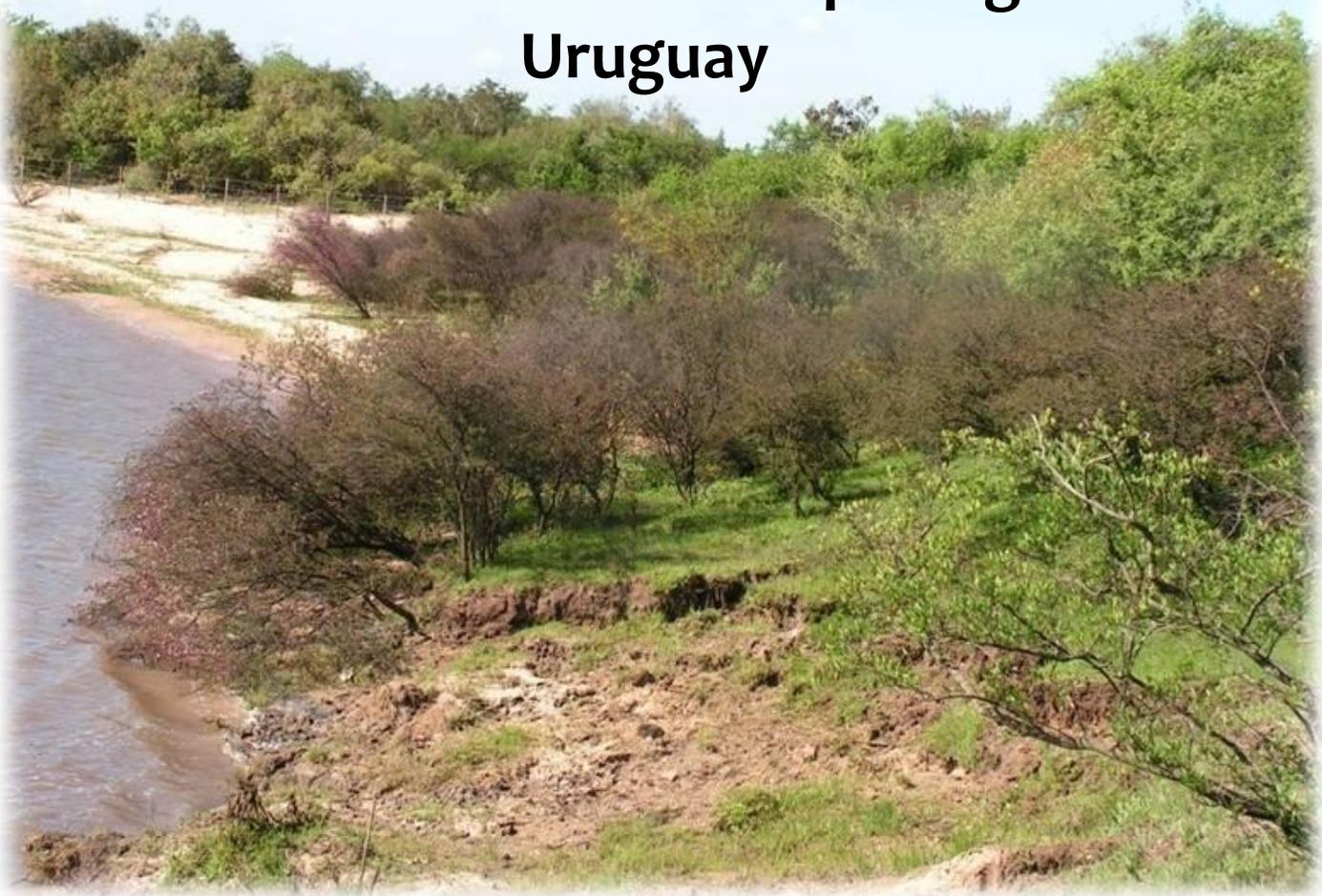


**Facultad de Ciencias
Licenciatura en Biología
Orientación Ecología**

**Estudio de bacterias simbiotes de
leguminosas nativas
Aportes para la conservación de la
biodiversidad en un área protegida de
Uruguay**



Cecilia Ríos Mendaro

Tutor: Dr. Raúl Platero

Cotutora: Dra. Elena Fabiano

Tribunal: Dra. Susana Castro

Dra. Natalia Bajsa

Abril, 2014

Índice de contenido:

1. Resumen	5
2. Introducción	7
2.1 Esteros de Farrapos e islas del Río Uruguay (EFIRU)	7
2.2 Leguminosas nativas	10
2.3 Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)	11
2.4 Taxonomía de rizobios	14
2.5 Evolución ó coevolución Planta-Microorganismo	15
3. Antecedentes de la investigación	16
4. Objetivos	17
4.1 Objetivo general	17
4.2 Objetivos específicos	18
5. Materiales y métodos	19
5.1 Colecta de material biológico	19
5.2 Aislamiento de simbioses y condiciones de crecimiento	19
5.3 Criterio de nombramiento de los aislamientos de la colección	20
5.4 Extracción de ADN genómico, método convencional	20
5.5 Extracción de ADN genómico, método de lisado celular	21
5.6 Técnica de manipulación de alto rendimiento	21
5.7 Amplificación por PCR del gen ARNr 16S	22
5.8 Amplificación por PCR del gen <i>nifH</i>	23
5.9 Visualización y secuenciación de los productos de PCR	23
5.10 Análisis filogenético en base al gen ARNr 16S	24
5.11 Esterilización superficial y germinación de semillas	25
5.12 Ensayos de planta en condiciones gnotobióticas	25
5.13 Efectividad de la nodulación	26
6. Resultados	27
6.1 Construcción de una colección de simbioses bacterianos asociados a leguminosas nativas	27
6.2 Puesta a punto de una metodología de alto rendimiento, para la amplificación del gen ARNr 16S	30
6.3 Identificación y análisis biogeográfico de los aislamientos	32
6.4 Presencia del gen <i>nifH</i> en bacterias aisladas de nódulos	33
6.5 Análisis filogenético	35

6.6 Esterilización superficial y germinación de semillas de leguminosas nativas	40
6.7 Ensayos de nodulación	41
6.8 Ensayos de promiscuidad en el género <i>Mimosa</i>	44
6.9 Estudio de la capacidad de formar nódulos fotosintéticos del aislamiento UYAD13	44
7. Discusión	46
7.1 Colección de simbiontes bacterianos asociados a leguminosas nativas	46
7.2 Identificación de los aislamientos bacterianos de la colección	47
7.2.1 Identificación por secuenciación de los genes ARNr 16S y <i>nifH</i>	47
7.2.2 Análisis filogenético	48
7.3 Distribución bacteriana en distintos ambientes del Parque Nacional EFIRU y pares simbióticos particulares	53
7.4 Ensayo de nodulación	55
7.5 Ensayos de promiscuidad en el género <i>Mimosa</i>	56
7.6 Estudio de la capacidad de formar nódulos fotosintéticos del aislamiento UYAD13	58
8. Conclusiones y perspectivas	60
9.1 Anexo 1	62
10. Bibliografía	66

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1. Mapa de la República Oriental del Uruguay, ampliación en la región centro-oeste del país, brindada por la Intendencia de Río Negro, donde se localiza la zona de Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay (EFIRU).....	9
Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la amplificación de los genes que codifican para los genes ARNr 16S y <i>nifH</i> , respectivamente, y sus temperaturas de fusión.	23
Tabla 2. Listado de las leguminosas estudiadas y ambiente en donde se encontraron (con su respectiva referencia en el mapa de la Figura 1).....	27
Figura 2. Gel de Agarosa (0,8 % p/v) de los productos de PCR de las muestras UYLA 61, UYAC 10, UYAM 14, con distintas concentraciones de ADNg. Se incluyó el producto de PCR de una muestra que se conoce que amplifica mediante la PCR realizada (C+). Se utilizó el marcador de peso molecular <i>GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder</i> (MPM), la flecha roja indica la banda que corresponde a 1500 pb.	31
Figura 3. Ejemplo de gel de Agarosa (0,8% p/v), con los productos de PCR de una reacción realizada con la técnica de alto rendimiento.	31
Figura 4. Gráfico del número de especies de leguminosas diferentes en las que ocurren los géneros bacterianos, para cada uno de los distintos ambientes muestreados en el Parque Nacional EFIRU, Uruguay.....	33
Tabla 3. Géneros bacterianos resultantes a partir de la secuenciación de los genes <i>16S ADNr</i> y <i>nifH</i> , de los aislamientos para los cuales fue posible obtener secuencias de ambos genes.	34
Figura 5. Árbol filogenético de α -Proteobacterias, construido a partir de las secuencias del gen del ARNr 16S.	38
Figura 6. Árbol filogenético de β -Proteobacterias, construido a partir de las secuencias del gen del ARNr 16S.	39
Tabla 4. Leguminosas pertenecientes al género <i>Mimosa</i> y cepas bacterianas perteneciente a las α -Proteobacterias, con las que se llevó a cabo el ensayo de nodulación y promiscuidad.	42
Tabla 5. Leguminosas pertenecientes al género <i>Aeschynomene</i> y cepas bacterianas pertenecientes al género <i>Bradyrhizobium</i> , con las que se llevó a cabo el ensayo de nodulación y el estudio de la formación de nódulos fotosintéticos por parte de la cepa UYAD13.	42
Figura 7. Plantines de mimosas crecidas en tubos de vidrio con medio de cultivo Jensen (sin nitrógeno), inoculadas con la cepa UYMU86 aislada de <i>Mimosa uruguensis</i>	42
Figura 8. Nódulos en las raíces de los plantines de la Figura 7 inoculados con la cepa UYMU86.....	43
Figura 9. Plantines de mimosas crecidas en tubos de vidrio con medio de cultivo Jensen (sin nitrógeno), inoculadas con la cepa UYMA66 aislada de <i>Mimosa adpresa</i>	43
Figura 10. Nódulos en las raíces de los plantines de la Figura 9 inoculados con la cepa UYMA66.....	43
Figura 11. Nódulos “T.2” en las raíces de <i>Aeschynomene montevidensis</i> inoculada con aislamientos provenientes de nódulos en dicha especie.....	44
Figura 13. Nódulos con apariencia de inefectivos en las raíces de <i>Aeschynomene montevidensis</i> inoculada con la cepa UYAD13.....	45
Figura 12. Nódulos con apariencia de efectivos (“T3”) en las raíces de <i>Aeschynomene denticulata</i> inoculada con la cepa UYAD13.....	45

Figura 14. Nódulos con apariencia de efectivos (“T3”) en las raíces de <i>Aeschynomene rudis</i> inoculada con la cepa UYAD13.	45
Tabla 6. Composición del medio YEM.	62
Tabla 7. Composición del buffer TAE.....	62
Tabla 8. Composición del medio Jensen.	63
Tabla 9. Composición de la Solución de micronutrientes para el medio Jensen.	63
9.2 Anexo 2 Tabla 10. Código de nombramiento de las cepas colectadas de nódulos de leguminosas, en el Parque Nacional EFIRU.	64

1. Resumen

Una de las principales líneas de investigación del Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) es el estudio y caracterización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a leguminosas nativas de nuestro país. Uno de los objetivos de este grupo es contribuir a la preservación de nuestros recursos nativos, mediante la generación de conocimientos sobre la diversidad microbiana presente en los suelos de nuestro territorio. Como parte de este objetivo, este trabajo se enfoca en la prospección y conocimiento de rizobios asociados a leguminosas nativas, presentes en el área de Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay (EFIRU). Declarada Parque Nacional e integrante del Sistema Nacional de Áreas Protegidas, EFIRU es una región de importante interés social, ambiental y geopolítico.

Mediante varias giras de prospección al área de EFIRU, se construyó una colección de microorganismos aislados a partir de nódulos de 28 especies de leguminosas nativas. En el presente trabajo, mediante la amplificación y secuenciación del gen que codifica para el ARN de la subunidad ribosomal menor (ARNr 16S) y del gen que codifica para una subunidad estructural de la enzima nitrogenasa (*nifH*), se logró identificar a nivel de género los microorganismos de la colección. El análisis filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S, permitió conocer la especie a la cual pertenecen algunos de los aislamientos. Mediante ensayos de nodulación en planta, se corroboró la capacidad de algunas de las cepas de establecer asociación simbiótica con las leguminosas de las cuales fueron aisladas.

Los resultados obtenidos evidenciaron la gran diversidad de bacterias presentes en las raíces de las leguminosas en EFIRU, encontrándose representados prácticamente todos los géneros de rizobios reportados hasta la fecha.

Los géneros *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* fueron predominantes en las raíces de las leguminosas del parque. Sin embargo, cabe destacar la preferencia observada de las especies del género *Mimosa* por β -rizobios, una tendencia que va de acuerdo a lo observado en otras zonas de nuestro continente. Por su lado la presencia de β -rizobios asociados a nódulos de *Arachis villosa* (subfamilia *Papilionoidea*) y de *Chamaecrysta*

flexuosa (subfamilia, *Caesalpinoideae*) es novedosa y merece ser caracterizado en profundidad.

El conocimiento de los microorganismos que se asocian naturalmente a las raíces de las leguminosas nativas, abre el campo de investigación en búsqueda de inoculantes adaptados a ellas en nuestros suelos, que promuevan su crecimiento y así aportar a la conservación y utilización de dichas especies.

2. Introducción

2.1 Esteros de Farrapos e islas del Río Uruguay (EFIRU)

El área esteros de Farrapos e islas del río Uruguay comprende los esteros de Farrapos y 24 islas e islotes bajo jurisdicción uruguaya, abarcando una superficie de más de 17.495 hectáreas con gran valor biológico y paisajístico. En el año 2004 pasó a integrar la Convención RAMSAR para la conservación de los humedales de importancia internacional (Ramsar, Irán 1971; ratificada por Uruguay en 1984). Esto implica que se reconoce a estos humedales como fundamentales en la conservación global y el uso sostenible de la biodiversidad, con importantes funciones (regulación de la fase continental del ciclo hidrológico, recarga de acuíferos, estabilización del clima local), valores (recursos biológicos, pesquerías, suministro de agua) y atributos (refugio de diversidad biológica, patrimonio cultural, usos tradicionales).

El Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente adquirió una serie de parcelas en el Departamento de Río Negro con una extensión total de cerca de 6.000 hectáreas que incluyen la zona conocida como Esteros de Farrapos y en el año 2008 fue declarado Parque Nacional ingresando al Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) de Uruguay. Dicha área se sitúa al oeste del río Negro, sobre el curso bajo del río Uruguay, al sur de la localidad de San Javier y al norte de la localidad de Nuevo Berlín. Se extiende 27 kilómetros a lo largo del río Uruguay donde desembocan varios arroyos, entre ellos el Farrapos, que da nombre al parque (Figura 1) (1).

El sitio se caracteriza por ser uno de los humedales fluviales más extensos del país, con una importante heterogeneidad de ambientes. Comprende un sistema de islas, bancos arenosos, bañados y albardones dentro de los cuales se distribuyen ambientes de praderas, monte parque, bosques riparios y fluviales, arenales y blanqueales (suelos arenosos muy salinos con una vegetación característica asociada) (2). La zona presenta diferentes pulsos periódicos de inundaciones, debido a que el río Uruguay habitualmente tiende a crecer. Los suelos de Farrapos se caracterizan por un drenaje imperfecto, el agua demora en retirarse en medio de una flora de ingá algarrobos y espinillos, estableciendo la proliferación de suelos inundados, lo que

permite que se filtre el agua y recarguen los acuíferos de la zona (1). Esto permite tener agua aún en períodos de grandes sequías. De no existir una zona de humedales como esta, que actúe de amortiguador, el río poseería en momentos de grandes lluvias, un caudal considerablemente mayor, incrementando la fuerza de su corriente y aumentando la probabilidad de inundaciones muy destructivas. A su vez, la presencia de árboles de gran porte en la ribera del río, impide la erosión de las riberas y el deterioro de los límites del río, permitiendo un amplio desarrollo de la biodiversidad tanto vegetal como animal.

Para su inclusión como sitio SNAP, se han realizado relevamientos de la fauna y flora allí presentes. Se han podido encontrar muchas especies valiosas, en peligro de extinción, como las aves de pastizales; el Dragón (*Xanthopsar flavus*) y el Capuchino de collar (*Sporophila zelichi*). Se ha confirmado también la presencia del Aguará Guazú (*Chrysocyon brachyurus*), el más grande de los cánidos sudamericanos cuyos registros son casi inexistentes. También se encuentran lagartos, tortugas, 104 especies de aves desde el buitre de Cabeza Roja (*Cathartes aura ruficollis*), al Chajá (*Chauna torquata*) y la Pava de Monte (*Penelope obscura obscura*); 15 especies de mamíferos, con abundancia de Carpinchos (*Hydrochoerus hydrochaeris*) y Zorros de Monte (*Cerdocyon thous*), así como un amplio espectro de peces y una alta diversidad de mariposas (1). Su vegetación constituye un ecotono entre el bosque ribereño y la pradera. La componen comunidades hidrófilas, montes de espinillos y algarrobos, y pradera estival de tapiz denso. Entre las formaciones herbáceas uliginosas se distinguen praderas, pajonales y caraguatales. A medida que nos alejamos de la costa, y sobre todo en las depresiones del terreno, donde se acumula agua, se encuentra: Junco de Copo (*Androtrichum trigynum*), *Ischaemum urvilleanum* y Campanilla Rosada (*Calystegia soldanella*). En el bosque ribereño que se desarrolla en el bañado de Farrapos, es posible encontrar Sarandí Blanco (*Phyllanthus sellowianus*), Sarandí Negro (*Sebastiania schottiana*), Vivaró (*Rupretchia sp.*), Curupí (*Sapium sp.*), Mataojo (*Pouteria salicifolia*), Palo Cruz (*Guettarda uruguayensis*), Cumbretum (*Cumbretum fruticosum*), Palo amarillo (*Terminalia australis*), Sauce (*Salix humboldtiana*), Tembetarí (*Fagara sp.*), Ingá (*Inga vera*), Pitanga (*Eugenia uniflora*) y Guayabo Blanco (*Eugenia uruguayensis*) (3, 4). Dentro de la diversidad vegetal del parque, la familia *Leguminosae* está ampliamente representada. Las tres subfamilias que la integran, están presentes dentro del conjunto

de especies encontradas en la zona. Asimismo, la abundancia de géneros nativos es muy representativa de la totalidad presente en territorio nacional: cinco de ocho géneros dentro de la subfamilia *Caesalpinoideae*, nueve de 11 géneros de *Mimosoideae* y 20 de 32 géneros de *Papilionoideae* se encuentran en el área (5).

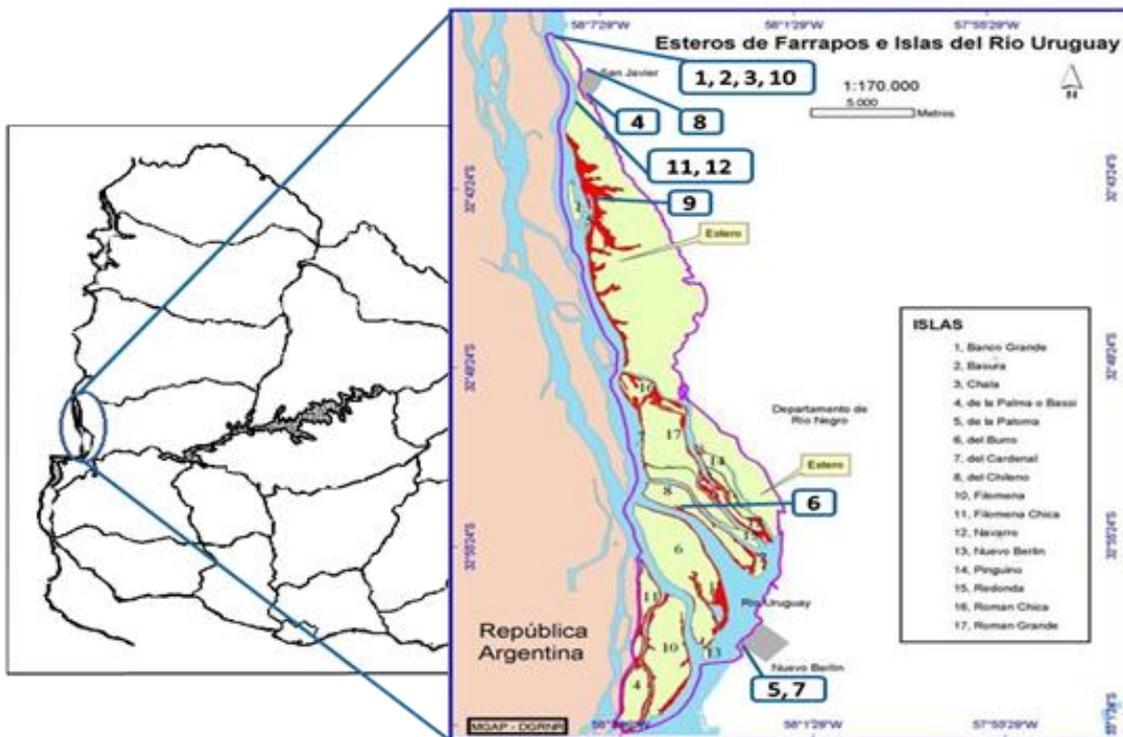


Figura 1. Mapa de la República Oriental del Uruguay, ampliación en la región centro-oeste del país, brindada por la Intendencia de Río Negro, donde se localiza la zona de Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay (EFIRU).

