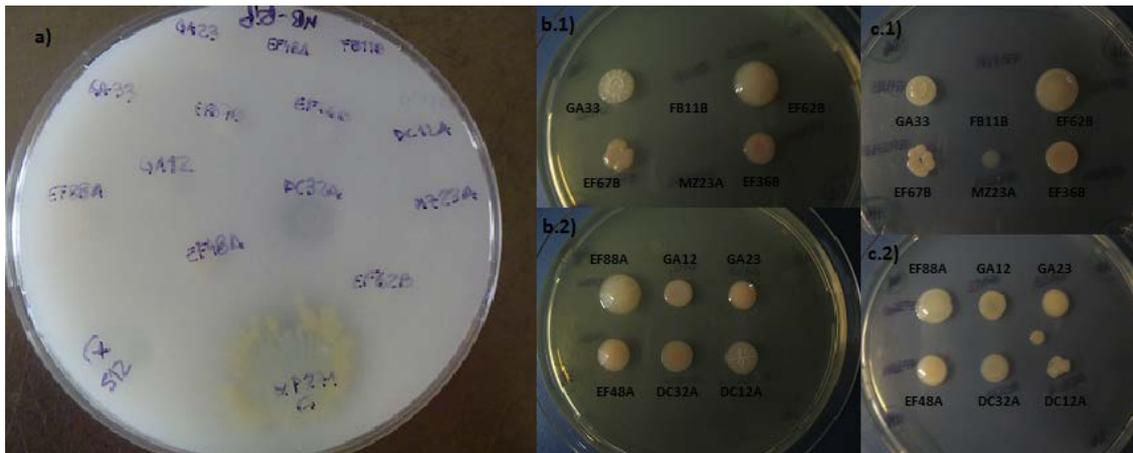
Aislamiento	g (pH óptimo) (hs)	g (pH mínimo) (hs)	Fase lag (hs)	Rango de pH de crecimiento (YMA+G)
GA33	19 (5,0)	33 (6,0)	48	4,5-8,0
EF67B	9 (4,5)	25 (7,5)	50	4,5-7,5
MZ23A	10 (5,0)	13 (7,0)	96	4,5-8,0
EF88A	11 (8,0)	29 (6,0)	96	4,5-8,0
EF36B	17 (5,5)	16 (8,0)	48	4,5-8,0
GA12	15 (5,0)	12 (8,0)	48	4,5-8,0
GA23	13 (7,0)	34 (4,5)	48	4,5-8,0
EF48A	14 (6,5)	45 (7,5)	48	5,0-8,0
DC32A	10 (5,5)	20 (8,0)	50	4,5-8,0
DC12A	21 (4,5)	128 (8,0)	50	4,5-8,0

#### 4.3.1.2. Evaluación de la capacidad solubilizadora de fosfato inorgánico de las cepas, producción de sideróforos, celulasas y crecimiento en medio TY y LB

Mediante el crecimiento de las cepas en medio NBrip, se pudo observar que la cepa *Rhizobium sp.* DC32A fue capaz de solubilizar fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) (Figura 14.a), lo cual se reflejó por la presencia de un halo alrededor de la colonia.

Para este ensayo se utilizó como control positivo la cepa *Pseudomonas fluorescens* 271 y como control negativo la cepa *P. fluorescens* 512.

Con respecto al ensayo de la producción de sideróforos, realizado en medio CAS, sólo las cepas *Azorhizobium sp.* DC12A y *Rhizobium sp.* DC32A produjeron halo naranja en este medio (datos no mostrados).



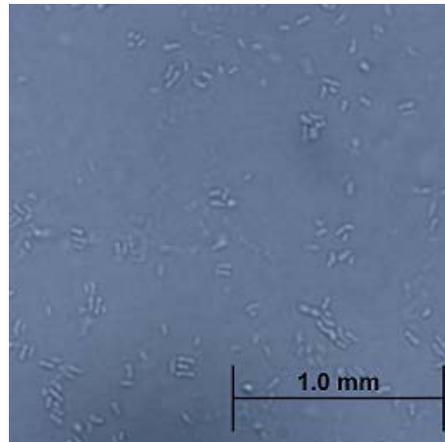
**Figura 14.** Estudio fisiológico de los aislamientos. a) colonias de los doce aislamientos en medio NBRip; b.1 y b.2) colonias de los doce aislamientos en medio TY pH 5,5; c.1 y c.2) colonias de los doce aislamientos en medio LB pH 5,5.

La producción de celulasas en medio YMA+G con carboximetilcelulosa pudo visualizarse en las cepas *Rhizobium sp.* DC32A, *Rhizobium sp.* EF67B, *Cupriavidus sp.* GA12 y *Cupriavidus sp.* EF48A. Este resultado se determinó mediante la observación de un halo de color amarillento alrededor de las colonias.

En cuanto a su crecimiento en medio TY (Figura 14.b1 y b2) y LB (Figura 14.c1 y c2), la mayoría de los aislamientos crecieron normalmente a excepción de la cepa *Mesorhizobium sp.* FB11B que no creció en ninguno de los dos medios, y de la cepa *Bradyrhizobium sp.* MZ23A que sólo creció en LB aunque la colonia fue muy pequeña y algo transparente. Las cepas *Bradyrhizobium sp.* EF62B y *Rhizobium sp.* EF67B fueron las que mostraron mayor crecimiento formando colonias de apariencia mucosa. La cepa *Rhizobium sp.* EF67B creció como acumulo de varias colonias pequeñas dando forma de flor, pudiendo deberse a un menor número de UFC (unidades formadoras de colonias). Los resultados se presentan en la Tabla 7.

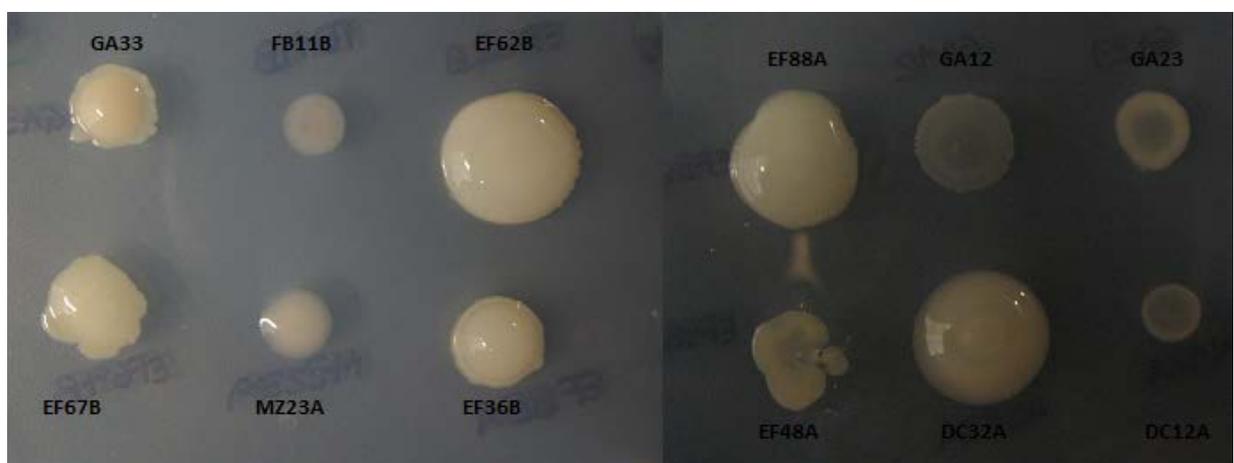
### 4.3.2. Morfología

La observación al microscopio óptico de los diferentes aislamientos, mostraron una morfología de bacilos cortos (Figura 15).



**Figura 15.** Foto de un cultivo en medio líquido YMA+G del aislamiento MZ23A observado al microscopio invertido Olympus IX81 con un objetivo de 100x, utilizando aceite de inmersión.

El segundo grupo lo conforman las cepas *Mesorhizobium sp.* GA33, *Rhizobium sp.* EF67B y *Sinorhizobium sp.* EF36B, estas fueron de tamaño mediano; también redondas, de borde ondulado, superficie lisa y de color blanco-amarillento; pero en este caso no son convexas sino que elevadas y cremosas en menor medida que el grupo anterior. Como caracteres de transmisión de la luz cabe destacar que las colonias de estas seis cepas fueron brillantes en cuanto a luz reflejada.