Referencias de zonas de muestreo: 1.Puerto Viejo (arenal, arenal costero, estero, monte parque, monte de ribera), 2.Bondarenko (monte de ribera, estero), 3.Arenal Uliana, 4.Blanqueal San Javier (blanqueal, monte parque), 5.Nuevo Berlín Sur (monte parque, monte de ribera, arenal, arenal costero, blanqueal), 6.Islas (monte de ribera), 7.Nuevo Berlín Norte (monte parque), 8.Vivero del liceo San Javier, 9.Mafalda (monte parque), 10.La Ponderosa (monte parque, borde de camino), 11.Arroyo Isletas (monte parque, monte de ribera), 12.Esteros Ocampo.

2.2 Leguminosas nativas

La familia *Leguminosae* apareció sobre el planeta hace aproximadamente 120 millones de años. Es una familia grande y diversa de plantas con flor dicotiledóneas, con 650 géneros y más de 18000 especies descritas. Son de distribución cosmopolita, encontrándose en regiones templadas, tropicales y subtropicales. Presentan gran variabilidad en su porte o hábito, encontrándose desde acuáticas hasta xerófitas, desde rastreras a trepadoras, desde árboles de gran porte hasta pequeñas hierbas anuales. Su filogenia indica que el primer sitio de evolución fue África, y desde allí se dispersaron hacia Sudamérica y Asia, donde están menos representadas. La abundancia relativa de diversos géneros en África y especialmente en Sudamérica, puede atribuirse al efecto acumulativo de un establecimiento temprano en los ecosistemas de esas regiones (6).

Esta familia está subdividida en tres subfamilias: *Caesalpinoideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. Se ha propuesto que la evolución de estas tres subfamilias puede haberse originado en la *Caesalpinoideae* siendo la más antigua dentro de la familia. Derivan de ella la subfamilia *Mimosoideae*, con la cual se encuentra más estrechamente emparentada probablemente debido a su temprano origen, casi paralelo a ellas o muy poco posterior; y la subfamilia *Papilionoideae* (6).

La subfamilia *Caesalpinoideae* abunda en los trópicos y en las regiones subtropicales. Los centros de origen de sus especies fueron primariamente cálidos y húmedos, pero luego, al suceder un período de elevada sequedad y condiciones de menor temperatura, algunos géneros actuales se adaptaron a sobrevivir en regiones de hábitat xérico y en climas templados. Esta subfamilia, se destaca por el mayor predominio de elementos arbóreos o arbustos, trepadoras leñosas y muy pocos elementos herbáceos (7). Es difícil precisar el número de especies que globalmente constituyen a las *Caesalpinoideae*, debido a que aún existe una serie de estudios inacabados con la finalidad de ajustar el orden de los géneros y delinear un sistema relativamente estable. En Uruguay se han contabilizado diez géneros con 28 entidades taxonómicas (6).

La subfamilia *Mimosoideae* se distribuye principalmente en las regiones tropicales, subtropicales y templado-cálidas del mundo, penetrando en las templadas y excepcionalmente en las frías. Esta subfamilia contiene más de 50 géneros, aunque la mayoría de especies conocidas integran los tres géneros mayores: *Acacia* (1200 especies aproximadamente), *Mimosa* (con más de 400) e *Inga* (con más de 350). En Uruguay estos se encuentran igualmente representados, pero el más abundante es *Mimosa*, con aproximadamente 48 entidades descritas (6).

La subfamilia *Papilionoidea* (*Faboideae*) es la que presenta mayor número de especies. Con una amplia distribución y gran diversidad de formas y tamaños, comprenden más de 12.000 especies en el mundo, que se concentran prioritariamente en las regiones más cálidas. En Uruguay se han descrito 56 géneros, con 201 especies (130 especies nativas y 71 especies adventicias y cultivadas). Los géneros con mayor número de especies en Uruguay son: *Adesmia* DC., *Vicia* L., *Lathyrus* L., *Desmodium* Desv. y *Galactia* P. Br. (8).

2.3 Fijación Biológica de Nitrógeno

Las leguminosas tienen una importancia ecológica y agronómica muy grande, debido a que son responsables de una parte substancial del flujo global de nitrógeno desde N_2 atmosférico a formas fijadas del mismo como ser amonio, nitrato y compuestos orgánicos. Sin embargo no son las plantas por ellas mismas quienes llevan adelante la fijación del nitrógeno atmosférico, sino que son las bacterias asociadas a las raíces de estas plantas, las responsables del proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) (9). Estas bacterias se denominan genéricamente como rizobios.

La habilidad de reducir N_2 no se encuentra en eucariotas, sino que está confinada a bacterias y arqueas. En estos grupos se distribuye ampliamente y ha sido demostrada en cerca de un centenar de géneros pertenecientes a la mayoría de las ramas filogenéticas (10). Los procariontes fijadores de nitrógeno están ampliamente distribuidos en grupos con diferentes estilos de vida y metabolismos que incluyen organismos aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos, metanótrofos; como

células individuales o en filamentos; en vida libre y en simbiosis. Esto sugiere que la habilidad de fijar nitrógeno, surgió varias veces en la historia de la evolución (10, 11).

La FBN en arqueas ocurre dentro del reino Euryarchaeota solamente en las divisiones Methanosarcinales, Methanobacteriales, Halobacteriales y Methanococcales; y en Bacteria solamente en seis de los más de cincuenta phyla bacterianos descritos hasta el momento: bacterias verdes del azufre, cianobacterias, Gram positivas de bajo y alto contenido de G+C, Spirochaetes, Firmicutes y Proteobacteria, siendo esta última la división bacteriana más abundante y a la que se afilian todos los rizobios (12). Mientras que la mayor parte de estos organismos procariontes parecen fijar nitrógeno como organismos de vida libre, muchos lo hacen en asociación simbiótica con eucariotas.

La FBN en asociación simbiótica incluye tres grupos de interacciones: 1. los heterocistos de las cianobacterias que ocupan tejidos de plantas hepáticas, helechos, cícadas y dicotiledóneas; 2. actinomicetos representados por *Frankia*, que forma nódulos con muchas plantas no leguminosas de varias familias que incluyen a los géneros *Alnus* y *Prusis*; 3. los rizobios que forman nódulos en muchas leguminosas, y excepcionalmente con una no leguminosa, *Parasponia*, miembro de la familia *Ulmaceae* (12).

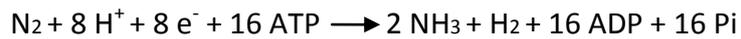
Estimaciones recientes indican que de unos 150 millones de toneladas de nitrógeno que son fijadas anualmente mediante el proceso de FBN, unos 55 millones de toneladas lo son por bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a leguminosas (13). Las tasas de fijación de nitrógeno por hectárea medidas para leguminosas asociadas simbióticamente con rizobios, son mucho mayores que para cualquier otro organismo fijador en vida libre (14).

Si bien es probable que el complejo enzimático responsable de la FBN, complejo de la nitrogenasa, se originara en la atmósfera primitiva reductora, este proceso en simbiosis con las plantas debió de originarse mucho tiempo después de que la atmósfera reductora de la Tierra se transformara en oxigénica (12). Por lo tanto, es probable que los diazótrofos antiguos recorrieran un largo camino evolutivo desde la aparición de las primeras plantas terrestres, hace aproximadamente 400 millones de años, conviviendo en la rizósfera como epífitos o endófitos. Durante este largo período, las líneas diazótroficas de procariontes se diversificaron y lograron establecer relaciones simbióticas con algunos linajes de plantas (12).

La nodulación está presente en todas las subfamilias de leguminosas, pero es menos frecuente en la subfamilia *Caesalpinioidea* (15), y aunque se da en gran variedad de representantes en las subfamilias *Papilionoidea* y *Mimosoidea*, también existen ejemplos de especies que no establecen esta asociación. La presencia y ausencia de especies nodulantes dentro de las tres subfamilias indica que la nodulación surgió varias veces en la filogenia de las leguminosas y se ha perdido en algunos linajes (16). Se cree que la posibilidad de interactuar con rizobios y la capacidad de fijar nitrógeno, contribuyen a la extensa distribución de esta familia (17).

La FBN en rizobios se lleva a cabo en los nódulos, estructuras especializadas desarrolladas principalmente en el córtex radicular y excepcionalmente en el tallo de las leguminosas (18). La formación de nódulos fijadores de nitrógeno es un proceso complejo que involucra un “diálogo molecular” que consiste en el intercambio de señales químicas entre planta y bacteria. Los primeros compuestos que participan en este diálogo son los flavonoides, compuestos secretados por la planta. Estos inducen la expresión de los genes estructurales para la nodulación (genes *nod*) presentes en los rizobios. Los mismos codifican para la síntesis de enzimas involucradas en la formación de factores Nod, que son los responsables de las distintas etapas de ingreso de la bacteria a la planta, del desarrollo del nódulo y su función (19). Para que el nódulo se forme, los rizobios deben ingresar al tejido de la raíz de la leguminosa. El proceso comienza con el enrollado de los pelos radiculares, por donde se dará el ingreso. Para ello hidrolizan localmente la pared celular, lo que permite la invaginación de la membrana formando el tubo de infección. Las bacterias ingresan a la planta a través del tubo de infección, llegando a las células corticales (20). En las células del nódulo, los rizobios sufren cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, diferenciándose en bacteroides, células carentes de flagelo que ya no se dividen más. En las células vegetales del nódulo, los bacteroides se encuentran rodeados por la membrana peribacteroidea y constituyen la forma simbiótica donde se lleva a cabo el proceso de FBN.

La expresión de los genes *nif* es esencial para la FBN. En particular los genes *nifHDK* que codifican para los componentes estructurales de la nitrogenasa. Dicha enzima es la responsable de la reducción del dinitrógeno (N_2), siendo la reacción catalizada por esta enzima, la siguiente:



Cabe resaltar que la nitrogenasa es extremadamente sensible al O₂, por lo que cesa su funcionamiento en presencia del mismo. Como forma de regular la concentración de O₂ dentro del nódulo y evitar la inhibición de esta enzima, se produce una proteína de la familia de las hemoglobinas, llamada leghemoglobina. La misma constituye la proteína más abundante en los nódulos simbióticos, aportándole la coloración rosa característica de los nódulos activos (21). La leghemoglobina está conformada por un grupo hemo y un solo polipéptido (la globina). Dado que el grupo hemo contiene hierro, la proteína es capaz de llevar a cabo reacciones de oxido-reducción (redox), permitiendo así el transporte de oxígeno.

2.4 Taxonomía de rizobios

Los primeros intentos de clasificación del diverso grupo de bacterias conocido como rizobios, se basaron en el rango de huésped debido a la observación de que existía cierta especificidad en su asociación con leguminosas (22). Sin embargo, la idea de que los rizobios podían ser separados en especies claramente definidas en base a sus rangos de huésped y, a la inversa, las leguminosas podían ser agrupadas sobre la base de simbioses mutuamente intercambiables, fue desafiado repetidamente por investigadores que encontraron muchos ejemplos de superposición de rangos de huésped. Actualmente se sabe que la promiscuidad simbiótica está ampliamente distribuida en la naturaleza, y no está asociada a bacterias particulares o a grupos taxonómicos de plantas o al hábito de crecimiento de la leguminosa, como se pensaba antiguamente. Aunque tal vez, sí se puede afirmar que las bacterias y plantas promiscuas, se encuentran mayormente en zonas cálidas o tropicales del mundo (23). La fuente más importante de datos para nuestra actual clasificación de rizobios, así como para el resto de los grupos bacterianos, es la secuencia del gen que codifica para el ARN de la subunidad ribosomal menor (ARNr 16S). Su secuencia nucleotídica presenta una estructura de mosaico en donde existen regiones muy conservadas y otras variables, lo que lo hace un buen marcador para establecer relaciones filogenéticas de amplio rango (24, 25).

Actualmente se considera que la división Proteobacteria es la más amplia y diversa dentro del dominio Bacteria (26, 27). La filogenia de esta división, basada en la comparación de la secuencia del gen del ARNr 16S, agrupa a las proteobacterias en seis linajes designados como subdivisiones y nombrados por las letras del alfabeto griego α , β , δ , ϵ , γ , ζ ; siendo en las dos primeras donde se ubican todos los rizobios (25, 28).

Dentro de la subdivisión α -Proteobacteria, la filogenia basada en el gen del ARNr 16S agrupa a las bacterias pertenecientes al orden Rhizobiales en cuatro agrupamientos: el primero comprende los géneros *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Rhizobium*, el segundo *Bradyrhizobium*, el tercero *Azorhizobium* y el cuarto *Methylobacterium*. En la subdivisión β -Proteobacteria, los dos géneros nodulantes reconocidos actualmente son *Burkholderia* y *Cupriavidus* (29), pero hasta hace unos años esto no era así. El género *Burkholderia* era conocido y estudiado por tener varios representantes patógenos (30); al igual que algunos representantes del género *Cupriavidus*, por ejemplo *C. necator* que era conocido como un predador no-obligado de bacterias y hongos del suelo (31). Es por esto que la descripción en 2001 de una especie del género *Burkholderia* noduladora de leguminosa y su posterior caracterización como simbionte real (29, 32–35) cambió la percepción de la diversidad taxonómica de los rizobios. Al igual que el aislamiento de *Cupriavidus taiwanensis* (antes *Ralstonia* y luego *Wautersia taiwanensis*) (36) y posteriormente, de *C. necator* (37) de nódulos de una *Mimosoideae*.

2.5 Evolución o coevolución Planta-Microorganismo

La pérdida o ganancia de material genético modela la evolución de los genomas microbianos. Parte de la información genética es indispensable para los genomas, pero otra parte puede ser intercambiada, perdida o ganada por transferencia horizontal (38). El genoma básico está restringido a genes que codifican para funciones básicas como la traducción, transcripción, regulación y metabolismo primario. En contraste, la mayoría del material transferido horizontalmente es parte de un paquete genético flexible que contiene genes que son útiles para la adaptación a un determinado ambiente pero que no son indispensables para la sobrevivencia del procarionta (39). En rizobios este concepto puede ser aplicado al conjunto de genes que le permiten

establecer su relación simbiótica con las leguminosas (40). Los genes de simbiosis se encuentran ocupando *loci* cercanos agrupados juntos en plásmidos, islas de simbiosis o dentro de un solo bloque en el cromosoma (12).

A pesar de que aparentemente las bacterias se encuentran en constante selección por parte de la planta, estudios de filogenética molecular sugieren que los linajes de rizobios no coevolucionaron simplemente junto con los diferentes linajes de leguminosas. Esto se explicaría por el hecho de que la interacción leguminosa-rizobio no es una asociación simbiótica obligada (41). Asimismo, la evolución de las plantas puede estar relacionada con restricciones reproductivas, geográficas y ambientales, y puede haber una fuerte presión selectiva por patógenos y otros factores además de rizobios, que la estén determinando (42). De todos modos, para nodular preferentemente con bacterias especialmente benéficas, las plantas deben experimentar constante selección (42). La diversidad de rizobios provee de un pool de bacterias para ser seleccionadas por la planta, y aquellas que cumplen con las propiedades de ajustarse a la variabilidad individual de la planta, sobrevivir a fluctuaciones en las condiciones ambientales y prevalecer a través del tiempo; serán las más adecuadas para el hospedero, tornándose más competitivas en la formación de nódulos (43–46). La consecuencia de esta selección podría ser el enriquecimiento de una bacteria en particular, ya que cuando el nódulo senesce, las bacterias presentes en él se liberan al suelo (47, 48). Si la bacteria contribuye con suficiente nitrógeno a la planta, luego habrá suficientes semillas con buena afinidad a esas bacterias. Con ese proceso selectivo en curso, se podría esperar como resultado un incremento en la especificidad en la interacción leguminosa-rizobio, lo que explicaría también por qué se encuentra localmente a una bacteria específica nodulando a una leguminosa (17).

3. Antecedentes de la investigación

Cuando se habla de biodiversidad y preservación de recursos naturales, solemos asociarlo a macro-organismos (vegetales, animales). Sin embargo, la mayor parte de la biodiversidad del suelo, el agua o el aire está sustentada por los microorganismos que allí se encuentran. Los microorganismos del suelo juegan un papel esencial en la sustentabilidad del ecosistema ya que son responsables de actividades tales como la

descomposición de la materia orgánica, la degradación de xenobióticos, el agregado de partículas, y el ciclado de nutrientes (N, S, P, etc.) (49). Es por ello que resulta de importancia substancial el conocimiento, valoración y conservación, de las bacterias de nuestro suelo.

En el presente trabajo, nos centramos en la prospección y conocimiento de las bacterias asociadas simbióticamente a las leguminosas nativas del área protegida EFIRU, como forma de contribuir a su conservación. Dicho trabajo forma parte de una de las principales líneas de investigación del Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas (BIOGEM) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE); que consiste en el estudio y caracterización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas a leguminosas nativas de nuestro país. Uno de los objetivos de este grupo es contribuir a la preservación de nuestros recursos nativos, mediante la generación de conocimientos de la diversidad microbiana presente en nuestros suelos. Para ello se realizan periódicamente, diversas giras de prospección dentro del territorio nacional.

El presente trabajo se enmarca dentro del proyecto Farrapos (50). Como parte del mismo, se realizaron varias salidas de campo para el reconocimiento y colecta de material biológico, al parque nacional EFIRU. A partir de éstas se identificó un total de 30 géneros y 39 especies de leguminosas, se colectaron nódulos de las raíces de las mismas y se estableció una colección a partir de los microorganismos presentes en ellos. El proyecto Farrapos ha dado origen a una tesis de maestría en Biología, opción Botánica, presentada por María Zabaleta (5); y una tesis de grado en Bioquímica en curso, a cargo de Paula Lagurara.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es contribuir al conocimiento, preservación y uso de un recurso natural de nuestros suelos muy poco conocido, como son las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno asociadas a leguminosas nativas. En base al estudio de su diversidad en un Área Protegida, esperamos aportar a la elaboración

de una estrategia de conservación a largo plazo de los recursos naturales tanto botánicos como microbiológicos.

4.2 Objetivos específicos

1. Reconocer la diversidad de una colección de bacterias aisladas de las raíces de leguminosas nativas en el Parque Nacional EFIRU.
2. Estudiar filogenéticamente los aislamientos nativos.
3. Verificar la capacidad de algunas de estas bacterias de establecer asociaciones simbióticas efectivas.
4. Establecer un listado de las especies de leguminosas presentes en el Parque Nacional EFIRU y sus respectivos simbiosomas, en cada uno de los ambientes estudiados.

5. Materiales y métodos

5.1 Colecta de material biológico

El material biológico para el presente trabajo se colectó en siete salidas de prospección al parque nacional EFIRU con colaboradores del departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) del Ministerio de Educación y Cultura. Las mismas se realizaron en enero, mayo y octubre de 2010, marzo y octubre de 2011, abril y mayo de 2012 y marzo de 2013.

Los centros de trabajo de campo se establecieron en las ciudades de San Javier y Nuevo Berlín, Departamento de Río Negro. Desde allí se realizaron desplazamientos a diferentes ambientes de tierra adentro, costeros y a algunas islas del Río Uruguay.