**Figura 16.** Estudio morfológico de los aislamientos en medio YMA+G pH 5,5.

**Tabla 7.** Resultados de la morfología y los estudios fisiológicos de los doce aislamientos.

Aislamiento	Morfología de las colonias en medio YMA+G	YMA+G (extracto de levadura, manitol, glutamato) pH 6,8	LB pH 5,5	TY pH 5,5	Producción de sideróforos (CAS)	Solubilización de fosfatos (NB-Rip)	Producción de celulasas (CMC)	Género obtenido a partir del ADNr16S
GA33	chica, redonda, mucosa, amarilla	+	+	+	-	-	-	<i>Mesorhizobium</i>
FB11B	chica, redonda, poco mucosa, blanca-amarillenta	+	-	-	-	-	-	<i>Mesorhizobium</i>
EF62B	grande, irregular, muy mucosa, amarilla	+	+	+	-	-	-	<i>Bradyrhizobium</i>
EF67B	chica, redonda, poco mucosa, blanca	+	+	+	-	-	+	<i>Rhizobium</i>
MZ23A	chica, redonda, mucosa, blanca, con hilo	+	-	+	-	-	-	<i>Bradyrhizobium</i>
EF88A	mediana, redonda, mucosa, blanca	+	+	+	-	-	-	<i>Bradyrhizobium</i>
EF36B	grande, irregular, muy mucosa, blanca	+	+	+	-	-	-	<i>Sinorhizobium</i>
GA12	mediana, forma de flor, poco mucosa, amarilla	+	+	+	-	-	+	<i>Cupriavidus</i>
GA23	mediana, redondas, poco mucosa, amarilla	+	+	+	-	-	-	<i>Cupriavidus</i>
EF48A	mediana, redonda, poco mucosa, amarilla	+	+	+	-	-	+	<i>Cupriavidus</i>
DC32A	grande, redonda, muy mucosa, blanca	+	+	+	+	+	+	<i>Rhizobium</i>
DC12A	chica, redonda, poco mucosa, blanca-amarillenta	+	+	+	+	-	-	<i>Azorhizobium</i>

Los restantes aislamientos no pudieron ser agrupados según su morfología ya que no presentaron pocas características en común. La cepa *Cupriavidus sp.* EF48A presentó forma irregular y al igual que para las cepas *Cupriavidus sp.* GA23, *Cupriavidus sp.* GA12 y *Azorhizobium sp.* DC12A pudo observarse un crecimiento mayor en la periferia de la colonia. Los cuatro aislamientos tuvieron una elevación de colonia plana. Tanto la cepa *Cupriavidus sp.* GA12 como la *Cupriavidus sp.* GA23 mostraron bordes ondulados, pero la primera presentó menor grado de crecimiento bacteriano. La cepa *Azorhizobium sp.* DC12A tuvo un tamaño menor y fue de borde liso.

Por otro lado, las cepas *Bradyrhizobium sp.* MZ23A y *Mesorhizobium sp.* FB11B mostraron colonias chicas, de borde liso y color blancuzco. La primera tuvo una colonia convexa, mientras que la segunda fue plana. Y en cuanto a la transmisión de la luz ambas presentaron colonias opacas. Estos resultados así como también los de los ensayos de fisiología se resumen en la Tabla 7.

## 5. DISCUSIÓN

El estudio de especies de leguminosas nativas, a excepción de las que tienen un interés agrícola tradicional, así como posibles usos de las mismas, es escaso en Uruguay. Es entonces que este trabajo tuvo como objetivo aportar datos al conocimiento de los rizobios asociados a algunas especies de leguminosas nativas. Aquellos ejemplares vegetales que presentaron nódulos fueron colectados y sus microsimbiontes aislados. De la totalidad de los mismos, doce fueron seleccionados para su posterior caracterización en este trabajo (tabla 3).

Todos los aislamientos estudiados al ser observados al microscopio óptico presentaron una morfología de bacilos cortos, Gram negativos y no esporulados (Figura 15), morfología característica de los rizobios.

Mediante el análisis de la secuencia del ADN<sub>r</sub>16S se determinó el género bacteriano de los aislamientos obtenidos. De todas formas es importante destacar que en este trabajo sólo se realizó la secuenciación a partir del cebador Eub27f. Para lograr una identificación más certera se tendría que haber secuenciado una región mayor y también complementar los datos obtenidos a partir de otros genes conservados también empleados para la identificación de género como ser *rpoB*, *gyrB* (29). Cabe resaltar que se obtuvieron rizobios pertenecientes tanto a las  $\alpha$  como a las  $\beta$  proteobacterias y al analizar la filogenia según las secuencias obtenidas, se observó claramente que las cepas se agruparon según su grupo y dentro de éste según su género (Figura 15). Se comprobó que las leguminosas del tipo *Papilionoideae* estaban noduladas por  $\alpha$ -rizobios pertenecientes a los géneros *Bradyrhizobium* (aislamientos provenientes de *A. montevidensis*, *Lotus sp* o *I. suffruticosa*) *Rhizobium* (aislamiento proveniente de *O. micranthus*), *Azorhizobium* (aislamiento proveniente de *Sesbania sp.*) y *Sinorhizobium* (aislamiento proveniente de *M. indicus*). Estas relaciones ya habían sido frecuentemente observadas reforzando así el conocimiento previo sobre la alta especificidad en la interacción entre los rizobios y sus leguminosas hospederas (1). Los resultados más novedosos se encontraron al analizar los simbiontes de las leguminosas pertenecientes al grupo de las *Mimosoideae*. En este caso se obtuvieron tanto  $\alpha$  como  $\beta$  rizobios pertenecientes a

los géneros *Mesorhizobium* y *Cupriavidus* respectivamente. Si bien ya se habían encontrado cepas de *Mesorhizobium* y *Cupriavidus* nodulando otras *Acacias* y *Mimosas* respectivamente, éste sería el primer trabajo donde se encuentran estos géneros en nódulos de *Vachellia caven* (antiguamente *Acacia caven*) y de *Mimosa uruguensis*.

De los doce aislamientos estudiados, sólo se logró obtener la secuencia del gen *nifH* en cinco cepas. Este hecho podría indicar que estos aislamientos no son en realidad diazótrofos o quizás que los cebadores empleados no sean los más adecuados para la amplificación a partir de especies bacterianas tan diferentes. Es así que otros autores han recomendado el empleo de los cebadores Pol (42). El hecho de detectar la presencia del gen *nifH* no es evidencia suficiente como para afirmar que dichas cepas efectivamente realizan el proceso de FBN. Es posible que las bacterias ingresen a las células vegetales y luego no culminen la formación del nódulo en forma eficiente o que el complejo enzimático nitrogenasa no se exprese y/o ensamble correctamente. Para corroborar que efectivamente se produce la FBN habría que emplear otras metodologías como por ejemplo el ensayo de reducción del acetileno o mediante el empleo de isótopos de N (12, 52). El hecho de que en algunos aislamientos los géneros determinados a partir de las secuencias del gen *nifH* no dieron resultados congruentes con los obtenidos a partir de las secuencias del ADN<sub>r16S</sub> podría estar indicando que en este caso, estas cepas hayan adquirido la capacidad de fijar nitrógeno por transferencia horizontal de genes. Este hecho se ha observado en otros rizobios y es apoyado por la observación de que en muchos genomas, los genes de fijación de nitrógeno se encuentran en plásmidos. (4).

En cuanto al fenotipo de los aislamientos, se vio que las cepas del género *Bradyrhizobium* fueron las que tuvieron una mayor fase de adaptación para crecer en medio líquido, siendo ésta de 96 hs. en todo el rango de pH evaluado. Este resultado era esperado ya que dicho género es conocido por su lento crecimiento, de hecho el sufijo Brady- significa lento. En este trabajo sin embargo no se observó un mayor tiempo de generación como era de esperarse (28). Al tener una velocidad de crecimiento lento, estos cultivos son más propensos a contaminarse, por lo que debería haberse realizado una evaluación de la pureza del cultivo al final del ensayo

así como haber realizado más ensayos en forma independiente para determinar si los datos obtenidos son repetitivos y estadísticamente significativos.

Por el contrario, las cepas de menor fase lag fueron las pertenecientes a los géneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Cupriavidus* y la cepa de *Mesorhizobium* aislada de *Senegalia bonariensis*. Los resultados obtenidos para los dos primeros géneros concuerdan con estudios anteriores. Sin embargo, *Mesorhizobium* se conoce como un género de crecimiento intermedio entre *Bradyrhizobium* y *Sinorhizobium* (29).

Al ensayar la capacidad de los aislamientos de crecer en medios con diferentes pHs, se comprobó en general una alta capacidad metabólica de adaptación a pH extremos tanto en medio sólido como en líquido. Y se observó que los aislamientos pertenecientes al mismo género, en general presentaron patrones de crecimiento similares. Sin embargo, las colonias de aislamientos del mismo género presentaron morfologías diversas a un mismo valor de pH.