Se realizó una prospección en diferentes puntos, abarcándose una diversidad de ambientes que incluye blanqueales, arenales, monte parque, monte ribereño y estero (Figura 1). Se registró mediante GPS la localización exacta de cada sitio de muestreo.

En cada lugar se colectó material botánico para su herborización y semillas para la construcción de un banco de germoplasma. Para el aislamiento de simbiontes bacterianos, se tomaron muestras de raíces con nódulos de las leguminosas nativas del área, preferentemente de plantas jóvenes ya que sus raíces superficiales son más fáciles de extraer. Cada muestra se rotuló indicando la especie vegetal, el nombre del colector, fecha y localización. El material se conservó y trasladó en frío al laboratorio.

5.2 Aislamiento de simbiontes y condiciones de crecimiento

Las raíces con nódulos colectadas, se lavaron con agua estéril para limpiar la tierra y se colocaron sobre vidrios limpios para extraer los nódulos, procurando mantenerlos intactos (se prefirió conservar pequeñas secciones de raíz, para no arriesgarse a dañar los nódulos).

La esterilización de la superficie de los nódulos se realizó tratándolos primero con etanol 95% durante 5 minutos, luego con una solución de hipoclorito de sodio 2% durante 5-10 minutos, y por último lavándolos 5 veces con agua estéril. Los controles de esterilización se realizaron frotando un nódulo de cada tanda de esterilización, sin

dañarlo, en la superficie de placas de Petri con medio YEM (Anexo 1) e incubándolos en estufa a 30°C. No más de tres nódulos se maceraron individualmente con una varilla de vidrio estéril. La suspensión obtenida se sembró en placas de Petri conteniendo medio sólido YEM + Glutamato (YEM+G) (Anexo 1), las cuales se incubaron en estufa a 30°C. Los cultivos obtenidos fueron repicados sucesivamente hasta conseguir cultivos puros. Finalmente, dichos cultivos se crecieron en medio YEM líquido y se guardaron en glicerol estéril 25% (v/v) a -80 °C.

5.3 Criterio de nombramiento de los aislamientos de la colección

Los aislamientos de la colección se nombraron con las letras en mayúscula “UY”, haciendo referencia al país; seguido de la primera letra del género y la primera letra del epíteto de la especie vegetal de la cual fueron aislados (también en mayúscula); y el número de referencia de la colecta. Por ejemplo el aislamiento de *Chamaecrista flexuosa*, con número de colecta 35, fue nombrado “UYCF35”. El listado de aislamientos se expone en el Anexo 2.

5.4 Extracción de ADN genómico, método convencional

Para la realización de este punto, los aislamientos obtenidos se crecieron en medio de cultivo líquido rico YEM+G durante aproximadamente 48 horas (en el caso de las cepas de crecimiento rápido) o 96 horas (las cepas de crecimiento lento). Las células contenidas en 1,5 ml de cultivo se separaron por centrifugación a 9.168xg durante diez minutos y se resuspendieron en 740 µl de buffer TE (51). Posteriormente se agregaron 20 µl de lisozima 100 mg/ml y luego de 5 minutos (min) a temperatura ambiente, se agregaron 40 µl de SDS 10% y 8 µl de proteinasa K 10 mg/ml. La suspensión obtenida se incubó una hora a 37 °C y luego se le agregaron 100 µl de NaCl 5M junto con 100 µl de una solución de CTAB/NaCl (hexadecyl trimethylammonium bromide/NaCl) (51). A continuación las muestras se incubaron 10 min a 65 °C, y con la finalidad de descartar el resto de los componentes celulares, se agregaron 500 µl de cloroformo y se centrifugó 10 min a 13.200xg. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se agregó una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 25:24:1. A esta

nueva fase acuosa se le agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol, incubándose 30 min a temperatura ambiente y centrifugándose 15 min a 13.200xg. El ADN precipitado se lavó con etanol 70% y posteriormente se secó por vacío. Finalmente, el *pellet* de ADN se resuspendió en 100 µl de buffer TE conteniendo 100 µg/ml de ARNasa (51). La concentración y pureza de ADN en cada muestra fue determinada espectrofotométricamente empleando un espectrofotómetro nanodrop ND-1000. Para el cálculo de la concentración se asumió que una unidad de absorbancia a 260nm (Abs260), corresponde a 50µg/ml de ADN y la pureza de la muestra se estimó utilizando la relación Abs260/Abs280. Únicamente se utilizaron muestras en las que esta relación fue mayor a 1,7.

5.5 Extracción de ADN genómico, método de lisado celular

Para la realización de este punto, se levantaron en condiciones asépticas varias colonias aisladas, provenientes de una placa de cultivo, y se resuspendieron en 100 µL de agua ultra pura. La suspensión se centrifugó a 15.500xg durante 2 min, descartándose el sobrenadante, y resuspendiéndose el *pellet* en 100 µL de NaOH 50Mm estéril. El mismo se calentó a 100 °C durante 4 min y se dejó 2 min en hielo. A continuación se agregaron 900 µL de agua ultra pura y se volvió a centrifugar a 13.200xg durante 2 min. Se pasaron 200 µL del sobrenadante conteniendo el ADN a un tubo tipo Ependorff nuevo y se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización.

5.6 Técnica de manipulación de alto rendimiento

Para la amplificación de las muestras de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (del Inglés PCR por *Polymerase Chain Reaction*), se utilizó una técnica de manipulación de alto rendimiento. La misma permitió trabajar con una elevada cantidad de muestras simultáneamente. Dicha técnica consistió en realizar diluciones del ADNg de las muestras en una placa multipocillos, para llevarlo a la concentración de trabajo. Las placas multipocillos en las que se realizaron las diluciones de ADN, se conservaron a -20 °C, para posteriores repeticiones o amplificación de otros genes.

La placa multipocillos presenta la facilidad de tener la matriz de pocillos que encaja a medida con la matriz de la pipeta multicanal. Para la reacción de PCR se utilizaron tiras de 8 tubos de PCR de 0,2mL que también se ajustan a la matriz de la pipeta multicanal. El ADN_g se agregó a los tubos con la Pre-mix de PCR (mezcla de PCR que contiene todo lo requerido para la reacción, excepto el ADN) con pipeta multicanal. Luego de realizada la amplificación de los genes de interés, los productos de PCR se cargaron en geles de agarosa conteniendo pocillos que también se ajustan a la matriz de la pipeta multicanal.

5.7 Amplificación por PCR de una región parcial del gen ARNr 16S

A partir del ADN genómico purificado de los 172 aislamientos, se realizó la amplificación por PCR de un fragmento de aproximadamente 1500 pares de bases (pb.) correspondientes al gen ARNr 16S. Para esto se utilizaron los cebadores *27f* y *1492r* (52), cuyas secuencias se indican en la Tabla 1. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl conteniendo 5 µl de *Dream Taq Buffer* 10X (Thermo Scientific #B65) que incluía MgCl₂ 20mM; 2µl de deoxi-nucleótidos trifosfato (dNTPs) 10mM, 2 µl de cada cebador 10µM y 0,4 µl de ADN polimerasa (5U/ µl, *Dream Taq Polymerase*, Thermo Scientific #). Como molde se utilizaron 5,0 µl de ADN genómico a las concentraciones indicadas en el apartado Resultados.

Para la reacción de amplificación se utilizó el siguiente programa: un paso de desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido de diez ciclos de 1 min a 95 °C (desnaturalización del ADN), 1 min a 60 °C (hibridación de los cebadores al molde de ADN) y 1 min a 72 °C (etapa de polimerización del ADN); luego 25 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 59 °C y 1,5 min a 72 °C; y por último se realizó un paso de extensión final de 5 min a 72 °C.

Para las muestras que no amplificaron, se repitió el procedimiento en iguales condiciones, pero utilizando 5 µL de ADN a partir de un lisado celular.

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la amplificación de los genes que codifican para los genes ARNr 16S y *nifH*, respectivamente, y sus temperaturas de fusión.

Gen amplificado	Cebador	Secuencia de ácidos Nucleicos	Temp. de fusión
ARNr 16S	<i>27f</i>	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	Tm 53°C
	<i>1492r</i>	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	Tm 55°C
<i>nifH</i>	<i>PolF</i>	5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3'	Tm 55 °C
	<i>PolR</i>	5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3'	Tm 56 °C

5.8 Amplificación por PCR del gen *nifH*

Para continuar con la caracterización de la colección, se amplificó por PCR un fragmento conservado de 327 pb del gen *nifH*, el cual codifica para la subunidad estructural de la enzima nitrógeno reductasa, responsable de la FBN. Para ello se utilizaron los cebadores *PolF* y *PolR* (53) (Tabla 1).

La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl conteniendo 5 µl de *Dream Taq Buffer* 10X que incluía MgCl₂ en una concentración de 20 mM, 2,0 µl de una mezcla de deoxi-nucleótidos trifosfato (dNTPs) 5 mM, 2,0 µl de cada cebador 10 µM, 0,2 µl de *Dream Taq Polimerasa* (5 U/ml). Como molde para la reacción se utilizó directamente una colonia de la cepa bacteriana a analizar, crecida en medio YEM+G.

Para la reacción de amplificación se utilizó el siguiente programa: un paso de desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos (s) a 95 °C (desnaturalización del ADN), 30 s a 58 °C (hibridización de los cebadores al molde de ADN) y 30 s a 72 °C (etapa de polimerización del ADN); luego se realizó un paso de extensión final de 7 min a 72 °C.

5.9 Visualización y secuenciación de los productos de PCR

Los productos de amplificación se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa 0,8 % (p/v) en buffer Tris-Acético-EDTA (TAE 1 X) (Anexo 1) sometido a 90 V. Se utilizó el intercalante molecular *Good View* (Beijing SBS. Genetech. Co. Ltd.) en un volumen de 1 µl por 50 ml de gel, para la posterior visualización de los fragmentos amplificados. Se incluyó el marcador de peso molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA*

Ladder (Fermentas #SM1332). El tamaño y concentración de los productos se determinó mediante comparación con un marcador de peso molecular de concentración conocida.

En los casos que se observaron productos de amplificación del tamaño esperado y con concentraciones mayores a 50 ng/ul, los productos se enviaron para su secuenciación a Macrogen, Corea.

La identificación de las muestras se realizó comparando las secuencias obtenidas mediante *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (54), de la base de datos del *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Se consideró un rango de 99-100% de similitud con las secuencias de la base de datos.

5.10 Análisis filogenético en base al gen ARNr 16S

Las secuencias obtenidas del gen del ARNr 16S en ambos sentidos (5'- 3' y 3'- 5') se editaron mediante el programa *DNA Baser Sequence Assembler v3.x* (2012) (Heracle BioSoft SRL Romania, <http://www.DnaBaser.com>). Las cepas para las que fue posible solapar sus secuencias en ambos sentidos, se utilizaron en la construcción de árboles filogenéticos. Para ello se procedió a alinear las secuencias mediante el programa SINA (55) incluyendo en el análisis, secuencias del gen del ARNr 16S de cepas de referencia (cepas tipo) con las cuales nuestras muestras presentaron un porcentaje de homología superior al 97%. También se utilizaron secuencias de otras cepas tipo que no presentaban tanta similitud pero resultaran informativas para el análisis filogenético. Todas las secuencias de referencia se tomaron de la base de datos del NCBI y el número de acceso a dichas secuencias se incluye entre paréntesis en los árboles presentados.

La construcción filogenética se realizó con el programa Mega 6.06, utilizando los métodos *Neighbour joining* (56) y *Maximum Likelihood* (57). Para éste último, el apoyo estadístico a los nodos se evaluó mediante la técnica de bootstrap de 100 réplicas (58). El modelo de evolución se estimó en el Mega 6.06. Fue elegido el modelo de sustitución *Tamura 3 parámetros + distribución Gamma*, considerando 5 categorías discretas de Gamma y sitios invariantes (TN91+G+I).

5.11 Esterilización superficial y germinación de semillas

Se probaron tres metodologías, para poner a punto la esterilización superficial de las semillas traídas de EFIRU.

Método 1: consistió en sumergir las semillas en una solución de cloruro de mercurio (HgCl_2) 9.2 mM y HCl 0,1N durante 3 min, enjuagar seis veces con agua estéril, para luego pincharlas en su superficie (intentando penetrar un poco la semilla, sin llegar a atravesarla) y dejarlas 1 hora hinchando en agua. En este caso se realizaron variaciones en el tiempo de hinchado (1, 12 o 24 horas).

Método 2: en este caso se probó sumergir las semillas en ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (10M) durante 5 min, enjuagar siete veces con agua estéril y dejarlas hinchando en el agua del último lavado, en a 30 °C durante 5 horas. En este caso se varió el tiempo de exposición al H_2SO_4 (10, 15 y 20 minutos).

Método 3: en el mismo se remojaron las semillas en etanol (EtOH) 95% durante 2 min y se dejaron secar en papel de filtro. Posteriormente se sumergieron en H_2SO_4 concentrado (10M), ensayándose diferentes tiempos de incubación (10 o 20 min). Las mismas se lavaron siete veces con agua estéril y se las trató con una solución de HgCl_2 9.2 mM y HCl 0,1N durante 3 minutos. Finalmente se las lavó seis veces con agua estéril y se las dejó hinchando en el agua del último lavado, cubiertas con papel film en estufa a 30 °C. Se ensayaron diferentes tiempos de hinchado en agua (1, 12 o 24 horas).

Luego de esterilizadas superficialmente por cualquiera de los tres métodos mencionados, las semillas se germinaron en placas de Petri con Agar-agua (0,8% p/v) a temperatura ambiente ó a 30 °C.

5.12 Ensayos en planta utilizando condiciones gnotobióticas

Las semillas germinadas se sembraron de a dos, en tubos de vidrio de 20 cm de altura y 3 cm de diámetro, conteniendo 15mL de medio Jensen semi-sólido sin nitrógeno (59) y crecidas en cuarto de plantas a 26 °C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

Una vez emergidos los cotiledones, los plantines se inocularon con una suspensión de las bacterias a ser ensayadas. Los inóculos se realizaron a partir de cultivos bacterianos en medio YEM líquido, a los cuales se les midió la absorbancia a 620nm, para conocer la concentración de células que contenían. Se asumió que un cultivo con absorbancia a 620nm igual a 1, equivale a un cultivo conteniendo 1×10^9 células/ml. Los cultivos se diluyeron en agua estéril de modo de contar con 10^7 - 10^8 células/ml y se colocó 1 ml de inóculo por tubo de planta. Las plantas se observaron cada 4 días para detectar la aparición de nódulos en sus raíces. Las mismas se regaron sólo en 2 ocasiones, en el día 20 y en el día 40, con agua estéril.

Una vez terminados los ensayos, las plantas y los nódulos se fotografiaron.

5.13 Efectividad de la nodulación

Para determinar la efectividad de la nodulación por parte de las bacterias, se tomó como criterio la presencia o ausencia de nódulos, así como su tamaño y coloración. Los nódulos de tamaño mayor a 1 mm, de coloración rosa u oscura, fueron considerados nódulos efectivos (T.1). Mientras que los de tamaño menor a 1mm y de coloración blanca ó amarillenta, fueron considerados nódulos inefectivos (T.2). Por último, los nódulos de tamaño mayor a 1mm con coloración verde, se consideraron nódulos fotosintéticos (T.3).

6. Resultados

6.1 Construcción de una colección de simbioses bacterianos asociados a leguminosas nativas

Para la realización de este trabajo se realizó una salida de prospección al Parque Nacional EFIRU, en el mes de marzo de 2013. Junto a las colectas realizadas por el grupo de investigación en seis salidas previas a EFIRU, fue posible contar con nódulos de 28 especies distintas de leguminosas, generándose una colección de microsimbioses compuesta por 172 aislamientos. En la Tabla 2 se listan las especies de leguminosas de las cuales se recuperaron bacterias de sus nódulos, el ambiente y el sitio del cuál se colectaron.

También se conservaron muestras de las leguminosas encontradas, para su herborización; y se colectaron semillas de las mismas, para poder realizar los ensayos de plantas posteriores.

Tabla 2. Listado de las leguminosas estudiadas y ambiente en donde se encontraron (con su respectiva referencia en el mapa de la Figura 1).

Se indican los géneros bacterianos inferidos a partir de la secuencia del gen del ARNr 16S de los microorganismos presentes en sus nódulos, y si los mismos portan el gen estructural de la enzima nitrogenasa (*nifH*) (se indica como “+” en los casos que lo portan y como “nd” en los casos donde no fue detectado). Para los casos en los que se encontró a más de un género bacteriano en los nódulos provenientes de la misma especie vegetal, se aclara cuál de ellos es el que porta el gen *nifH*.

Subfamilia	Especie vegetal	Referencia en Fig. 1	Ambiente	Género bacteriano según 16S ARNr (número de aislamientos)	Presencia de gen <i>nifH</i>
<i>Caesalpinoideae</i>	<i>Chamaecrista flexuosa</i>	1	Arenal	<i>Burkholderia</i> (1)	+
<i>Mimosoideae</i>	<i>Senegalia bonariensis</i>	8	vivero con tierra del lugar	<i>Mesorhizobium</i> (1)	+
	<i>Calliandra parvifolia</i>	1, 5	Monte de ribera	<i>Rhizobium</i> (3), <i>Burkholderia</i>	nd

				(3)	
	<i>Inga vera</i>	1, 2 y 6	Monte de ribera	<i>Bradyrhizobium</i> (9), <i>Bacillus</i> (1)	<i>Bradyrhizobium</i> +
	<i>Mimosa adpresa</i>	5	Arenal costero	<i>Cupriavidus</i> (3),	+
	<i>Mimosa pilulifera</i>	1, 5	Arenal costero	<i>Burkholderia</i> (3), <i>Bradyrhizobium</i> (2), <i>Bacillus</i> (1)	<i>Burkholderia</i> +
	<i>Mimosa urugüensis</i>	1, 8	Arenal costero	<i>Cupriavidus</i> (14)	+
	<i>Neptunia pubescens</i>	4	Blanqueal	<i>Paenibacillus</i> (1)	nd
	<i>Vachellia caven</i>	1, 3, 4, 5 y 7	Blanqueal, monte de parque, arenal	<i>Mesorhizobium</i> (6), <i>Enterobacter</i> (1), <i>Paenibacillus</i> (1)	<i>Mesorhizobium</i> +
Papilionoideae	<i>Aeschynomene denticulata</i>	5	Monte parque	<i>Bradyrhizobium</i> (1), <i>Acinetobacter</i> (1)	nd
	<i>Aeschynomene montevidensis</i>	1	Monte de ribera, estero	<i>Bradyrhizobium</i> (4)	+
	<i>Arachis villosa</i>	1, 5	Arenal	<i>Bradyrhizobium</i> (5), <i>Moraxella</i> (1), <i>Cupriavidus</i> (1), <i>Leifsonia</i> (1), <i>Paenibacillus</i> (1)	<i>Bradyrhizobium</i> +

<i>Collaea stenophylla</i>	5	Monte de ribera	<i>Bradyrhizobium</i> (4)	+
<i>Erythrina crista-galli</i>	5	Blanqueal	<i>Mesorhizobium</i> (1)	+
<i>Galactia striata</i>	1	Monte de ribera	<i>Bradyrhizobium</i> (1)	nd
<i>Geoffroea decorticans</i>	5	Blanqueal	<i>Mesorhizobium</i> (1)	+
<i>Indigofera suffruticosa</i>	1	Arenal	<i>Bradyrhizobium</i> (4), <i>Paenibacillus</i> (1)	<i>Bradyrhizobium</i> +
<i>Latyrus sp</i>	9	Monte de parque	<i>Rhizobium</i> (1)	+
<i>Lotus corniculatus</i>	11	Monte parque	<i>Mesorhizobium</i> (1)	+
<i>Lotus sp.</i>	5	Monte parque	<i>Mesorhizobium</i> (3)	+
<i>Ornithopus micranthus</i>	1	Monte parque	<i>Bradyrhizobium</i> (2), <i>Rhizobium</i> (2)	<i>Bradyrhizobium</i> , <i>Rhizobium</i> +
<i>Sesbania punicea</i>	1, 4, 11	Estero, Monte de ribera	<i>Azorhizobium</i> (5)	+
<i>Sesbania sp</i>	1, 11, 12	Estero, Monte parque	<i>Azorhizobium</i> (9), <i>Bradyrhizobium</i> (1)	<i>Azorhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> +
<i>Stylosanthes leiocarpa</i>	5	Monte parque	<i>Bradyrhizobium</i> (1)	nd
<i>Tephrosia cinerea</i>	1	Arenal	<i>Bradyrhizobium</i> (3)	+
<i>Trifolium sp</i>	4, 11	Monte parque	<i>Rhizobium</i> (10), <i>Mesorhizobium</i>	<i>Rhizobium</i> , <i>Mesorhizobium</i> ,

				(1), <i>Azorhizobium</i> (1)	<i>Azorhizobium</i> +
	<i>Vicia platensis</i>	11	Monte parque	<i>Rhizobium</i> (3)	+
	<i>Vigna luteola</i>	5	Arenal costero	<i>Bradhyrizobium</i> (1)	+

6.2 Puesta a punto de una metodología de alto rendimiento, para la amplificación del gen del ARNr 16S

Con el propósito de amplificar por PCR el gen del ARNr 16S, se puso a punto una metodología de alto rendimiento que nos permitiera amplificar la mayor cantidad de muestras simultáneamente. Para esto se partió de muestras de ADN genómico purificado (ADNg), el cual se cuantificó y normalizó, llevando todas las muestras a una misma concentración de trabajo (200ng/ μ l).