Kloepper definió en 1978 a las PGPR (por sus siglas en inglés, que significan *plant growth promoting rhizobacteria*, o rizobacteria promotora del crecimiento vegetal), como bacterias altamente eficientes para aumentar el crecimiento de las plantas e incrementar su tolerancia a otros microorganismos causantes de enfermedades (26). La promoción del crecimiento vegetal por rizobacterias ocurre por varios mecanismos. Uno de ellos es la síntesis de fitohormonas (Ácido Indol Acético, AIA) que favorecen el desarrollo radicular. Otro mecanismo es la solubilización de nutrientes poco móviles del suelo, como el fósforo o el hierro (producción de sideróforos). De este modo mejora el ingreso de macronutrientes esenciales hacia la planta, lo que se traduce en una mayor cantidad de biomasa (36).

Se conoce que los rizobios además de proveer a las leguminosas de nitrógeno, también son capaces mejorar el crecimiento de las plantas mediante otros mecanismos. En este trabajo observamos que algunas cepas fueron capaces de solubilizar fosfatos inorgánicos, producir sideróforos o celulasas. De acuerdo a estos resultados podemos suponer que algunas de las cepas estudiadas podrían mejorar el crecimiento de las plantas por medio de otros mecanismos además de la fijación de nitrógeno (25).

## 6. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron aportes relevantes al conocimiento de la flora autóctona y de sus bacterias asociadas.
- Una gran variedad de cepas de rizobios tanto de la clase  $\alpha$  como de la  $\beta$ -proteobacteria son capaces de nodular efectivamente diversas especies de leguminosas.
- Los esteros de Farrapos son un reservorio interesante de diversidad bacteriana.
- Se obtuvieron diferentes fenotipos independientemente del género al que pertenecían indicando presencia de cepas diferentes. Se obtuvieron aislamientos capaces de crecer en un amplio rango de pH.

## 7. PERSPECTIVAS

- Comprobar la efectiva fijación biológica de nitrógeno mediante ensayo de reducción del acetileno o a través del empleo de isótopos de N.
- Repetir los ensayos de crecimiento en medio líquido a diferentes pHs para corroborar los datos de velocidad de crecimiento obtenidos.
- Analizar la presencia de genes involucrados en la nodulación como *nodA*, *nodC*, *nodD*.
- Realizar ensayos en planta para probar la capacidad de nodular diferentes hospederos, así como también la capacidad de los diferentes aislamientos de promover el crecimiento vegetal.
- Evaluar su uso como biofertilizantes.

## 8. ANEXO

### 8.1. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

#### YMA+Glutamato

Pesar y agregar los componentes detallados en la Tabla 8.1 a excepción del agar. Agregar agua destilada y mezclar hasta disolver los componentes. Ajustar el pH a 6,8 y agregar el agar en el caso de preparar medio sólido. Esterilizar 20 minutos a 121 °C y luego agregar el glutamato previamente esterilizado.

**Tabla 8.1.** Composición del medio YMA+G.

YMA	
Componente	Cantidad por litro
Manitol	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extracto de levadura	0,5 g
Agar	20 g
Glutamato 10% (p/v)	10 ml

#### LB

Pesar y agregar los componentes detallados en la Tabla 8.2 a excepción del agar. Agregar agua destilada, mezclar hasta disolver los componentes y agregar el agar en el caso de preparar medio sólido. Esterilizar 20 minutos a 121 °C.

**Tabla 8.2.** Composición del medio LB.

LB	
Componente	Cantidad por litro
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	16 g

**TY**

Pesar y agregar los componentes detallados en la Tabla 8.3 a excepción del agar. Agregar agua destilada, mezclar hasta disolver los componentes, y agregar y agregar el agar en el caso de preparar medio sólido. Esterilizar 20 minutos a 121 °C.

**Tabla 8.3.** Composición del medio TY.

TY	
Componente	Cantidad por litro
Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl <sub>2</sub> anhidro 2% (p/v)	2 ml
Agar	16 g

**CAS****Tabla 8.4.** Composición del medio CAS.

CAS	
Componente	Cantidad por 250 ml
<b>Medio base</b>	
Solución salina *	25 mL
H <sub>2</sub> O	187 ml
Agar	3,75 g
PIPES	7,56 g
Extracto de levadura 5% (p/v)	5 ml
MgCl 1M	0,25 ml
CaCl <sub>2</sub> 0,1M	0,25 ml
Manitol 10% (p/v)	2,5 ml
Glucosa 20% (p/v)	2,5 ml
<b>Solución salina*</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3g
NaCl	0,5g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0g
H <sub>2</sub> O c.s.p. 100 mL	
<b>Solución colorante:</b>	
CAS	15,12mg
H <sub>2</sub> O	14,75mL

Luego de autoclavar la solución base, salina y HDTMA, se mezclan. Primero la salina se agrega a la solución base, luego a la solución colorante se le agrega el cloruro de hierro con HDTMA, y finalmente esta mezcla se une a la de solución base.

La solución colorante se mezcla con 250µL de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (135mg/50mL HCl 0,01N). Bajo agitación se agrega una solución de 18,22mg de HDTMA en 10mL de H<sub>2</sub>O.

### **CMC**

En este caso, se realiza un medio base de YMA+G (Tabla 8.1) y se agregan 2,0 g de carboximetilcelulosa (CMC) para un litro de solución. Esterilizar 20 minutos a 121 °C.

### **Tris-Acético-EDTA (TAE)**

Disolver en agua destilada los componentes detallados en la Tabla 8.5 en cantidad suficiente para lograr la concentración indicada.

**Tabla 8.5.** Composición de la solución TAE.

<b>Tris-Acético-EDTA (TAE) 1x</b>	
<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Tris-Acetato	0,04 M
EDTA	0,001 M

### **NBrip**

Pesar y agregar los componentes de la Tabla 8.6 a excepción del agar. Agregar agua destilada, mezclar hasta disolver los componentes, y agregar agar. Esterilizar 20 minutos a 121 °C.

**Tabla 8.6.** Composición del medio NBrip

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

### **Buffer de PCR**

Se empleó el buffer provisto por la empresa donde se adquirió la enzima Taq polimerasa (Fermentas). En la Tabla 8.7 se muestra la composición del mismo.

**Tabla 8.7.** Composición del buffer de PCR.

<b>Buffer de PCR</b>	
<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Tris-HCl, pH 8,4	200 mM
KCl	500 mM

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. **Allen, O. N.; Allen, E. K.** 1981. *The Leguminosae, a Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation*. Madison, Wisconsin, U.S.A.: University of Wisconsin Press.
2. **Angus, A.; Hirsch, A.** 2010. *Insights into the history of the legume betaproteobacterial symbiosis*. *Molecular Ecology*.**19**: 28-30
3. **Balachandar D., P. Raja, K. Kumar, and S. P. Sundaram.** 2007. *Non-rhizobial nodulation in legumes*. *Biotechnology and Molecular Biology Review*.**2**:049-057.
4. **Barcellos, G. F.; Menna, J. S.; da Silva Batista & M. Hungria.** 2007. *Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a Bradyrhizobium japonicum inoculant strain to indigenous diazotrophs Sinorhizobium (Ensifer) fredii and Bradyrhizobium elkanii in a Brazilian Savannah Soil*. *Appl. Environ. Microbiol.***73**: 2635-2643.
5. **Bauer, W. D.; Mathesius, U.** 2004. *Plant responses to bacterial quorum sensing signals*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 429-433.
6. **Broughton, W. J.; Jabbouri, S.; Perret, X.** 2000. *Keys to Symbiotic Harmony*. *Journal of Bacteriology*.**182**: 5641-5652.
7. **Cayssials, R.; Pérez Miles, F; Maneyro, R.** 2002. *Pautas para la elaboración de un Plan de Manejo para el Área de Esteros de Farrapos. Primera Parte: Medio Físico y Fauna*. Informe final. Convenio Facultad de Ciencias – DINAMA.
8. **Chen W. M.; Laevens, S.; Lee, T. M.; Coenye, T.; De Vos, P.; Mergeay, M.; Vandamme, P.** 2001. *Ralstonia taiwanensis sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**:1729-1735.
9. **Chen, W. M., S. M. De Faria, E. K. James, G. N. Elliott, K.-Y. Lin, J.H. Chou, S.-Y. Sheu, M. Cnockaert, J. I. Sprent, and P. Vandamme.** 2007. *Burkholderia nodosasp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes Mimosa bimucronata and Mimosa scabrella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.**57**:1055-1059.
10. **Crews, T. E.; Peoples, M. B.** 2004. *Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs*. *ELSEVIER*.**102**: 279-297.
11. **DeshPal S. Verma.** 1992. *Signals in Root Nodule Organogenesis and Endocytosis of Rhizobium*. *The Plant Cell*.**4**: 373-382.
12. **Dilworth, M.J.** 1996. *Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from Clostridium pasteurianum*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **127**: 285-294.