Para poner a punto la metodología, se seleccionaron 3 muestras. De forma exploratoria se hicieron diluciones de las mismas, utilizando 0,02; 0,20; 2,0 y 20,0 ng/ μ l de ADN en la reacción de PCR. Se seleccionó la menor concentración de ADNg en la cual se obtuvieron productos de amplificación en todas las muestras. De esta forma seleccionamos una concentración de trabajo de 2,0 ng/ μ l de ADNg para la reacción de PCR (Figura 2).

Mediante la utilización de la metodología de alto rendimiento, se logró trabajar con 96 muestras simultáneamente, con el consiguiente ahorro de tiempo de manipulación (Figura 3).

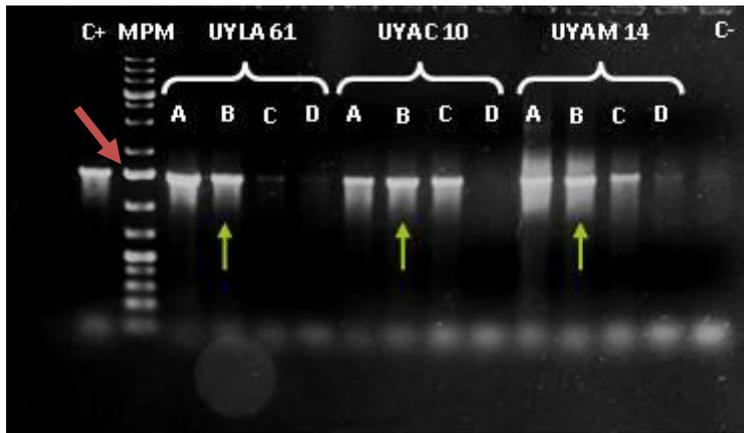


Figura 2. Gel de Agarosa (0,8 % p/v) de los productos de PCR de las muestras UYLA 61, UYAC 10, UYAM 14, con distintas concentraciones de ADNg. Se incluyó el producto de PCR de una muestra que se conoce que amplifica mediante la PCR realizada (C+). Se utilizó el marcador de peso molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (MPM), la flecha roja indica la banda que corresponde a 1500 pb. Pocillos **A**: 20,0 ng/mL, pocillos **B**: 2,0 ng/mL, pocillos **C**: 0,20 ng/mL, pocillos **D**: 0,02 ng/mL. Las flechas en verde señalan las bandas obtenidas a partir de los productos de PCR de las reacciones en las que se utilizó 2,0 ng/mL de ADNg.

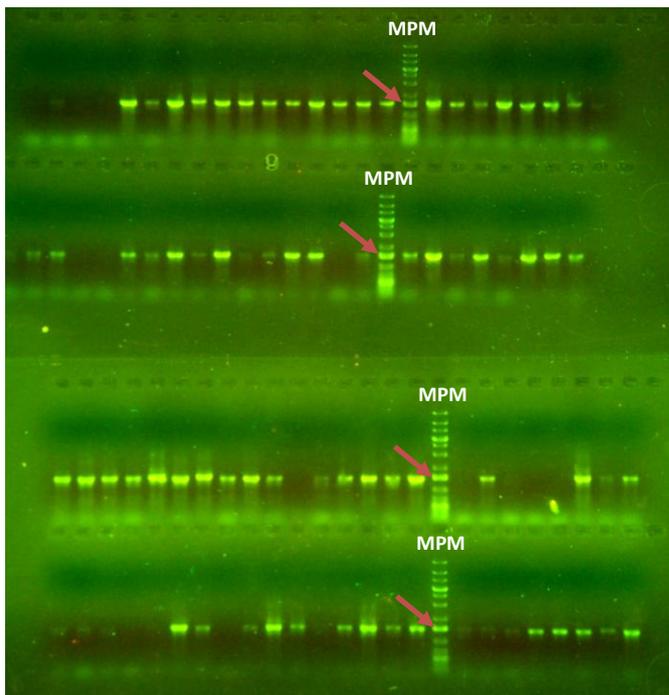


Figura 3. Ejemplo de gel de Agarosa (0,8% p/v), con los productos de PCR de una reacción realizada con la técnica de alto rendimiento.

Se utilizó el marcador de peso molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (MPM), la flecha roja indica las bandas que corresponden a 1500 pb.

6.3 Identificación y análisis biogeográfico de los aislamientos

La identificación de los aislamientos que componen la colección de simbioses bacterianos asociados a leguminosas nativas se realizó mediante la secuenciación del producto de PCR obtenido mediante amplificación del ARNr 16S.

Sobre un total de 172 aislamientos que componen la colección, se logró la amplificación y secuenciación de 123 aislamientos. Los mismos se identificaron a nivel de género mediante su comparación con la base de datos del NCBI, utilizando el algoritmo BLAST. En la Tabla 2 se listan los aislamientos identificados, junto al hospedero, ambiente y sitio de donde fueron obtenidos. En dicha tabla se observa la gran variedad genética de microsimbioses en el área, encontrándose tanto Alfa como Beta rizobios y cepas relacionadas a los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Leifsonia* y *Moraxella*.

Como se puede observar en la Tabla 2, tres de las muestras vegetales se encontraron en distintos ambientes del parque, siempre noduladas por el mismo género bacteriano. *Vachellia caven* en el Arenal, Blanqueal y Monte Parque estaba nodulada por *Mesorhizobium spp.*; *Aeschynomene montevidensis* en Monte Ribera y Estero estaba nodulada por *Bradyrhizobium spp.*; y *Sesbania punicea* en Monte Ribera y Estero estaba nodulada por *Azorhizobium spp.*

Teniendo en cuenta el género bacteriano asignado a los aislamientos, se estudió la correlación de los mismos con su ocurrencia en los nódulos de las leguminosas, en los diferentes ambientes del parque. En la Figura 4 se grafica en cuántas especies de leguminosas ocurre un determinado género bacteriano, en cada uno de los ambientes. Dicha figura expone la predominancia de un género bacteriano en particular, en cada ambiente. En el Arenal, seis plantas de un total de nueve especies muestreadas, estaban noduladas por *Bradyrhizobium sp.*; en Monte Ribera, cuatro de seis especies vegetales estaban noduladas por *Bradyrhizobium sp.*; en el Blanqueal tres de cuatro plantas, por *Mesorhizobium sp.*; en el Estero dos de tres especies estaban noduladas por *Azorhizobium sp.*; y en Monte Parque, cuatro de nueve plantas por *Mesorhizobium sp.*

El género *Bradyrhizobium* fue el presente en más especies vegetales en el área (12 especies), hallándose en todos los ambientes excepto en el Blanqueal; seguido por el

género *Mesorhizobium*, presente en seis especies vegetales y ausente en dos ambientes, Monte Ribera y Estero.

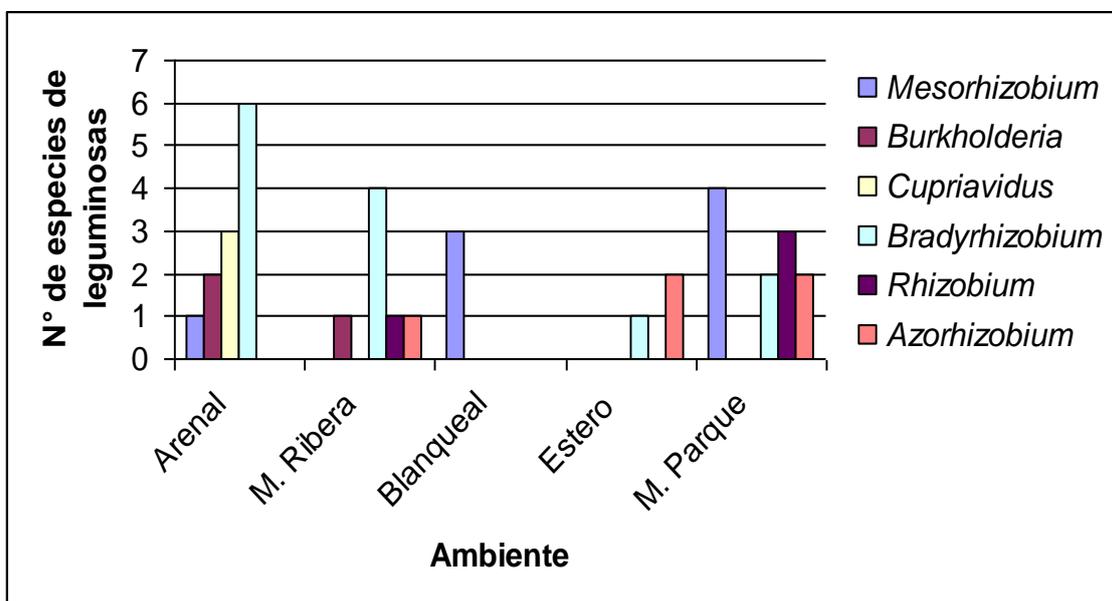


Figura 4. Gráfico del número de especies de leguminosas diferentes en las que ocurren los géneros bacterianos, para cada uno de los distintos ambientes muestreados en el Parque Nacional EFIRU, Uruguay.

6.4 Presencia del gen *nifH* en bacterias aisladas de nódulos

Se verificó la presencia del gen *nifH* en 59 aislamientos de la colección (Tabla 2), de las que se obtuvieron 35 secuencias (Tabla 3).

Las 35 secuencias obtenidas se compararon mediante el algoritmo BLAST en las bases de datos. Todas las secuencias correspondieron a un fragmento del gen *nifH* de rizobios. Asimismo se observó una buena correlación entre el género bacteriano identificado por secuenciación del gen ARNr 16S y el género identificado mediante la secuencia parcial de *nifH* (Tabla 3)

Tabla 3. Géneros bacterianos resultantes a partir de la secuenciación de los genes 16S ADNr y nifH, de los aislamientos para los cuales fue posible obtener secuencias de ambos genes.

En verde se resaltan los aislamientos en los que no hubo concordancia en el género, según las secuencias de ambos genes.

Código	Género según gen del ARNr 16S	Género según gen nifH
UYAC 04	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>
UYAM 16	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>
UYAM 17	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
UYAV 22	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
UYAV 26	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>
UYCF 36	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
UYCS 37	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>
UYEC 41	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>
UYGD 43	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>
UYIS 45	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
UYIV 54	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>
UYIV 59	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
UYLA 61	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>
UYLO 63	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>
UYLO65	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>
UYMP 73	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i>
UYMU 84	<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus</i>
UYOM 90	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
UYSP 95	<i>Azorhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>
UYSP 96	<i>Azorhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>
UYSE 100	<i>Azorhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>
UYSE 102	<i>Azorhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>
UYSE 104	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>
UYSE 110	<i>Azorhizobium</i>	<i>Azorhizobium</i>
UYTC 116	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>
UYTR 118	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>

UYTR 122	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>
UYTR 123	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>
UYTR 124	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Mesorhizobium</i>
UYTR 126	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>
UYTR 127	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>
UYTR 130	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>
UYVP 133	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>
UYVP 135	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium</i>
UYVL 137	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>

6.5 Análisis filogenético

Se construyeron árboles filogenéticos para las Alfa (Figura 5) y para las Beta Proteobacterias (Figura 6) identificadas en este trabajo, en base al alineamiento de las secuencias correspondientes al gen ARNr 16S de los microorganismos de la colección y a las secuencias de este gen para las cepas de referencia (ó cepas tipo) seleccionadas (ver apartado Materiales y métodos). Mediante los dos métodos de construcción filogenética utilizados, se observó la misma topología de árbol. Se optó por trabajar con el que fue construido por el método *Maximum Likelihood* ya que presentaba valores más altos de bootstrap en sus nodos.

Dado que el objetivo de este trabajo era identificar los aislamientos y posicionarlos dentro de un grupo, no se incorporó en el análisis ningún grupo externo.

En el árbol de α -Proteobacterias (Figura 5) se observa cómo se separan dos ramas principales. A partir de una de ellas, surgen a su vez, dos ramas que agrupan separadamente las cepas pertenecientes a los géneros *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. A partir de la otra rama principal aparece una politomía, de la cual dos de sus ramas agrupan por separado a las cepas de los géneros *Mesorhizobium* y *Rhizobium*; la rama restante corresponde a la cepa de referencia de la especie *Rhizobium fredii*.

El agrupamiento perteneciente a los *Bradyrhizobium* presenta una politomía a nivel de la base, dividiendo al género en dos grupos (A y B) con un soporte estadístico (bootstrap) de 100%, quedando por fuera de ellos uno de los aislamientos en estudio, proveniente de nódulos de *Collaee stenophyla* (UYCS40).

El grupo A resuelve dos conjuntos que se apoyan también en un bootstrap de 100%. Uno de ellos incluye los aislamientos provenientes de nódulos en *Arachis villosa* (UYAV20, UYAV21, UYAV24, UYAV25 y UYAV26), agrupados junto a las cepas de referencia de *Bradyrhizobium diazoefficiens* y *B. betae*; a tres aislamientos de *Inga vera* (UYIV52, UYIV54 y UYIV55) y a uno de *A. villosa* (UYAV23), agrupados junto a la cepa de referencia de *B. japonicum*; al aislamiento de *Ornithopus micranthus* (UYOM90), a uno de los aislamiento de *I. vera* (UYIV51) y a la cepa tipo de *B. iriomotense*. El otro conjunto está constituido por el aislamiento proveniente de nódulos de *Aeschynomene denticulata* (UYAD13) y por la cepa de referencia de *B. denitrificans*. Por otro lado, en el grupo B los aislamientos provenientes de *Tephrosia cinerea* (UYTC116 y UYTC117), *Vigna luteola* (UYVL137) e *Indigofera suffruticosa* (UYIS48), quedaron agrupados junto con las cepas de referencia de *B. jicamae*, *B. elkanii* y *B. lablabi*.

En el agrupamiento de los *Azorhizobium* se puede apreciar como los aislamientos provenientes de nódulos de plantas del género *Sesbania* (UYSP97, UYSP98, UYSE99, UYSE104, UYSE108, UYSE109 y UYSE110) se agrupan formando una politomía junto a la cepa tipo de *Azorhizobium doebereineriae*, con el respaldo de un bootstrap de 100%. Sin embargo, dos de estos aislamientos (UYSP98 y UYSE108) se ubicaron separados del resto integrando un grupo aparte con un bootstrap de 100%.

El agrupamiento de los *Mesorhizobium* presenta una gran politomía basal, en la cual los aislamientos provenientes de *Lotus corniculatus* (UYLO63, UYLO64 y UYLO65) quedan agrupadas junto a las cepas tipo de *Mesorhizobium amorphae* y *M. septentrionale*; mientras que los provenientes de *Vauchelia caven* (antes nombrada como *Acacia caven*) (UYAC09 y UYAC11) quedan agrupados con la cepa de referencia de *M. plurifarum*.

Por último, en el agrupamiento de los *Rhizobium*, los aislamientos provenientes de nódulos de las raíces del género *Trifolium* (UYTR122 y UYTR130), los del género *Latyrus* (UYLA61) y el proveniente de nódulos en *Vicia platensis* (UYVP135); también quedaron integrados en una gran politomía, junto a las cepas tipo de *Rhizobium leguminosarum*,

R. phaseoli y a la agrupación que incluye las cepas tipo de *R. rhizogenes*, *R. mayense*, *R. jaguaris*, *R. tropici* y *R. calliandrae*.

El árbol con las β -Proteobacterias (Figura 6) separa dos grandes agrupamientos que reflejan a los dos géneros de β -rizobios.

El agrupamiento de las cepas del género *Cupriavidus*, define un conjunto con todos los aislamientos provenientes de nódulos de *M. uruguensis* y *M. adpresa* (UYMU75, UYMU76, UYMU77, UYMU78, UYMU80, UYMU82, UYMU83, UYMU86 y UYMU88; y UYMA66 respectivamente), excluyendo a todas las cepas de referencia incluidas en el árbol. Cabe aclarar que esta división se respalda en un bajo, pero significativo, valor de bootstrap. El aislamiento proveniente de *M. adpresa* (UYMA66) presenta una importante distancia filogenética con respecto a las otras cepas. De este modo los simbiontes de ambas mimosas se posicionan como grupos diferentes.

Por otro lado, el aislamiento proveniente de nódulos encontrados en *Arachis villosa* (UYAV18), se agrupa junto a la cepa de referencia de *Cupriavidus necator*, y a los *C. necator* aislados de mimosas en Brasil (HQ684033 y HQ684034). Cabe destacar que el largo de rama que separa al aislamiento UYAV18 de HQ684033 y HQ684034, es similar al que los separa de la cepa tipo de *C. necator*. Dichos datos están soportados por elevados valores de bootstrap.

En lo que respecta al género *Burkholderia*, el árbol logrado agrupa a los aislamientos de *M. pilulifera* (UYMP72 y UYMP74) y el de *Chamaecrysta flexuosa* (UYCF35), junto con la cepa de referencia de *Burkholderia terrae*, con un valor de bootstrap de 90%. Asimismo, posiciona al aislamiento de *Calliandra parvifolia* (UYCP33) junto a la cepa tipo de *Burkholderia tuberum*, con un bootstrap de 83%.

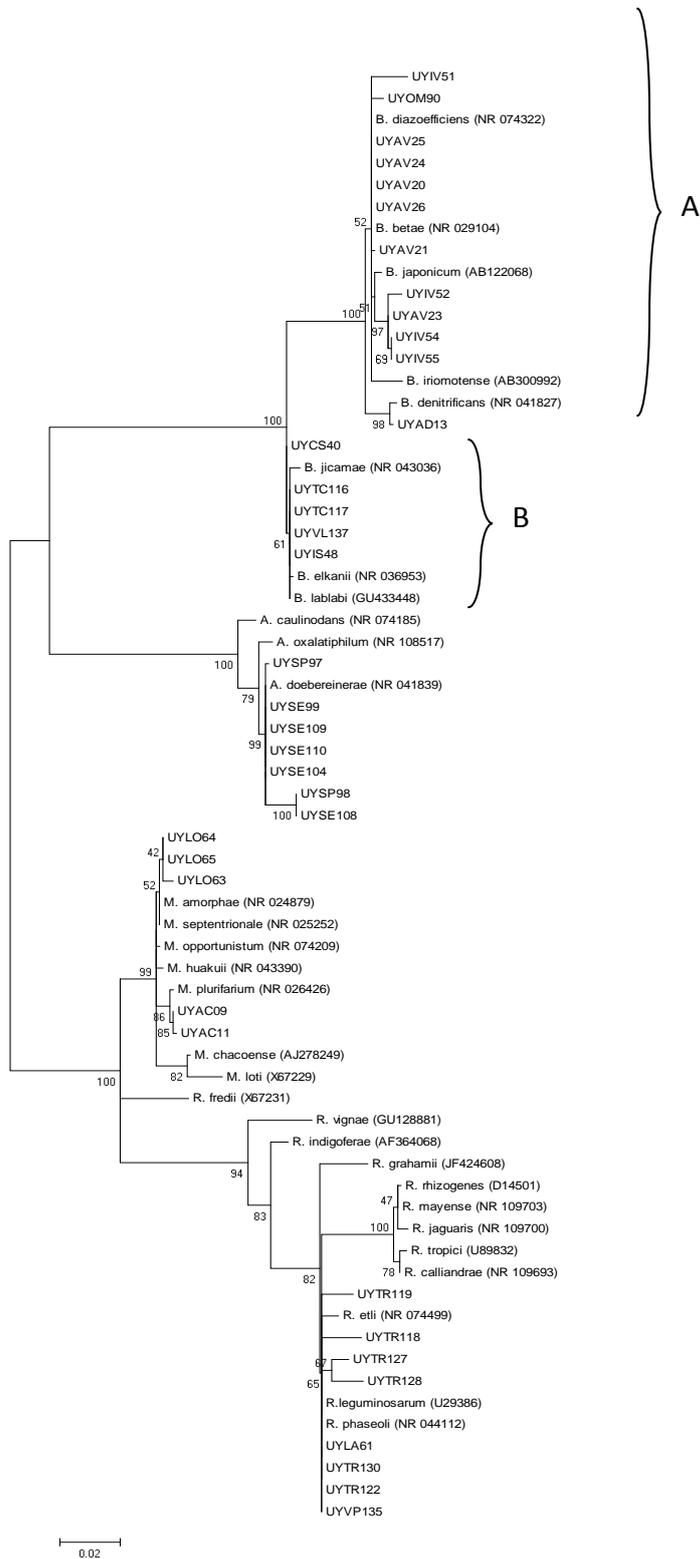


Figura 5. Árbol filogenético de α -Proteobacterias, construido a partir de las secuencias del gen del ARNr 16S.