13. Dita, M. A.; Rispaill, N.; Prats, E.; Rubiales, D.; Singh, K. B. 2006. *Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes*. **147**: 1-24.
14. Elliott G. N., W. Chen, J. Chou, H. Wang, S. Sheu, L. Perin, V. M. Reis, L. Moulin, M. F. Simon, C. Bontemps, J. M. Sutherland, R. Bessi, S. M. De Faria, M. J. Trinick, A. R. Prescott, J. I. Sprent, and E. K. James. 2007. *Burkholderia phymatum is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of Mimosa spp. and fixes nitrogen ex planta*. *New Phytologist*. **173**:168-180.
15. Frioni, L. 2006. *Microbiología. Básica, ambiental y agrícola*. Universidad de la República, Montevideo.
16. Galloway, J. N.; Dentener, F. J.; Capone, D. G.; Boyer, E. W.; Howarth, R. W.; Seitzinger, S. P.; Asner, G. P.; Cleveland, C. C.; Green, P. A.; Holland, E. A.; Karl, D. M.; Michaels, A. F.; Porter, J. H.; Townsend, A. R.; Vo, C. J. *Nitrogen cycles: past, present, and future*. Springer. **70**: 153-226.
17. Gepts, P.; Beavis, W. D.; Brummer, E. C.; Shoemaker, R. C.; Stalker, H. T.; Weeden, N. F.; Young, N. D. 2005. *Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference*. **137**: 1228-1235.
18. Gibson, K.E., Kobayashi, H., Walker, G.C. 2008. *Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection*. *Ann. Rev. Gen.* **42**: 413-441.
19. González, M.; Catalán, A. I.; Carbó, A.; Rosconi, F.; Gill, P.R.; Fabiano, E.; Batista, S. 2005. *Fijación biológica de nitrógeno en endófitos y endosimbiontes de plantas*. *Agrociencia*. **9**: 305-310
20. Gyaneshwar, P.; Hirsch, A. M.; Moulin, L.; Chen, W-M.; Elliott, G.N.; Bontemps, C.; Estrada-de los Santos, P.; Gross, E.; Bueno dos Reis Jr., F.; Sprent, J.I.; Young, J.P.W.; James, E.K. 2011. *Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects*. *The American Phytopathological Society*. **24**: 1276-1288.
21. Herridge, D. F. 2008. *Inoculation Technology for Legumes. En: Nitrogen-fixing Leguminous Symbioses*. Springer. **77**-115.
22. Hirsch A. M.; Lum, M. R.; Downie, J. A. 2001. *What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special?* *American Society of Plant Biologist*. **127**:1484-1492.
23. Jones K. M.; Kobayashi, H.; Davies, B. W.; Taga, M. E.; Walker, G. C. 2007. *How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model*. *Nature Reviews*. **5**: 619-632.

24. **Joseph, B.; Ranjan, P. R.; Lawrence, R.** 2007. *Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (Cicer arietinum L.)*. International Journal of Plant Production. **1**: 1-12.
25. **Kirk, J. L.; Beaudette, L.A.; Hart, M.; Moutoglis, P.; Klironomos, J. N.; Lee, H.; Trevors, J.T.** 2004. *Methods of studying soil microbial diversity*. Journal of microbiological Methods. **58**:169-188.
256. **Kloepper, J. W.; Hume, D.J.; Scher, F. M.; Singleton, C.; Tipping, B.; Laliberte, M.; Frauley, K.; Kutchaw, T.; Simonson, C.; Lifshitz, R.; Zaleska, I.; Lee, L.** 1988. *Plant growth-promoting rhizobacteria on canola (rapeseed)*. Plant Diss. **72**:042-46.
27. **Lane, D. J.** 1991. *16S/23S rRNA sequencing*, p. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, NY.
28. **Lewis, G.; Schrire, B.; Mackinder, B.; Lock, M.** 2005. *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens. Kew, UK.
29. **Lloret, L.; Martínez-Romero, E.** 2005. *Evolución y filogenia de Rhizobium*. Revista Latinoamericana de Microbiología. **47**: 43 - 60.
30. **Lodwig, E. y Poole, P.** 2003. *Metabolism of Rhizobium bacteroids*. Crit. Rev. Plant. Sci. **22**: 37-38.
31. **Long, S. R.** 2001. *Genes and Signals in the Rhizobium-Legume Symbiosis*. Plant Physiology. **125**: 69-72.
32. **Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J.** 2004. *Brock biología de los microorganismos*. 10ma ed. Pearson.
33. **Mareque, C.** 2011. *Estudio de la nodulación en una colección de simbioses de Parapiptadeniarigida (angico)*. Tesina de Grado. UdelaR, Montevideo.
34. **Masson-Boivin, C.; Giraud, E.; Perret, X.; Batut, J.** 2009. *Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes?* ELSEVIER. **17**: 458-466.
35. **Moiser, A.; Kroeze, C.; Nevison, C.; Oenema, O.; Seitzinger, S.** 1998. *Closing the global N 2 O budget : nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle inventory methodology*. Springer. **52**: 225-248.
36. **Monza, J.; Marquez, A.** 2004. *Fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis rizobio-leguminosa*. En: *El metabolismo del nitrógeno en las plantas*. Almuzara Estudios S.A. 1-38.
37. **Moulin L., A. Munive, B. Dreyfus, and C. Boivin-Masson.** 2001. *Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria*. Nature. **411**:948-950.