Se utilizó el método Maximum Likelihood, modelo de sustitución T62+G+I, utilizando secuencias tipo disponibles en la base de datos del NCBI (número de acceso entre paréntesis). Se indican con las letras "A" y "B" los dos grupos que se originan dentro del agrupamiento de los *Bradyrhizobium*.

Los géneros bacterianos de las cepas de referencia se abrevian utilizando la primera letra, léanse: B. como *Bradyrhizobium*, A. como *Azorhizobium*, M. como *Mesorhizobium* y R. como *Rhizobium*.

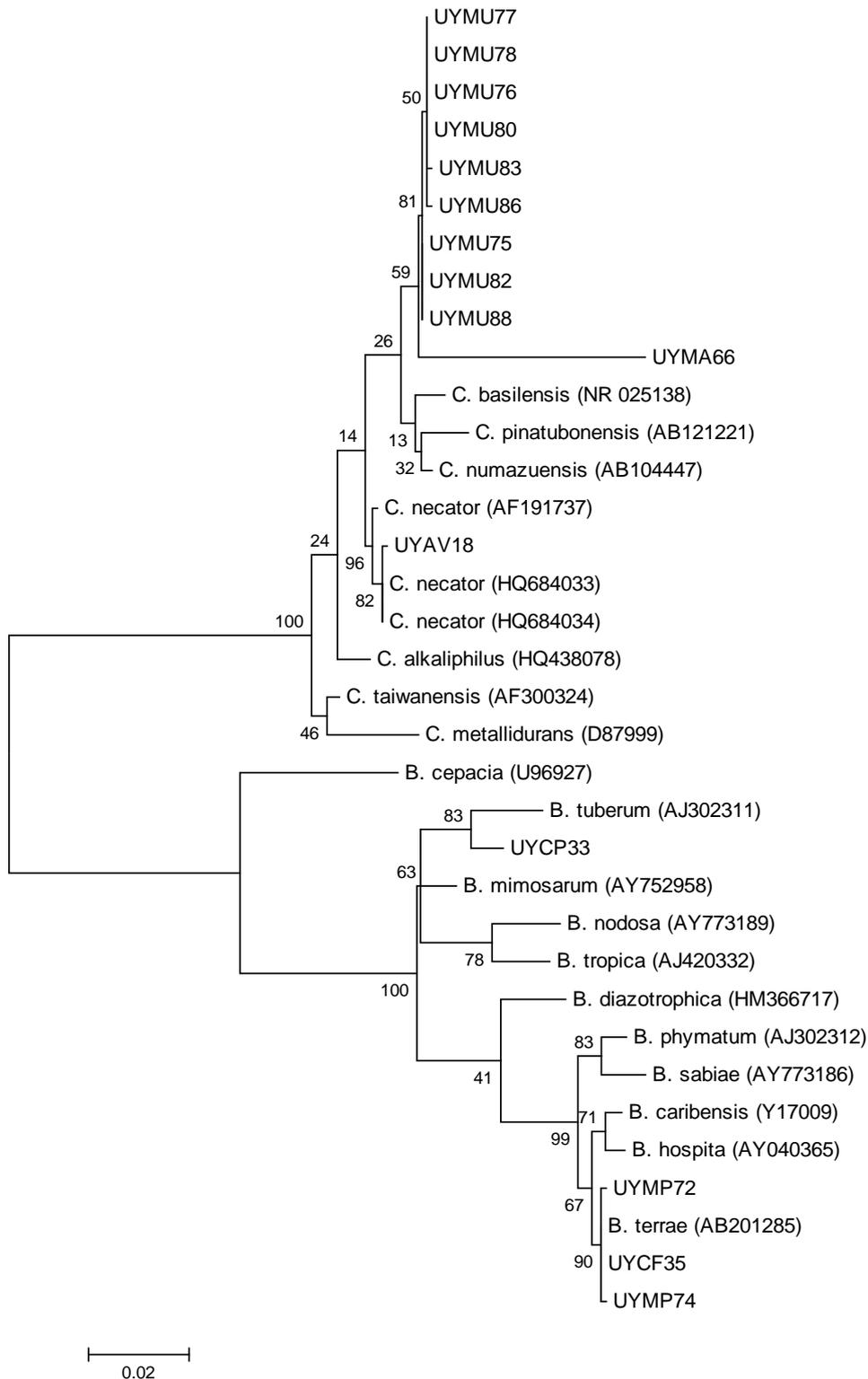


Figura 6. Árbol filogenético de β -Proteobacterias, construido a partir de las secuencias del gen del ARNr 16S.

Se utilizó el método Maximum Likelihood, modelo de substitución T62+G+I, utilizando secuencias tipo disponibles en la base de datos del NCBI (número de acceso entre paréntesis).

Los géneros bacterianos de las cepas de referencia se abrevian utilizando la primera letra, léanse: C. como *Cupriavidus* y B. como *Burkholderia*.

6.6 Esterilización superficial y germinación de semillas de leguminosas nativas

En base a las tres metodologías de esterilización superficial de semillas y sus variantes, se optó por la que proporcionó los mejores resultados en cuanto a la relación esterilización superficial-porcentaje de germinación (datos no mostrados).

Mediante el empleo de la metodología 1, se logró esterilizar superficialmente las semillas, pero no fue posible pincharlas a todas. Como esto último era lo que permitía que se acelerase la germinación, se obtuvieron muy bajos valores de germinación para este tratamiento.

El empleo de la metodología 2 permitió vencer la dormancia de las semillas, facilitando su temprana germinación. Para las semillas de *Mimosa pudica*, *M. polycarpa* y *M. uruguensis* se obtuvieron mejores porcentajes de germinación con 10 minutos de exposición a H_2SO_4 . En cambio para las semillas de *Mimosa adpresa*, *M. schleidenii*, *Aeschynomene denticulata*, *A. montevidensis*, *A. rudis* y *Chamaecrista flexuosa*, el mejor porcentaje de germinación se obtuvo con 20 minutos de exposición a H_2SO_4 . El inconveniente que presentó esta metodología, fue que no se logró la completa esterilización de las semillas y la mayoría de ellas presentaron contaminaciones por hongos.

La metodología seleccionada para aplicar en los ensayos fue la número 3, ya que esta se construyó recabando los resultados más beneficiosos de los métodos anteriores, incorporando variaciones en el tiempo y condiciones de hinchado:

A) Para *Mimosa pudica*, *M. polycarpa* y *M. uruguensis* se remojaron las semillas durante 2 minutos en EtOH 95% y se dejaron secar en papel de filtro. Luego se las sumergió 10 minutos en H_2SO_4 concentrado (10M) y se realizaron 5 lavados con agua estéril. Luego se las trató con una solución de $HgCl_2$ 9.2 mM y HCl 0,1N durante 3 minutos, se realizaron 6 lavados sucesivos con agua estéril y se las dejó hinchando en el agua del último lavado, en estufa a 30 °C durante 1 hora. Una vez hinchadas, se las pasó a placa de Petri con Agar-agua (0,8% p/v) y se las dejó germinar en estufa a 30 °C.

B) Para *Mimosa adpresa*, *M. schleidenii*, *Aeschynomene denticulata*, *A. montevidensis*, *A. rudis* y *Chamaecrista flexuosa* las semillas se remojaron durante 2 minutos en EtOH 95% y se dejaron secar en papel de filtro. Luego se las sumergió 20 minutos en H_2SO_4

concentrado (10M) y se realizaron 5 lavados con agua estéril. Luego se las trató con una solución de HgCl_2 9.2 mM y HCl 0,1N durante 3 minutos, se realizaron 6 lavados sucesivos con agua estéril y se las dejó hinchando en el agua del último lavado, cubiertas con papel film, en estufa a 30 °C 24 horas. Una vez hinchadas, se las pasó a placa de Petri con Agar-agua (0,8% p/v) y se las dejó germinar en mesada, excepto para *C. flexuosa* que se las dejó germinar en estufa a 30 °C.

6.7 Ensayos de nodulación

Para corroborar que los aislamientos identificados fueran verdaderos simbios de las leguminosas a partir de las cuales se obtuvieron, se realizaron ensayos de nodulación en los que se enfrentaron las plantas con sus respectivos aislamientos bacterianos.

Para esto se utilizaron semillas colectadas en el área en las sucesivas salidas de campo. Las mismas fueron esterilizadas y germinadas en condiciones asépticas e inoculadas con sus respectivos aislamientos bacterianos. Se utilizaron como control negativo semillas esterilizadas y germinadas en las mismas condiciones, las cuales no se inocularon. La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos para las plantas del género *Mimosa*, y la Tabla 5 los resultados para las plantas del género *Aeschynomene*. Si bien también se probó la nodulación en *C. flexuosa*, esta no volvió a ser nodulada por las bacterias que se habían aislado de sus raíces (dato no mostrado). Por otro lado, la cepa aislada de *M. pilulifera* no pudo ser probada en su hospedero original por carecer de semillas de esta especie.

En las Tablas se indican como “T.1” los casos en los que los nódulos presentes cumplían con las características de ser nódulos efectivos; como “T.2” los casos en que los nódulos cumplían con las características de nódulos inefectivos; y como “T.3” los casos en que los nódulos cumplían las características de nódulos efectivos pero con coloración verde, en vez de rosa.

Las plantas utilizadas como controles negativos, no presentaron nódulos en sus raíces. Como puede verse en las Tablas 4 y 5, las bacterias aisladas de *M. uruguensis*, *M. adpresa*, *A. denticulada* y *A. montevidensis*, fueron capaces de nodular nuevamente el hospedero del cual fueron aisladas. Sin embargo, los nódulos producidos en *M. uruguensis* inoculada con la cepa UYMU86 (Figuras 7 y 8) y los producidos en *M.*

adpresa inoculada con la cepa UYMA66 (Figuras 9 y 10) (ambas cepas extraídas de la misma planta a la cual fueron inoculadas) tuvieron las características de nódulos inefectivos; al igual que todas las plantas de *A. montevidensis* inoculadas con las cepas aisladas de dicha especie (Figura 11).

Tabla 4. Leguminosas pertenecientes al género *Mimosa* y cepas bacterianas perteneciente a las β -Proteobacterias, con las que se llevó a cabo el ensayo de nodulación y promiscuidad.

Los mismos se realizaron en cuarto de plantas con condiciones controladas. La presencia o ausencia de nodulación se indica con los signos + y - respectivamente. Las celdas que figuran coloreadas en verde oscuro, fueron las combinaciones que produjeron nódulos con características de efectivos.

Cepa	Género	Planta de Origen	<i>M.uruguensis</i>	<i>M.adpresa</i>	<i>M.pudica</i>	<i>M.polycarpa</i>	<i>M.schleidenii</i>
UYMU86	<i>Cupriavidus</i>	<i>M.uruguensis</i>	+ (T.2)	+ (T.2)	+ (T.1)	+ (T.1)	-
UYMU80	<i>Cupriavidus</i>	<i>M.uruguensis</i>	+ (T.1)	+ (T.1)	+ (T.2)	+ (T.1)	+ (T.1)
UYMP72	<i>Burkholderia</i>	<i>M.pilulifera</i>	+ (T.2)	-	+ (T.2)	+ (T.2)	
UYMA66	<i>Cupriavidus</i>	<i>M.adpresa</i>	-	+ (T.2)	+ (T.1)	+ (T.1)	
UYMA68	<i>Cupriavidus</i>	<i>M.adpresa</i>	+ (T.1)	+ (T.1)	+ (T.1)	+ (T.1)	-

Tabla 5. Leguminosas pertenecientes al género *Aeschinomene* y cepas bacterianas pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, con las que se llevó a cabo el ensayo de nodulación y el estudio de la formación de nódulos fotosintéticos por parte de la cepa UYAD13.

Los mismos se realizaron en cuarto de plantas con condiciones controladas. La presencia o ausencia de nodulación se indica con los signos + y - respectivamente. Las celdas que figuran coloreadas en verde oscuro, fueron las combinaciones que produjeron nódulos con características de efectivos.

Cepa	Género	Planta de Origen	<i>A.montevidensis</i>	<i>A.denticulata</i>	<i>A.rudis</i>
UYAD13	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>A.denticulata</i>	+ (T.2)	+ (T.3)	+ (T.3)
UYAM16	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>A.montevidensis</i>	+ (T.2)	-	-
UYAM100	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>A.montevidensis</i>	+ (T.2)	-	-
UYAM15	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>A.montevidensis</i>	+ (T.2)	-	-

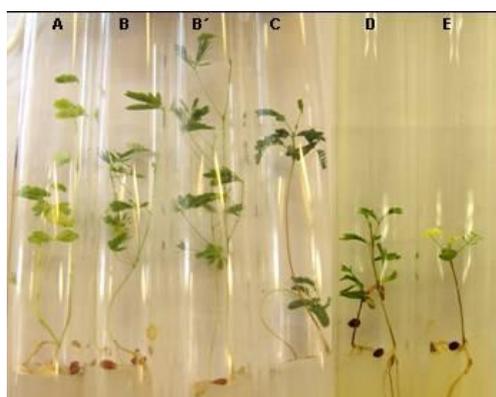


Figura 7. Plantines de mimosas crecidas en tubos de vidrio con medio de cultivo Jensen (sin nitrógeno), inoculadas con la cepa UYMU86 aislada de *Mimosa uruguensis*.

A: *Mimosa pudica*, B y B': *M. polycarpa*, C: *M. uruguensis*, D: *M. adpresa*, E: *M. schleidenii*.

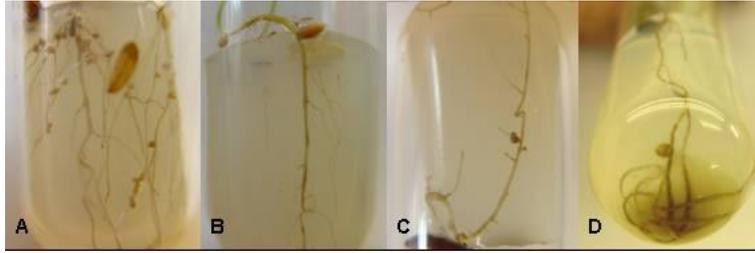


Figura 8. Nódulos en las raíces de los plantines de la Figura 7 inoculados con la cepa UYMU86.

A y B: nódulos con apariencia de efectivos en *M. pudica* y *M. polycarpa* (respectivamente). C y D: nódulos con apariencia de inefectivos en *M. uruguensis* y *M. adpresa* (respectivamente).



Figura 9. Plantines de mimosas crecidas en tubos de vidrio con medio de cultivo Jensen (sin nitrógeno), inoculadas con la cepa UYMA66 aislada de *Mimosa adpresa*.

A: *Mimosa pudica*, B: *M. polycarpa*, C: *M. uruguensis*, D: *M. adpresa*.

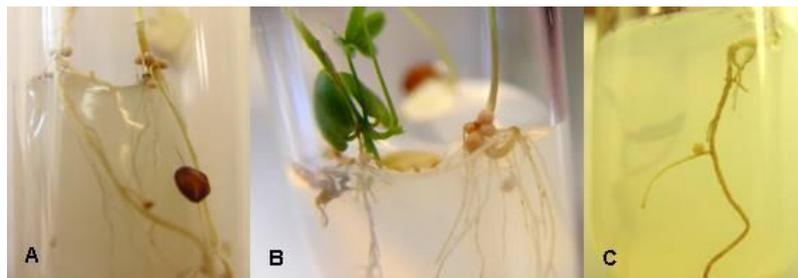


Figura 10. Nódulos en las raíces de los plantines de la Figura 9 inoculados con la cepa UYMA66.

A y B: nódulos con apariencia de efectivos en *M. pudica* y *M. polycarpa* (respectivamente). C: nódulos con apariencia de inefectivos en *M. adpresa*.

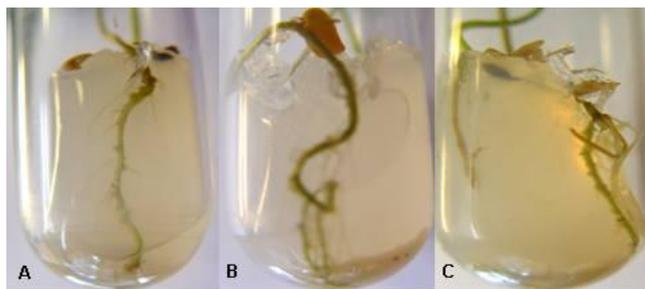


Figura 11. Nódulos “T.2” en las raíces de *Aeschinomene montevidensis* inoculada con aislamientos provenientes de nódulos en dicha especie.

A: *A. montevidensis* inoculada con la cepa UYAM16, B: *A. montevidensis* inoculada con la cepa UYAM100, C: *A. montevidensis* inoculada con la cepa UYAM15.

6.8 Ensayos de promiscuidad en el género *Mimosa*

Para estudiar la especificidad de los simbiontes aislados, se estudió la capacidad de algunas de las cepas de la colección identificadas como beta-rizobios, de nodular a otras especies de mimosas. Para esto se ensayó la capacidad de las cepas UYMU80 y UYMU86 (provenientes de *M. uruguensis*), UYMA66 y UYMA68 (provenientes de *M. adpresa*) y la cepa UYMP72 (aislada de *M. pilulifera*) de inducir la formación de nódulos en raíces de las especies *M. pudica*, *M. polycarpa*, *M. uruguensis*, *M. adpresa* y *M. schleidenii*. En la Tabla 4 se exponen los resultados obtenidos. Como puede observarse, todas las cepas fueron capaces de inducir la formación de nódulos en las leguminosas ensayadas, aunque no todas siguieron el mismo patrón en cuanto a la apariencia de efectividad de estos nódulos. Como ejemplo de esto podemos destacar que las cepas UYMU80 y UYMA68 generaron nódulos con características de efectivos (tamaño mayor a 2mm y coloración rojiza característica) en cuatro de las mimosas ensayadas. Mientras que la cepa UYMP72 indujo solamente nódulos con características de inefectivos (pequeños y decolorados) en todas las mimosas ensayadas.

6.9 Estudio de la capacidad de formar nódulos fotosintéticos del aislamiento UYAD13

Con la finalidad de corroborar la capacidad del aislamiento proveniente de *Aeschinomene denticulata*, UYAD13, de formar nódulos fotosintéticos (nódulos con

coloración verde), se realizaron dos pruebas. Una de ellas consistió en estudiar el tipo de nódulo inducido por esta bacteria en otras leguminosas del género *Aeschynomene*; y la otra, en probar el tipo de nódulo formado por *A. denticulata* al ser inoculada con otras bacterias aisladas de leguminosas del mismo género.

Como se expone en la Tabla 5, el aislamiento de *A. denticulata* (UYAD13) fue capaz de nodular tanto *A. montevidensis* como *A. rudis*. En la primera produjo nódulos que presentaron características de inefectivos (Figura 13), sin embargo en la segunda se produjeron nódulos verdes con tamaños mayores a 1 mm, características similares a los nódulos inducidos por esta cepa en *A. denticulata* (Figuras 12 y 14).

Por su lado las cepas provenientes de *A. montevidensis* no fueron capaces de inducir la formación de nódulos en *A. denticulata* (Tabla 5).



Figura 12. Nódulos con apariencia de efectivos ("T3") en las raíces de *Aeschynomene denticulata* inoculada con la cepa UYAD13.



Figura 13. Nódulos con apariencia de inefectivos en las raíces de *Aeschynomene montevidensis* inoculada con la cepa UYAD13.



Figura 14. Nódulos con apariencia de efectivos ("T3") en las raíces de *Aeschynomene rudis* inoculada con la cepa UYAD13.

7. Discusión

7.1 Colección de simbioses bacterianas asociadas a leguminosas nativas

Junto al SNAP y sus crecientes esfuerzos por proteger ciertas áreas de nuestro territorio por su valor ecológico, paisajístico y cultural; la conservación de nuestra fauna y flora autóctona ha comenzado a posicionarse en el tapete de los temas relevantes. Las plantas nativas no sólo tienen un incalculable valor por sí mismas, sino que también son requeridas para su utilización en predios agroforestales y en la recuperación de suelos degradados.

El presente trabajo contribuye en este aspecto, ya que se enmarca dentro de una línea de investigación del Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas del IIBCE que tiene como objetivo general el conocimiento, preservación y uso de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno asociadas a leguminosas nativas. Para la conservación de las plantas nativas resulta muy importante saber, entre otras cosas, qué condiciones optimizan su crecimiento en la naturaleza. Por lo tanto, el conocimiento de los microorganismos que se asocian a las raíces de las leguminosas nativas, abre el campo de investigación en búsqueda de inoculantes que promuevan su crecimiento, y así aportar a la conservación y utilización de dichas especies. Existen en nuestro equipo de trabajo, antecedentes en referencia a esto. La leguminosa nativa *Parapiptadenia rigida* (Angico) es un miembro arbóreo de la subfamilia *Mimosoideae* que presenta atributos que la hacen un buen blanco de la industria maderera; aparte de ser reconocida por la buena calidad de su leña, sus usos medicinales, su utilización en la recuperación de áreas degradadas y en sombra y abrigo para el ganado. Mediante el aislamiento y caracterización de los microorganismos asociados a los nódulos de esta planta, se han identificado bacterias eficientes en la FBN y por consiguiente capaces de promover el crecimiento de esta leguminosa (60).

En base a múltiples giras de prospección al área protegida de Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay, se han recuperado 172 simbioses bacterianas asociadas a nódulos de 28 especies de leguminosas nativas (Tabla 2). Parte de los aislamientos de la colección han sido caracterizados fisiológicamente (Lagurara, P. Tesina de grado en curso). La colección completa se encuentra conservada a -80 °C en el IIBCE, quedando

a disposición para su uso académico, así como para su uso por otros actores implicados en la conservación de los recursos naturales de nuestro país.

7.2 Identificación de los aislamientos bacterianos de la colección

7.2.1 Identificación por secuenciación de los genes ARNr 16S y *nifH*

Mediante la secuenciación del gen ARNr 16S y su comparación con la base de datos del NCBI, se identificaron a nivel de género las bacterias de la colección asociadas a nódulos de leguminosas nativas de EFIRU (Tabla 2). Para esto, se puso a punto una metodología que permitió trabajar a gran escala en el análisis de genes particulares por PCR. Dicha metodología permitió el análisis simultáneo de hasta 96 muestras (Figura 3), lo cual resultó extremadamente útil para este trabajo, así como para adelantar camino en varias investigaciones en curso, del grupo de trabajo.

Como puede observarse en la Tabla 2, los 123 aislamientos identificados pertenecen a diversos géneros bacterianos, incluyendo fundamentalmente a rizobios miembros de las Alfa y Beta proteobacterias, pero también a otras bacterias pertenecientes a las Gamma proteobacterias (*Enterobacter*, *Moraxella*), Firmicutes (*Bacillus*, *Paenibacillus*), y Actinobacteria (*Leifsonia*). Diferentes reportes mencionan la presencia de bacterias no-rizobios, coinfectando nódulos junto a algún rizobio y es posible que tengan un papel en la promoción del crecimiento vegetal. Sin embargo, hasta ahora se desconoce qué papel juegan en la simbiosis (61).

En concordancia con la amplia variedad de ambientes y especies vegetales en el área de estudio, en el presente trabajo se logró identificar representantes de casi todos los rizobios descritos. Dentro de las α -proteobacterias, se identificaron simbioses pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. Mientras que dentro de las β -proteobacterias se identificaron aislamientos pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Cupriavidus* (Tabla 2). Por otro lado, la amplificación del gen *nifH* de los aislamientos obtenidos a partir de los nódulos (Tabla 3), sugiere que dichos aislamientos podrían tener la capacidad de fijar nitrógeno. Sin embargo, contar con uno de los genes estructurales de la nitrogenasa, no garantiza que esté ocurriendo la FBN. Para demostrar esto, se debería medir la

actividad de la enzima nitrogenasa, por ejemplo mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA) (62).

Para proseguir con la identificación de los microorganismos de la colección, y analizar si los géneros inferidos a partir de su secuenciación del gen del ARNr 16S se encontraban compartiendo o no los genes de simbiosis, se secuenció el gen *nifH*. Los genes simbióticos como el gen *nifH*, forman parte del material genético flexible de los genomas bacterianos, por lo que podría existir transferencia horizontal de la información genética. (45, 63). Sin embargo, se observa que para la mayoría de los aislamientos hay coincidencia en el género bacteriano identificado utilizando la secuencia de los dos genes amplificados (Tabla 3). Esto sugiere que no estaría ocurriendo transferencia horizontal del gen *nifH* entre los simbioses analizados.

7.2.2 Análisis filogenético

La construcción de árboles filogenéticos a partir de la comparación de las secuencias obtenidas para el gen del ARNr 16S, nos permitió agrupar a las cepas bacterianas nativas con los diversos rizobios ya descritos. A su vez esto permitió confirmar el género bacteriano de todas las cepas incluidas en el árbol, lográndose en algunos casos, inferir la identidad a nivel de especie.

El árbol logrado con las cepas pertenecientes a géneros de α -Proteobacterias (Figura 5), se separa basalmente en dos ramas, una de las cuales luego se divide en dos grupos: el de los *Bradyrhizobium* y el de los *Azorhizobium*, tal como está reportado para la filogenia de rizobios, para el marcador ARNr 16S (29). La otra rama genera una politomía, que probablemente se deba a que los géneros que agrupa pertenecen a un mismo grupo que, según la bibliografía, no sólo integra a los géneros que se ven en la Figura 5 (*Mesorhizobium* y *Rhizobium*), sino que también incluye al género *Sinorhizobium* (29).

El grupo perteneciente a los *Bradyrhizobium* presenta una politomía a nivel de la base, dividiendo al género en dos agrupamientos (A y B) y quedando por fuera de ellos, la cepa (UYCS40) que proviene de nódulos de *Collaeta stenophyla*. Probablemente esto se deba a la mala calidad de la secuencia utilizada para el alineamiento, lo que impidió que el programa la integrara a alguno de los dos agrupamientos.

El agrupamiento A define parcialmente la relación filogenética que está por detrás de cada uno de los dos grupos que se originan a partir de él. En base al árbol no es posible afirmar si las cepas (UYAV20, UYAV24, 25 y 26) aisladas de *Arachis villosa* pertenecen a *B. diazoefficiens* o *B. betae* (cepas de referencia con las que se compararon). La ausencia de rama en este agrupamiento nos estaría indicando que no habría diferencias evolutivas entre ellas, pudiendo pertenecer todas a la misma especie. La cepa de referencia de la especie *B. diazoefficiens* ha sido recientemente descrita y fue aislada de nódulos de *Arachis hypogaea* (la especie comercial de *Arachis*, ampliamente distribuida en el mundo) (64). Dado que la otra cepa de referencia cercana en el árbol a las nuestras es *B. betae*, que originariamente fue aislada de raíces de remolacha (65), es muy probable que los aislamientos nativos UYAV20, UYAV24, 25 y 26, provenientes de *A. villosa*, pertenezcan a la especie *B. diazoefficiens*.

Por su lado, los aislamientos provenientes de *Inga vera* (UYIV52, UYIV54 y UYIV55) junto con uno de los aislamientos provenientes de *A. villosa* (UYAV23), se encuentran agrupados con la cepa tipo de *B. japonicum*. En la bibliografía se pueden encontrar cepas de *B. japonicum* nodulando ciertas especies de *Inga* (66), así como de *Arachis* (67). Sin embargo, los aislamientos de la colección presentan cierta distancia filogenética con respecto a la cepa de referencia, por lo que es probable que estén integrando una especie diferente, pero muy próxima (especie “hermana”), de *B. japonicum*.

Por su parte, la cepa proveniente de *Ornithopus micranthus* (UYOM90) quedó aislada de las demás, con un largo de rama que la podría estar posicionando como especie distinta a las otras. Si bien no es mucha la bibliografía sobre simbioses de esta planta, se sabe que los mismos pertenecen al género *Bradyrhizobium*. Asimismo, el inoculante comercial que existe para este género de leguminosa, está descrito como *B. canariense* según su comparación para el gen del ARNr 16S (68). Dado que la cepa tipo de esta especie no fue incluida en el árbol, no es posible comprobar si nuestro aislamiento pertenece a dicha especie.

La cepa proveniente de *Aeschynomene denticulata* (UYAD13) se agrupó junto a la cepa de referencia *B. denitrificans*, con un valor de bootstrap de 98%. Esto concuerda con lo que han descrito varios autores. *B. denitrificans*, antes *Blastobacter denitrificans* (69); es un bradirizobio fotosintético que ha sido reportado en asociación simbiótica con

leguminosas del género *Aeschynomene*, describiéndose la formación de nódulos con coloración verde (70). Curiosamente, los nódulos de los cuales fue aislada esta cepa eran de color verde y a su vez, este fenotipo se repitió en los ensayos de nodulación realizados en el presente trabajo (Figura 12 y 14), por lo que es muy probable que UYAD13 sea una cepa de *B. denitrificans*.

Los aislamientos de *Tephrosia cinerea* (UYTC116 y UYTC117), *Vigna luteola* (UYVL137) e *Indigofera suffruticosa* (UYIS48), quedaron agrupados junto con las cepas de referencia de *B. jicamae*, *B. elkanii* y *B. lablabi*. Si bien el árbol no define a cuál de estas cepas tipo se acercan dichos aislamientos, se puede observar que *B. jicamae* está más alejada filogenéticamente de las otras. Por otro lado, *B. lablabi* está reportada como simbionte de leguminosas distintas a *Tephrosia*, *Vigna* o *Indigofera* (71). Sin embargo, en la bibliografía se han descrito cepas de *B. elkanii* aisladas a partir de nódulos de estos tres géneros de leguminosas (72–74), por lo que estos resultados sugieren que los aislamientos UYTC116 UYTC117, UYVL137 y UYIS48 podrían pertenecer a esta especie.

Con respecto a los aislamientos relacionados al género *Azorhizobium*, las cepas aisladas de plantas pertenecientes al género *Sesbania* (UYSE97, UYSE98, UYSE99, UYSE104, UYSE108, UYSE109 y UYSE110) formaron una politomía junto a la cepa tipo de *Azorhizobium doebereinerae* (bootstrap de 99%). Esto podría llegar a definir como *A. doebereinerae* a los aislamientos de *Sesbania*, tal como se ha reportado en trabajos previos (75). Sin embargo, dos de estos aislamientos (UYSP98 y UYSE108) se ubicaron separados del resto, integrando un grupo aparte con un bootstrap de 100%. Si bien entre ellos no se llega a definir una separación filogenética, el largo de rama que los separa de los demás aislamientos de *Sesbania*, es mayor al que define a *A. caulinodans* y a *A. oxalatophilum* como especies distintas. Por lo que podríamos asumir que ambas pertenecen a una especie “hermana” de *A. doebereinerae*.

El agrupamiento de los *Mesorhizobium* presenta una gran politomía basal, en la cual los aislamientos provenientes de *Lotus* (UYLO63, UYLO64 y UYLO65) quedan agrupados junto a las cepas tipo *Mesorhizobium amorphae* y *M. septentrionale*. Un estudio realizado en Argentina describió un grupo de aislamientos de nódulos de plantas del género *Lotus* en dicho país, cercanamente relacionado a *M. amorphae* (76). Los reportes para simbiontes de la especie *L. corniculatus* en nuestro territorio, muestran

que la gran mayoría pertenecen a la especie *M. huakuii*, aunque también se identificaron simbiontes muy similares a *M. septentrionale* en base a la comparación de la secuencia del gen del ARNr 16S (77). Estas evidencias, nos indicarían que los aislamientos nativos analizadas en este trabajo podrían pertenecer a las especies *M. amorphae* y *M. septentrionale*.

Los aislamientos provenientes de *Vauchelia caven* (UYAC09 y UYAC11) se agruparon junto a la cepa de referencia de *M. plurifarum*. Dicha especie fue aislada por primera vez de una especie del género *Acacia* (78), por lo que nuestras cepas podrían ser representantes de dicha especie. Resulta interesante no haber encontrado en la literatura reportes previos de la identificación molecular de aislamientos provenientes de *V. caven*, por lo que este trabajo sería el primero en hacerlo. Sin embargo, antes deberíamos confirmar que los aislamientos presentes en nuestra colección son capaces de producir nódulos efectivos en dicha leguminosa.

Por último, en el agrupamiento de los *Rhizobium*, dos de los aislamientos provenientes de nódulos de las raíces del género *Trifolium* (UYTR122 y UYTR130), el del género *Latyris* (UYLA61) y el proveniente de nódulos de *Vicia platensis* (UYVP135), quedaron integrando una gran politomía junto a las cepas tipo de *Rhizobium leguminosarum* y *R. phaseoli*. Si bien en este caso el árbol no nos permite saber a cuál de estas se asemejan más las nuestras, en la bibliografía se ha reportado la asociación de plantas de los tres géneros mencionados con *R. leguminosarum* (79–81). Por lo que podríamos arriesgarnos a decir que nuestros aislamientos también corresponden a dicha especie. Sin embargo, cuatro cepas provenientes de nódulos de raíz de *Trifolium* (UYTR118, UYTR119, UYTR127 y UYTR128) exhibieron un largo de rama considerable, que las podría estar separando como especies diferentes. Aunque también es cierto, que la distancia filogenética que exhibe el otro agrupamiento que contiene las cepas tipo de *R. rhizogenses*, *R. mayense*, *R. jaguares*, *R. tropici*, *R. calliandrae* es aún mayor, por lo que no está claro el sustento para dicha afirmación.

El árbol de las β -Proteobacterias separó en dos grandes grupos a los géneros *Cupriavidus* y *Burkholderia* (Figura 6). El agrupamiento que integra a las cepas del género *Cupriavidus*, define un conjunto con todos los aislamientos provenientes de nódulos de *M. uruguensis* y *M. adpresa* (UYMU75, UYMU76, UYMU77, UYMU78,

UYMU80, UYMU82, UYMU83, UYMU86 y UYMU88; y UYMA66 respectivamente), dejando por fuera a todas las cepas de referencia que se habían incluido en el árbol. La distancia filogenética que separa los aislamientos obtenidos de estas mimosas, de las cepas tipo, es similar a la que separa a las cepas de referencia entre sí. A su vez, la distancia filogenética que separa a los aislamientos provenientes de *M. adpresa* de los de *M. uruguensis*, es aún mayor. Esto nos está indicando que los aislamientos provenientes de ambas mimosas nativas, podrían pertenecer a especies distintas a las cepas de referencia incluidas en el árbol. Y a su vez, el aislamiento de *M. adpresa* (UYMA66) probablemente pertenezca a una especie diferente, aunque próxima, a la de los aislamientos de *M. uruguensis*.

Por otro lado, el aislamiento proveniente de nódulos encontrados en *Arachis villosa* (UYAV18), se agrupa junto a las cepa tipo de *Cupriavidus necator*, con el soporte de un elevado valor de bootstrap (96%). La rama más externa de este agrupamiento, corresponde a la cepa tipo para la especie (AF191737), que no ha sido reportada como noduladora. Las dos ramas que quedan por dentro (UFLA01-669 y UFLA02-71) y que probablemente no se separan entre sí porque pertenecen a la misma especie, fueron aisladas de leguminosas de Minas Gerais (Brasil) y se ha probado su nodulación en plantas tanto de la subfamilia de las *Mimosoideae* como de las *Papilionoideae* (30).

En lo que respecta al agrupamiento del género *Burkholderia*, el árbol logrado posiciona al aislamiento de *Calliandra parvifolia* (UYCP33) junto a la cepa de referencia de *Burkholderia tuberum*, con el respaldo de un bootstrap de 85%. Ya se ha encontrado a dicha especie nodulando en la subfamilia *Mimosoideae* en regiones del centro de Brasil (30), por lo que el aislamiento proveniente de nódulos de *Calliandra* podría pertenecer a esta especie.

Por otro lado, los aislamientos de *M. pilulifera* (UYMP72 y UYMP74) y el de *Chamaecryta flexuosa* (UYCF35), se agruparon junto con la cepa tipo de *Burkholderia terrae*, con un valor de bootstrap de 91%. Dicha especie no está reportada como simbionte de leguminosas, aunque sí es fijadora de nitrógeno en vida libre, y ha sido agrupada en base a la secuencia del gen del ARNr 16S junto a las cepas tipo de *B. hospita*, *B. caribensis* y *B. phymatum* (82). Estas últimas dos sí son fijadoras de nitrógeno en asociación con leguminosas (30). El bootstrap que soporta la separación del grupo que integra a los aislamientos de *M. pilulifera* y el de *Chamaecryta*

flexuosas, junto a la cepa de referencia de *B. terrae*, y al nodo del cual se abren las ramas de *B. caribensis* y *B. hospita*, es relativamente bajo (67%). Por lo que no se puede estar plenamente seguros de que estas cepas estén realmente separadas, de modo de que existe la posibilidad de que nuestros aislamientos pertenezcan a la especie *B. caribensis*. Sin embargo resulta llamativo el hecho de que una *Caesalpinioideae* (*Chamaecrista flexuosa*) esté nodulada por una β -Proteobacteria. Son muy pocos los casos en los que se ha reportado nodulación en esta subfamilia de leguminosas. Si bien el género *Chamaecrista* es de los más nodulados, la presencia de un β -rizobio en asociación con ella, no ha sido previamente reportada y merece ser investigada en profundidad.

7.3 Distribución bacteriana en distintos ambientes del Parque Nacional EFIRU y pares simbióticos particulares

Si bien el presente trabajo no permite emitir afirmaciones estadísticamente sustentadas, no se puede dejar de hacer referencia a la predominancia de ciertos géneros bacterianos nodulando las leguminosas en cada ambiente dentro del parque nacional EFIRU. La presencia de *Bradyrhizobium* en el Arenal y en el Monte Ribera, de *Mesorhizobium* en el Blanqueal y en el Monte Parque, y de *Azorhizobium* en el Estero (Figura 3), podría estar evidenciando el proceso selectivo subyacente a las asociaciones establecidas. Martínez-Romero (2009) hace referencia al hecho de que si una bacteria en asociación con una planta le contribuye con suficiente nitrógeno, luego esta planta tendrá una basta producción de semillas que presentan buena afinidad a esa bacteria. Esto incrementaría a su vez la especificidad en la interacción simbiótica, dándole ventajas a esta bacteria sobre las otras. Cuando el nódulo senesce, la población bacteriana más competitiva y más favorecida, puede tornarse enriquecida en el suelo (47, 48). Esto explicaría la abundancia de un género bacteriano particular nodulando localmente a más de una leguminosa.

La presencia ó ausencia de esas bacterias más eficientes, nodulando determinadas leguminosas, podría llegar a servir como indicador de calidad y conservación del suelo.

Aunque cabe resaltar que lo anterior se encuentra sujeto a múltiples variables, tanto bióticas como abióticas (83).