38. Olivares, J. 2006. *Fijación de nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones*. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno. 328-332.
39. Olson, B.; Steppe, T. F.; Litaker, R. W.; Paerl, H. W. 1998. *N<sub>2</sub>-Fixing Microbial Consortia Associates with the Ice Cover of Lake Bonney, Antarctica*. *Microbial Ecology* **36**:231-238.
40. Perret, X.; Staehelin, C.; Broughton, W. J. 2000. *Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity*. *Society*. **64**:180-201.
41. Peters J. W., K. Fisher, and D. R. Dean. 1995. *Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective*. *Annual Review of Microbiology*. **49**:335-366.
42. Poly, F.; Jocteur Monrozier, L.; Bally, R. 2001. *Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil*. *Res. Microbiol.* **152**: 95-103.
43. Priefer, U. B. 1989. *Genes Involved in Lipopolysaccharide Production and Symbiosis are Clustered on the Chromosome of Rhizobium leguminosarum Biovar viciae VF39*. *Journal of Bacteriology*. **171**: 6161-6168.
44. Rees, D. C.; Tezcan, F. A.; Haynes, C. A.; Walton, M. Y.; Andrade, S.; Einsle, O.; Howard, J. B. 2005. *Structural basis of biological nitrogen fixation*. *The Royal Society*. **363**: 971-984.
45. Schwyn B.; Neylands, J. B. 1987. *Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores*. *Analytical Biochemistry*. **160**: 47-56.
46. Spaink, H. P., Kondorosi, A. y Hooykaas, P. J. J. 1998. *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Plant-Associated Bacteria*: Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
47. Sy, A.; Giraud, E.; Jourand, P.; García, N.; Willems, A.; de Lajudie, P.; Prin, Y.; Neyra, M.; Gillis, M.; Boivin-Masson, C.; Dreyfus, B. 2001. *Methylotrophic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes*. *Journal of Bacteriology*. **183**: 214-220.
48. Taiz L., and E. Zeiger. 2006. *Fisiología Vegetal*. 3ra. Ed. Publicaciones de la Universitat Jaume I Castello.
49. Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. 2007. *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution*. **24**:1596-1599.
50. Taulé, C. 2008. *Búsqueda e identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno simbiotes de Parapiptadenia rigida (angico)*. Tesina de Grado. UdelaR, Montevideo.

51. **Teather, R. M.; Wood, P. J.** 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 777-780.
52. **Unkovich, M. J.; Pate, J. S.; Sanford, P.; Armstrong, E. L.** 1994. Potencial precision of the delta <sup>15</sup>N natural abundance method in field estimates of nitrogen fixation by crop and pasture legumes in South-West Australia. *Australian Journal of Agricultural Research.* **45**: 119-132.
53. **Van Rhijn, P.; Vanderleyden, J.** 1995. The rizobium-Plant Symbiosis. *Microbiological Reviews.* **59**:124-142.
54. **Vessey, K.** 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil.* **255**: 571-586.
55. **Velázquez, E.; Silva, L. R.; Peix, A.** 2010. Legumes: a healthy and ecological source of flavonoids. *Curr. Nutr Food Sci.* **6**: 109-144.
56. **Vincent, J. M.** 1970. *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacterial.* I.B.P. Handbook N° 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
57. **Yung, J. P.; Haukka, K.** 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytologist.* **133**: 87-94.
58. **Zabaleta, M.** 2013. *Conservación de Leguminosae nativas y sus bacterias simbióticas del Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay (ROU).* Tesis de Maestría. PEDECIBA.UdelaR, Montevideo.
59. **Zehr, J. P.; Wyman, M.; Miller, V.; Duguay, L.; Capone, D. G.** 1993. Modification of the Fe Protein of Nitrogenase in Natural Populations of *Trichodesmium thiebautii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 669-676.