El género *Bradyrhizobium* fue el presente en más especies de leguminosas en el Parque (12 especies), hallándose en todos los ambientes excepto en el Blanqueal (Tabla 2, Figura 4). Esto concuerda con sus descripciones como género cosmopolita, que suelen encontrarse en la bibliografía (84). El que le sigue en este sentido, fue el género *Mesorhizobium*, presente en seis especies vegetales y ausente en dos ambientes, Monte Ribera y Estero. Esto también concuerda con sus descripciones de género de distribución cosmopolita y amplio rango de huésped (84).

Como se muestra tanto en la Tabla 2 como en la Figura 4, las mismas asociaciones entre rizobios y leguminosas se encontraron en varios ambientes. El haber encontrado el mismo par simbiótico en los diferentes sitios donde ocurría la planta, podría estar indicando que pese al ambiente en el cual se encuentren y a que la bacteria simbiótica en cuestión no sea la predominante en el sitio, la asociación prevalece. Esto puede deberse a que sean asociaciones simbióticas muy antiguamente establecidas, en un ambiente determinado, bajo ciertas condiciones específicas, y que la coevolución haya llevado al par simbiótico a especificarse y tornarse más apto para colonizar un nuevo ambiente donde ninguno de los dos organismos había ocurrido.

La predominancia de β -rizobios en los nódulos de representantes nativos del género *Mimosa* (Tabla 2), aporta a la teoría de que los β -rizobios son los ocupadores predominantes de la subfamilia *Mimososideae*. En los últimos años, diferentes trabajos han observado esto mismo en distintas especies de mimosas en América Latina. Tal es el caso de Brasil, donde encontraron predominancia de rizobios del género *Burkholderia*, y de Costa Rica, donde encontraron predominancia de *Cupriavidus* (36, 61). Sin bien en México se reporta que *Rhizobium* es el género dominante en los nódulos de plantas de esta subfamilia (85, 86), un trabajo posterior, que estudia los simbiontes de mimosas en Texas (EEUU), encuentra al género *Cupriavidus* como el ocupador dominante (36). En el presente trabajo se observó la predominancia de *Cupriavidus* en dos de las tres especies del género *Mimosa* muestreadas. Por lo tanto, si bien lo que está ocurriendo con las mimosas del parque va en sintonía con lo que ocurre en otras partes de nuestro continente; resulta interesante que en el caso de

EFIRU haya una dominancia de los *Cupriavidus* mientras que en distintas zonas de Brasil existe una clara dominancia del género *Burkholderia*.

La presencia de un bradirizobio fotosintético asociado a nódulos de *Aeschinomene denticulata* resultó llamativa, si bien se había apreciado la coloración verde de los nódulos colectados. El género *Bradyrhizobium* es el único rizobio que ha conservado la capacidad de fotosintetizar y fijar nitrógeno en condiciones de vida libre y en simbiosis, a diferencia de los demás géneros de rizobios que sólo son capaces de fijar nitrógeno en simbiosis, lo que aporta a las hipótesis que sugieren que *Bradyrhizobium* podría ser el linaje más cercano a la forma ancestral (12).

7.4 Ensayo de nodulación

Para comprobar la capacidad simbiótica de los aislamientos de la colección, es necesario ensayar su capacidad de formar nódulos al ser inoculados nuevamente en su hospedero original. En este trabajo pusimos a punto diversos métodos de esterilización superficial de semillas de leguminosas nativas lo que permitió obtener plantas sin nódulos en las raíces en los controles negativos de inoculación, dándole validez a los ensayos realizados. A su vez el haber podido encontrar la forma de promover y acelerar la germinación de las semillas utilizadas en este trabajo, fue fundamental para adaptar los ensayos de plantas a los tiempos de la pasantía (Sección 5.6 del apartado Resultados). De todos modos, en caso de tener que volver a realizar ensayos con estas especies vegetales, se deberán probar otras metodologías en las que se sustituya el $HgCl_2$ por alguna otra sustancia que no sea tan contaminante y sea más simple su descarte.

Debido a la gran diversidad bacteriana presente en la colección, y la imposibilidad de ensayar la capacidad de nodulación de todos los rizobios aislados, se decidió centrar el ensayo en dos grupos bacterianos: las β -Proteobacterias aisladas de leguminosas del género *Mimosa*, y las cepas del género *Bradyrhizobium* aisladas de leguminosas del género *Aeschinomene*.

El ensayo de nodulación corroboró la capacidad de los aislamientos provenientes de nódulos de *Mimosa uruguensis*, *M. adpresa*, *Aeschinomene denticulada* y *A.*

montevidensis, de nodular el hospedero del cual fueron aislados. Sin embargo no todas las cepas indujeron nódulos con características de efectivos. Por ejemplo los nódulos producidos por los aislamientos UYMU86 y UYMA66 en *M. uruguensis* y *M. adpresa* respectivamente, produjeron nódulos sin el tamaño y la coloración característica de los nódulos efectivos (Tabla 4). Del mismo modo, las cepas aisladas de *A. montevidensis* (UYAM15, UYAM16 y UYAM100), si bien fueron capaces de formar nódulos en la leguminosa de la cual fueron aislados, los mismos presentaron características de inefectivos.

En todos los casos, para poder confirmar la efectividad de la asociación simbiótica, deberíamos contar con alguna medida directa de la actividad de la enzima responsable de la fijación de nitrógeno, la nitrogenasa. En este sentido sería interesante realizar un ensayo de ARA.

La capacidad de volver a nodular la especie de leguminosa de la cual se obtuvo, del aislamiento de *Burkholderia* UYCP35, proveniente de nódulos de la *Caesalpinioideae*, *Chamaecrista flexuosa*, así como del aislamiento de *Arachis villosa* UYAV18, perteneciente al género *Cupriavidus*, no pudo ser comprobada. En el caso de *A. villosa*, no se contaba con semillas para poder realizar el experimento. Pero para *C. flexuosa* cabe destacar que, si bien se logró poner a punto un sistema eficaz para su germinación, el mantenimiento de los plantines fue dificultoso y los individuos inoculados nunca lucieron saludables. Estos resultados llevarían a pensar que podemos estar frente a falsos negativos, por no haber trabajado con las condiciones de desarrollo adecuadas de esta planta. También es factible que la asociación entre esta planta y su simbiote sea muy dependiente de los factores ambientales y los estreses a los que esté sometida la planta la conduzcan a asociarse al rizobio.

7.5 Ensayos de promiscuidad en el género *Mimosa*

En lo que respecta a los resultados obtenidos para los ensayos de promiscuidad en plantas del género *Mimosa* y las bacterias simbióticas provenientes de ellas (Tabla 4); se podría hacer un análisis desde la óptica de la planta y un análisis desde la óptica del microorganismo simbiótico.

Desde el punto de vista de la planta podemos decir que las especies de leguminosas pueden ser clasificadas según su capacidad y eficacia de ser noduladas como: i) promiscuas en nodulación y en efectividad: aquellas noduladas por un amplio rango de cepas genéticamente diversas y que fijan nitrógeno efectivamente; ii) promiscuas en la nodulación, pero específicas en su capacidad de fijar nitrógeno; y iii) específicas para nodular y también en la efectividad de la fijación de nitrógeno (87).

En el presente trabajo se pudo observar que la especie *M. polycarpa* es una especie promiscua en nodulación y en efectividad, dado a que produjo nódulos con cinco de seis aislamientos bacterianos ensayados; y que de estos cinco aislamientos, cuatro produjeron nódulos con características de efectivos (Tabla 4). Estos cuatro aislamientos bacterianos con los cuales produjo nódulos efectivos pertenecen al género *Cupriavidus*, todos provenientes de Arenal Costero (Tabla 2). Cabe resaltar que este sería el primer reporte de simbioses para *Mimosa polycarpa*, no habiéndose encontrado en la bibliografía antecedentes de dicha interacción. Por su parte *M. pudica*, una leguminosa de reconocido carácter promiscuo (88–90), generó nódulos con cinco de seis aislamientos bacterianos ensayados, y con tres de esos cinco produjo nódulos efectivos (Tabla 4). Los tres aislamientos son del género *Cupriavidus*. La capacidad de formar asociaciones simbióticas entre bacterias del género *Cupriavidus* y la leguminosa *M. pudica* ha sido previamente documentada (90, 91). Efectivamente, esta leguminosa ha sido extensamente utilizada como planta trampa para recuperar *Cupriavidus* simbióticos a partir de diversas muestras de suelo (92). Sin embargo, las dos especies nativas del parque, *M. uruguensis* y *M. adpresa*, parecerían ser promiscuas en la nodulación, pero específicas en su capacidad de fijar nitrógeno. Las plantas de *M. uruguensis* generaron nódulos con cuatro de seis aislamientos ensayados, pero fueron nódulos efectivos en sólo dos casos (Tabla 4). Uno de los casos mencionados fue con el aislamiento UYMU80 proveniente de los nódulos de *M. uruguensis*, y el otro caso fue utilizando el aislamiento UYMA68 proveniente de *M. adpresa*, ambos aislamientos del género *Cupriavidus*. Sorprendentemente se observó el mismo comportamiento en las plantas de *M. adpresa*, las cuales fueron noduladas por cuatro de los cinco aislamientos ensayados pero solamente se produjeron nódulos efectivos con los mismos dos aislamientos (Tabla 4). Sobre *M. schleidenii* no se puede

sugerir ninguna clasificación, porque el número de aislamientos bacterianos ensayados, no es suficiente como para realizar alguna afirmación.

Desde el punto de vista de los microorganismos simbioses, estos se pueden clasificar en promiscuos o no dependiendo del rango de huésped con que forman nódulos. En este caso es pertinente hacer notar que la cepa UYMU80 (un *Cupriavidus* proveniente de nódulos de *M. uruguensis*) sería un rizobio promiscuo, ya que fue capaz de nodular las 5 especies del género *Mimosa* ensayadas; y en cuatro de esas mimosas, los nódulos fueron efectivos. El aislamiento UYMA68 (un *Cupriavidus* aislado de nódulos de *M. adpresa*) también podría ser considerado un aislamiento promiscuo, ya que noduló cuatro de cinco especies del género *Mimosa* probadas; y en todos los casos, fueron nódulos efectivos (Tabla 4). Por su parte, el aislamiento perteneciente al género *Burkholderia*, proveniente de *M. pilulifera*, si bien fue capaz de nodular a tres de las cuatro especies del género *Mimosa* probadas, en ningún caso se produjeron nódulos efectivos. Por lo que se podría especular que las bacterias pertenecientes al género *Cupriavidus* son las más eficientes nodulando a las mimosas que fueron probadas en este ensayo.

Como se mencionó anteriormente, las cepas UYMU86 y UYMA66, provenientes de *M. uruguensis* y *M. adpresa* respectivamente, produjeron nódulos sin apariencia de nódulos efectivos en la misma planta de la cual fueron aislados. En cambio sí produjeron nódulos efectivos en la mimosa tipo *M. pudica*, y en la mimosa nativa *M. polycarpa*. Esto demuestra que ambas cepas sí son fijadoras de nitrógeno en simbiosis con leguminosas. Quizás nos estemos enfrentando a dos casos particulares de establecimiento de nuevos pares simbióticos, donde tal vez no se han expresado aún los genes de la fijación de nitrógeno, pero sí han coevolucionado para que se pudiese dar la infección radicular y expresión de los genes de nodulación.

7.6 Estudio de la capacidad de formar nódulos fotosintéticos del aislamiento UYAD13

Los ensayos realizados para corroborar la capacidad del aislamiento UYAD13 (obtenido a partir de nódulos de *Aeschynomene denticulata*) de inducir nódulos fotosintéticos, permitieron observar que el mismo produce nódulos con esta capacidad. Tanto en la

planta de la cual fue aislada, como en otra planta del mismo género (*A. rudis*); se observaron nódulos con la coloración verde característica que presentan aquellos que son capaces de realizar fotosíntesis. Si bien este aislamiento generó nódulos en la especie *A. montevidensis*, estos presentaron características de inefectivos. Pero, como se mencionó con anterioridad, todos los aislamientos provenientes de esta planta, indujeron nódulos del mismo tipo, al ser inoculadas nuevamente a su hospedero original. Por lo que queda sin ser resuelta la capacidad de *A. montevidensis*, de establecer asociaciones simbióticas efectivas con rizobios.

Por otro lado, ninguna de los aislamientos de *A. montevidensis*, fue capaz de nodular a *A. denticulata* ni a *A. rudis*. Por lo que no se pudo saber si otras bacterias producen nódulos con las mismas características que los que indujo el aislamiento UYAD13, en dichas plantas.

8. Conclusiones y perspectivas

A modo de concluir, cabe mencionar que este trabajo aportó a una de las líneas de investigación del departamento BIOGEM del IIBCE, en la medida que logró poner a punto distintos métodos de trabajo en el laboratorio. Uno de ellos fue la metodología de alto rendimiento en la manipulación de muestras de ADN, la cual proporcionó un importante ahorro de tiempo en el análisis de las muestras con las que se trabajó. Asimismo, se lograron poner a punto metodologías apropiadas de esterilización superficial y germinación de las semillas que fueron incluidas en los ensayos. Esto permitió realizar los mismos en condiciones de esterilidad, de modo que la población bacteriana que se inoculó fuese la más abundante en contacto con la planta. A su vez, el haber encontrado la forma de vencer la dormancia de las semillas, permitió ajustar los tiempos del ensayo a los de la pasantía. Ambas metodologías servirán para varios de los proyectos en los que se trabaja en el laboratorio, así como para las futuras investigaciones que resulten a partir de esta.

También es un aporte de este trabajo, junto con los esfuerzos de gran parte del equipo de BIOGEM, el establecimiento e identificación de una colección de microorganismos obtenidos a partir de las raíces de 28 especies distintas de leguminosas nativas, presentes en el parque nacional EFIRU.

Resulta importante resaltar la gran diversidad de bacterias asociadas a las raíces de las leguminosas en el área, encontrándose representantes de todos los géneros de rizobios reportados, a excepción del género *Sinorhizobium*. Asimismo, se observó la predominancia de los géneros *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* en las leguminosas del parque. Aunque cabe destacar la preferencia de las especies del género *Mimosa*, por β -rizobios. Particularmente, este trabajo reportó por primera vez los simbioses asociados a las raíces de *M. pilulifera*, quienes resultaron pertenecer al género *Cupriavidus*. Interesantemente, de acuerdo a los análisis filogenéticos, las cepas de la colección pertenecientes a dicho género bacteriano, aisladas de *M. uruguensis* y *M. adpresa*, parecerían integrar una nueva especie, diferente a las cepas de referencia incluidas en la comparación. De todos modos, habría que comprobar lo antes dicho utilizando otros marcadores genéticos. Cabe resaltar que dos cepas provenientes de estas mimosas (UYMU80 y UYMA68), mostraron un amplio rango de huésped, siendo

capaces de nodular efectivamente a varias especies de mimosas, por lo que sería interesante continuar con su caracterización, en vista de su posible utilización como inoculantes.

También fue hallado interesante el haber encontrado un representante del género *Cupriavidus* nodulando a la *Papilionoideae*, *Arachis villosa*; y un representante del género *Burkholderia* nodulando a la *Caesalpinoideae*, *Chamaecrista flexuosa*. El establecimiento de asociaciones simbióticas entre β -proteobacterias y las dos subfamilias nombradas, no es muy frecuente. Si bien no fue posible comprobar mediante ensayos con plantas, que estas cepas sean capaces de establecer asociaciones simbióticas, queda pendiente seguir trabajando en ello. En el país, las leguminosas presentan gran potencial de uso como alimento humano y animal, en especies de grano, forrajeras y árboles en los montes nativos y en asociaciones silvopastoriles (87). Por lo que el conocimiento de los microorganismos que se asocian naturalmente a las raíces de las leguminosas nativas, abre el campo de investigación en búsqueda de inoculantes adaptados a ellas en nuestros suelos, que promuevan su crecimiento y así aportar a la conservación y utilización de dichas especies.

9. Anexos

9.1 Anexo 1

Crecimiento Bacteriano: Medio de cultivo YEM + Gto.

Pesar y mezclar los componentes de la Tabla 6 a excepción del agar.

Agregar agua destilada y ajustar el pH a 6,8 – 7,0 antes de agregar el agar.

Esterilizar 20 minutos a 121 °C.

Tabla 6. Composición del medio YEM.

Medio YEM + Gto.	
Componente	Cantidad por litro
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7agua	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Agar	18,0 g
Glutamato	10,0 ml

Electroforesis en gel de Agarosa: Buffer Tris-Acético-EDTA (TAE)

Disolver en agua destilada los componentes de la Tabla 7 en cantidad suficiente para lograr la concentración indicada.

Tabla 7. Composición del buffer TAE.

Composición del buffer TAE 1X	
Componente	Concentración
Tris-acetato	0,04 M
EDTA	0,001 M

Ensayo de plantas:

Medio Jensen

Pesar y agregar los componentes de la Tabla 8 a excepción del agar.

Agregar agua destilada y mezclar hasta disolver los componentes. Ajustar el pH a 7 antes de agregar el agar. Esterilizar 20 minutos a 121 °C.

En la Tabla 9 se detalla la composición de la solución de micronutrientes.

Tabla 8. Composición del medio Jensen.

Medio Jensen	
Componente	Cantidad por litro
Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,17 g
Solucion de micronutrientes	1,0 ml
Agar	8,0 g

Tabla 9. Composición de la Solución de micronutrientes para el medio Jensen.

Solución de Micronutrientes	
Componente	Cantidad por litro
H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ 4agua	2,03 g
ZnSO ₄ 7agua	0,22 g
CuSO ₄ 5agua	0,08 g
MoO ₃ agua	0,09 g

9.2 Anexo 2

Tabla 10. Código de nombramiento de las cepas colectadas de nódulos de leguminosas, en el Parque Nacional EFIRU.

Cada fila hace referencia a un individuo muestreado, las cepas aisladas del mismo (no más de dos por planta) y el sitio de muestreo.

Planta	Código	Sitio de colecta
<i>Chamaecrysta flexuosa</i>	UYCF 35 UYCF 36	Puerto Viejo
<i>Acacia bonaerensis</i>	UYAB 01	Vivero liceo
<i>Acacia bonaerensis</i>	UYAB 02	Isletas
<i>Acacia cavен</i>	UYAC 03 UYAC 04	Blanquear San Javier
<i>Acacia cavен</i>	UYAC 05 UYAC 06	Puerto Viejo
<i>Acacia cavен</i>	UYAC 07	Arenal Uliana
<i>Acacia cavен</i>	UYAC 08	Arenal Uliana
<i>Acacia cavен</i>	UYAC 09	Nuevo Berlín Norte
<i>Acacia cavен</i>	UYAC 10	Nuevo Berlín Sur
<i>Acacia cavен</i>	UYAC 11	Nuevo Berlín Sur
<i>Calliandra parvifolia</i>	UYCP 29	Nuevo Berlín Sur
<i>Calliandra parvifolia</i>	UYCP 30 UYCP 31	Nuevo Berlín Sur
<i>Calliandra parvifolia</i>	UYCP 32 UYCP 33	Puerto Viejo
<i>Calliandra parvifolia</i>	UYCP 34	Puerto Viejo
<i>Inga vera</i>	UYIV 49	Isla El Polaco
<i>Inga vera</i>	UYIV 50 UYIV 51	Bondarenko
<i>Inga vera</i>	UYIV 52 UYIV 53	Bondarenko
<i>Inga vera</i>	UYIV 54 UYIV 55	Bondarenko
<i>Inga vera</i>	UYIV 56 UYIV 57	Bondarenko
<i>Inga vera</i>	UYIV 58 UYIV 59	Islas
<i>Inga vera</i>	UYIV 60	Puerto Viejo
<i>Mimosa adpresa</i>	UYMA 66 UYMA 67	Arroyo Yeguadas
<i>Mimosa adpresa</i>	UYMA 68	Nuevo Berlín Sur
<i>Mimosa pilulifera</i>	UYMP 69	Puerto Viejo
<i>Mimosa pilulifera</i>	UYMP 70 UYMP 71	Puerto Viejo
<i>Mimosa pilulifera</i>	UYMP 72 UYMP 73	Nuevo Berlín Sur
<i>Mimosa pilulifera</i>	UYMP 74	Nuevo Berlín Sur
<i>Mimosa urugüensis</i>	UYMU 75 UYMU 76	Puerto Viejo
<i>Mimosa urugüensis</i>	UYMU 77 UYMU 78	Puerto Viejo
<i>Mimosa urugüensis</i>	UYMU79 UYMU 80	Puerto Viejo
<i>Mimosa urugüensis</i>	UYMU 81 UYMU 82	Puerto Viejo
<i>Mimosa urugüensis</i>	UYMU 83	Puerto Viejo
<i>Mimosa urugüensis</i>	UYMU 84	Puerto Viejo
<i>Mimosa urugüensis</i>	UYMU 85 UYMU 86	Vivero liceo
<i>Mimosa urugüensis</i>	UYMU 87 UYMU 88	Vivero liceo
<i>Neptunia pubescens</i>	UYNP 89	Blanquear San Javier
<i>Aeschynomene denticulata</i>	UYAD 12	Nuevo Berlín Sur
<i>Aeschynomene denticulata</i>	UYAD 13	Nuevo Berlín Sur
<i>Aeschynomene montevidensis</i>	UYAM 14 UYAM 15	Puerto Viejo
<i>Aeschynomene montevidensis</i>	UYAM 16	Puerto Viejo
<i>Aeschynomene montevidensis</i>	UYAM 17	Estero al lado motel Puerto Viejo
<i>Arachis villosa</i>	UYAV 18	Puerto Viejo
<i>Arachis villosa</i>	UYAV 19 UYAV 20	Puerto Viejo
<i>Arachis villosa</i>	UYAV 21 UYAV 22	Puerto Viejo
<i>Arachis villosa</i>	UYAV 23 UYAV 24	Puerto Viejo
<i>Arachis villosa</i>	UYAV 25	Puerto Viejo
<i>Arachis villosa</i>	UYAV 26	Nuevo Berlín Sur
<i>Arachis villosa</i>	UYAV 27 UYAV 28	Nuevo Berlín Sur

<i>Collaea stenophylla</i>	UYCS 37 UYCS 38	Nuevo Berlín Sur
<i>Collaea stenophylla</i>	UYCS 39 UYCS 40	Nuevo Berlín Sur
<i>Erythrina crista-galli</i>	UYEC 41	Blanqueal Yacaré
<i>Galactia striata</i>	UYGS 42	Puerto Viejo
<i>Geoffroea decorticans</i>	UYGD 43	Blanqueal Yacaré
<i>Indigofera suffruticosa</i>	UYIS 44	Arenal al lado motel Puerto Viejo
<i>Indigofera suffruticosa</i>	UYIS 45	Arenal al lado motel Puerto Viejo
<i>Indigofera suffruticosa</i>	UYIS 46 UYIS 47	Arenal al lado motel Puerto Viejo
<i>Indigofera suffruticosa</i>	UYIS 48	Arenal al lado motel Puerto Viejo
<i>Latyrus sp</i>	UYLA 61	Mafalda
<i>Lotus corniculatus</i>	UYLC62	Isletas
<i>Lotus sp.</i>	UYLO 63 UYLO 64 UYLO 65	Nuevo Berlín Sur
<i>Ornithopus micranthus</i>	UYOM 90 UYOM 91	Puerto Viejo
<i>Ornithopus micranthus</i>	UYOM 92 UYOM 93	Puerto Viejo
<i>Sesbania punicea</i>	UYSP 94 UYSP 95	Isletas
<i>Sesbania punicea</i>	UYSP 96 UYSP 97	Puerto Viejo
<i>Sesbania punicea</i>	UYSP 98	Blanqueal San Javier
<i>Sesbania punicea</i>	UYSE 99	Blanqueal San Javier
<i>Sesbania sp</i>	UYSE 100 UYSE 101	Esteros Ocampo
<i>Sesbania sp</i>	UYSE 102	Esteros Ocampo
<i>Sesbania sp</i>	UYSE 103 UYSE 104	Bondarenko
<i>Sesbania sp</i>	UYSE 105 UYSE 106	Filomena Chica
<i>Sesbania sp</i>	UYSE 107 UYSE 108	Estero al lado motel Puerto Viejo
<i>Sesbania sp</i>	UYSE 109 UYSE 110	Estero al lado motel Puerto Viejo
<i>Sesbania sp</i>	UYSE 111 UYSE 112	Isletas
<i>Stylosanthes leiocarpa</i>	UYSL 113	Isletas
<i>Tephrosia cinerea</i>	UYTC 114 UYTC 115	Nuevo Berlín Sur
<i>Tephrosia cinerea</i>	UYTC 116 UYTC 117	Arenal al lado motel Puerto Viejo
<i>Trifolium sp.</i>	UYTR 118	Arenal al lado motel Puerto Viejo
<i>Trifolium sp.</i>	UYTR 119 UYTR 120	Blanquear San Javier
<i>Trifolium sp.</i>	UYTR 121 UYTR 122	Isletas
<i>Trifolium sp.</i>	UYTR 123 UYTR 124	Isletas
<i>Trifolium sp.</i>	UYTR 125 UYTR 126	Isletas
<i>Trifolium sp.</i>	UYTR 127 UYTR 128	Blanquear San Javier
<i>Trifolium sp.</i>	UYTR 129 UYTR 130	Blanquear San Javier
<i>Trifolium sp.</i>	UYTR 131 UYTR 132	Isletas
<i>Vicia platensis</i>	UYCP 133 UYVP 134	Isletas
<i>Vicia platensis</i>	UYVP 135	Isletas
<i>Vigna luteola</i>	UYVL 136 UYVL 137	Isletas
		Nuevo Berlín Sur

10. Bibliografía

1. **Intendencia Municipal de Río Negro U.** <http://www.rionegro.gub.uy/web/rionegro/parque-nacional-esteros-de-farrapos-e-islas-del-rio-uruguay>.
2. **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.
3. **Vivienda Ordenamiento territorial y Medio ambiente M De.** 2001. Manifiesto de Esteros de Farrapos, para su integración al SNAP.
4. **Vivienda Ordenamiento territorial y Medio ambiente M De.** 2007. Documento de trabajo Producto 2 – Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay.
5. **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-Biología-Botánica.
6. **Izaguirre P, Beyhaut R.** 2003. Las leguminosas del Uruguay y regiones vecinas. Parte 2 y 3: Caesalpinoideae y Mimosoideae. Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay.
7. **Polhill R RP.** 1981. Advances in Legume Systematics. Parts 1 and 2. Royal Botanic Gardens, Kew.
8. **Izaguirre P, Beyhaut R.** 2003. Las leguminosas del Uruguay y regiones vecinas. Parte 1: Papilionoidea. Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay., Montevideo.
9. **Young J HK.** 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* **133**:87–94.
10. **Young J.** 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *Biol. nitrogen Fixat.* 960.
11. **Raymond J, Siefert JL, Staples CR, Blankenship RE.** 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol Biol Evol* **21**:541–554.
12. **Lloret L, Martínez-Romero E.** 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **47**:43–60.
13. **Crews TE, Peoples MB.** 2004. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: Ecological tradeoffs and human needs. *Agric. Ecosyst. Environ.* **102**:279–297.
14. **Sprent JI.** 1979. The biology of nitrogen-fixing organisms. *The biology of nitrogen-fixing organisms.*

15. **Doyle J, Ballenger J, Dickson E, Kajita T, Ohashi H.** 1997. A phylogeny of the chloroplast gene *rbcl* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. *Am. J. Bot.* **84**:541.
16. **Provorov NA.** 1994. The interdependence between taxonomy of legumes and specificity of their interaction with rhizobia in relation to evolution of the symbiosis. *Symbiosis* **17**:183–200.
17. **Martínez-Romero E.** 2009. Controversies in Science Coevolution in Rhizobium-Legume Symbiosis? *DNA Cell Biol.* **28**:361–370.
18. **Spaank HP.** 1994. The molecular basis of the host specificity of the Rhizobium bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**:81–98.
19. **Gage DJ.** 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:280–300.
20. **Gualtieri G, Bisseling T.** 2000. The evolution of nodulation. *Plant Mol. Biol.* **42**:181–194.
21. **Appleby CA.** 1984. Leghemoglobin and Rhizobium respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**:443–478.
22. **Fred E, Baldwin I ME.** 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants.
23. **Perret X, Staehelin C, Broughton WJ.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:180–201.
24. **Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA.** 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**:337–365.
25. **Woese CR.** 1987. Bacterial Evolution Background. *Microbiology* **51**:221–271.
26. **Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR.** 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**:4765–4774.
27. **Rappé MS, Giovannoni SJ.** 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:369–394.
28. **Emerson D, Rentz J a, Lilburn TG, Davis RE, Aldrich H, Chan C, Moyer CL.** 2007. A novel lineage of proteobacteria involved in formation of marine Fe-oxidizing microbial mat communities. *PLoS One* **2**:e667.
29. **Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C.** 2001. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**:948–950.

30. **Bontemps C, Elliott GN, Simon MF, Dos Reis Júnior FB, Gross E, Lawton RC, Neto NE, de Fátima Loureiro M, De Faria SM, Sprent JI, James EK, Young JPW.** 2010. Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. *Mol. Ecol.* **19**:44–52.
31. **Yanagi M, Yamasato K.** 1993. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**:115–120.
32. **Sillman CE, Casida LE.** 1986. Isolation of non-obligate bacterial predators from soil. *Can. J. Microbiol.* **32**:760–762.
33. **Chen WM, Laevens S, Lee TM, 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1729–1735.
34. **Barrett CF, Parker MA.** 2005. Prevalence of Burkholderia sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**:57–65.
35. **Barrett CF, Parker MA.** 2006. Coexistence of Burkholderia, Cupriavidus, and Rhizobium sp. nodule bacteria on two Mimosa spp. in Costa Rica. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:1198–1206.
36. **Andam CP, Mondo SJ, Parker MA.** 2007. Monophyly of nodA and nifH genes across Texan and Costa Rican populations of Cupriavidus nodule symbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:4686–4690.
37. **Da Silva K, Florentino LA, da Silva KB, de Brandt E, Vandamme P, de Souza Moreira FM.** 2012. Cupriavidus necator isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. *Syst. Appl. Microbiol.* **35**:175–82.
38. **Ochman H, Moran NA.** 2001. Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* **292**:1096–1099.
39. **Boucher Y, Nesbø CL, Doolittle WF.** 2001. Microbial genomes: Dealing with diversity. *Curr. Opin. Microbiol.*
40. **Hacker J, Carniel E.** 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep.* **2**:376–381.
41. **Young JP, Johnston AW.** 1989. The evolution of specificity in the legume-rhizobium symbiosis. *Trends Ecol. Evol. (Personal Ed.)* **4**:341–349.
42. **Parker MA.** 1999. Mutualism in Metapopulations of Legumes and Rhizobia. *Am. Nat.*

43. **Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA.** 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:417–426.
44. **Rangin C, Brunel B, Cleyet-Marel J-C, Perrineau M-M, Béna G.** 2008. Effects of *Medicago truncatula* genetic diversity, rhizobial competition, and strain effectiveness on the diversity of a natural sinorhizobium species community. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:5653–61.
45. **Sullivan JT, Trzebiatowski JR, Cruickshank RW, Gouzy J, Brown SD, Elliot RM, Fleetwood DJ, McCallum NG, Rossbach U, Stuart GS, Weaver JE, Webby RJ, De Bruijn FJ, Ronson CW.** 2002. Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J. Bacteriol.* **184**:3086–3095.
46. **Elliott GN, Chou J, Chen W, Bloemberg G V, Bontemps C, Martínez-Romero E, Velázquez E, Young JPW, Sprent JI, James EK.** 2009. *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. *Environ. Microbiol.* **11**:762–778.
47. **Paau AS, Bloch CB, Brill WJ.** 1980. Developmental fate of *Rhizobium meliloti* bacteroids in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* **143**:1480–1490.
48. **Aguilar OM, Riva O, Peltzer E.** 2004. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:13548–13553.
49. **Ríos CF, Platero RA, Fabiano E.** 2013. Una aproximación molecular al estudio de simbioses de leguminosas nativas presentes en el área protegida Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay. SOCLA-Perú (in press).
50. **IIBCE-MEC.** <http://www.iibce.edu.uy/BIOGEM/lineasdeinvestigacion2.3.htm>.
51. **Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K.** 1994. *Current protocols in molecular biology*. JohnWiley Sons, New York.
52. **Lane DJ.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115–175. *In* *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*.
53. **Poly F, Ranjard L, Nazaret S, Gourbière F, Monrozier LJ.** 2001. Comparison of *nifH* gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2255–2262.
54. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403–410.
55. **Pruesse E, Peplies J, Glöckner FO.** 2012. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* **28**:1823–9.

56. **Saitou N, Nei M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406–425.
57. **Felsenstein J.** 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**:368–376.
58. **Hedges SB.** 1992. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Mol. Biol. Evol.*
59. **Vincent JM.** 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *A Man. Pract. study root-nodule Bact.*
60. **Taulé C, Zabaleta M, Mareque C, Platero R, Sanjurjo L, Sicardi M, Frioni L, Battistoni F, Fabiano E.** 2012. New betaproteobacterial *Rhizobium* strains able to efficiently nodulate *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**:1692–700.
61. **Lammel DR, Cruz LM, Carrer H, Cardoso EJB.** 2013. Diversity and symbiotic effectiveness of beta-rhizobia isolated from sub-tropical legumes of a Brazilian Araucaria Forest. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**:2335–42.
62. **Hardy RWF, Holsten RD, Jackson EK, Burns RC.** 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* **43**:1185–1207.
63. **Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenberg M, Vorholter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh KC, Batut J.** 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**:668–672.
64. **Delamuta, JR; Ribeiro, RA; Ormeño-Orrillo, E; Melo, IS; Martínez-Romero, E; Hungria M.** 2013. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* **63**:3342–3351.
65. **Rivas R, Willems A, Palomo JL, García-Benavides P, Mateos PF, Martínez-Molina E, Gillis M, Velázquez E.** 2004. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**:1271–5.

66. **Leblanc HA, McGraw RL, Nygren P, Roux C Le.** 2005. Neotropical Legume Tree *Inga edulis* forms N₂-fixing symbiosis with fast-growing *Bradyrhizobium* strains. *Plant Soil*.
67. **Wang R, Chang YL, Zheng WT, Zhang D, Zhang XX, Sui XH, Wang ET, Hu JQ, Zhang LY CW.** 2013. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. *Syst Appl Microbiol* **36**:101–105.
68. **Reeve W, De Mayer S, Terpolilli J, Melino V, Kyripides N.** 2013. Genome sequence of the *Ornithopus* / *Lupinus*-nodulating *Bradyrhizobium* sp. strain WSM471. *Stand. Genomic Sci.* **9**:254–263.
69. **Van Berkum P, Leibold JM, Eardly BD.** 2006. Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsch and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.). *Syst. Appl. Microbiol.* **29**:207–215.
70. **Giraud E, Fleischman D, Tropicales S, Ta J.** 2004. Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes 115–130.
71. **Chang YL, Wang JY, Wang ET, Liu HC, Sui XH, Chen WX.** 2011. *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**:2496–502.
72. **Doignon-Bourcier F, Willems A, Coopman R, Laguerre G, Gillis M, de Lajudie P.** 2000. Genotypic Characterization of *Bradyrhizobium* Strains Nodulating Small Senegalese Legumes by 16S-23S rRNA Intergenic Gene Spacers and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprint Analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:3987–3997.
73. **Zhang YF, Wang ET, Tian CF, Wang FQ, Han LL, Chen WF, Chen WX.** 2008. *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium yuanmingense* and *Bradyrhizobium japonicum* are the main rhizobia associated with *Vigna unguiculata* and *Vigna radiata* in the subtropical region of China. *FEMS Microbiol. Lett.* **285**:146–54.
74. **Aserse AA, Räsänen LA, Aseffa F, Hailemariam A, Lindström K.** 2012. Phylogenetically diverse groups of *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Crotalaria* spp., *Indigofera* spp., *Erythrina brucei* and *Glycine max* growing in Ethiopia. *Mol. Phylogenet. Evol.* **65**:595–609.
75. **Maria de Souza Moreira F, Cruz L, Miana de Faria S, Marsh T, Martínez-Romero E, de Oliveira Pedrosa F, Maria Pitard R, Peter W Young J.** 2006. *Azorhizobium doebereineriae* sp. Nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**:197–206.

76. **Estrella MJ, Muñoz S, Soto MJ, Ruiz O, Sanjuán J.** 2009. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:1088–98.
77. **Sotelo M, Irisarri P, Lorite MJ, Casaretto E, Rebuffo M, Sanjuán J, Monza J.** 2011. Diversity of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* grown in northern and southern regions of Uruguay. *Appl. Soil Ecol.* **49**:197–207.
78. **De Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira F, Molouba F, Hoste B, Torck U, Neyra M, Collins MD, Lindstrom K, Dreyfus B, Gillis M.** 1998. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**:369–382.
79. **Weir BS, Turner SJ, Silvester WB, Park D-C, Young JM.** 2004. Unexpectedly diverse *Mesorhizobium* strains and *Rhizobium leguminosarum* nodulate native legume genera of New Zealand, while introduced legume weeds are nodulated by *Bradyrhizobium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5980–7.
80. **Drouin P, Prévost D, Antoun H.** 1996. Classification of bacteria nodulating *Lathyrus japonicus* and *Lathyrus pratensis* in northern Quebec as strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:1016–24.
81. **Tian CF, Wang ET, Wu LJ, Han TX, Chen WF, Gu CT, Gu JG, Chen WX.** 2008. *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**:2871–2875.
82. **Yang H-C, Im W-T, Kim KK, An D-S, Lee S-T.** 2006. *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:453–7.
83. **Ritz K, Black HIJ, Campbell CD, Harris J a., Wood C.** 2009. Selecting biological indicators for monitoring soils: A framework for balancing scientific and technical opinion to assist policy development. *Ecol. Indic.* **9**:1212–1221.
84. **Kuever JFAR, Widdel F.** 2006. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, the Proteobacteria. Part C, the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria.*, p. 922–1143. *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, the Proteobacteria. Part C, the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria.*
85. **Gehlot HS, Tak N, Kaushik M, Mitra S, Chen W-M, Poweleit N, Panwar D, Poonar N, Parihar R, Tak A, Sankhla IS, Ojha A, Rao SR, Simon MF, Reis Junior FB Dos, Perigolo N, Tripathi AK, Sprent JI, Young JPW, James EK, Gyaneshwar P.** 2013. An invasive *Mimosa* in India does not adopt the symbionts of its native relatives. *Ann. Bot.* **112**:179–96.
86. **Wang ET, Rogel MA, Garcia-de los Santos A, Martinez-Romero J, Cevallos MA, Martínez-Romero E.** 1999. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **49**:1479–1491.

87. **Frioni L.** 2006. Microbiología. Básica, ambiental y agrícola. Universidad de la República, Montevideo.
88. **Yi-peng W.** 2010. Phenotype Diversities of Rhizobia Isolated from *Mimosa pudica* in Yunnan Dehou Area. *J. Anhui Agric. Sci.* **16**:114.
89. **Mishra RPN, Tisseyre P, Melkonian R, Chaintreuil C, Miche L, Klonowska A, Gonzalez S, Bena G, Laguerre G, Moulin L.** 2012. Genetic diversity of *Mimosa pudica* rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia. *FEMS Microbiol. Ecol.* **79**:487–503.
90. **Liu XY, Wu W, Wang ET, Zhang B, Macdermott J, Chen WX.** 2010. Phylogenetic relationships and diversity of beta-rhizobia associated with *Mimosa* spp. grown in Sishuangbanna, China. *Int J Syst Evol Microbiol.*
91. **Liu X, Wei S, Wang F, James EK, Guo X, Zagar C, Xia LG, Dong X, Wang YP.** 2012. *Burkholderia* and *Cupriavidus* spp. are the preferred symbionts of *Mimosa* spp. in southern China. *FEMS Microbiol. Ecol.* **80**:417–26.
92. **Melkonian R, Moulin L, Béna G, Tisseyre P, Chaintreuil C, Heulin K, Rezkallah N, Klonowska A, Gonzalez S, Simon M, Chen W-M, James EK, Laguerre G.** 2013. The geographical patterns of symbiont diversity in the invasive legume *Mimosa pudica* can be explained by the competitiveness of its symbionts and by the host genotype. *Environ. Microbiol.*