

Recursos genéticos argentinos: Caracterización de microsimbiontes nativos de *Macropitium erythroloma* (Mart. ex Benth.) y *Macropitium lathyroides* (L.) Urban.

Zuber, Nicolás E.¹; Fornasero, Laura V²; Toniutti, María A.²

¹ autor; ² orientador

nezuber@gmail.com; lfornase@fca.unl.edu.ar; antonieta762@hotmail.com

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional del Litoral

Resumen

El empleo de leguminosas nativas asociadas a gramíneas, es un recurso eficiente para mantener el suelo con buen nivel de fertilidad. El aporte de nitrógeno, a través de la Fijación Biológica de Nitrógeno por rizobios en asociación simbiótica con leguminosas, podría disminuir el uso de fertilizantes, sumado a que las leguminosas forrajeras son la fuente principal de nitrógeno de la dieta animal en la zona ganadera del centro-norte de la Argentina, contribuyendo así, en la digestibilidad y balance nutricional del forraje ofrecido. Este trabajo se ha centrado en el estudio, análisis y caracterización fenotípica y genotípica, de cepas autóctonas de rizobios noduladores de *Macropitium erythroloma* y *Macropitium lathyroides*. Se utilizaron nódulos colectados de las raíces de *M. erythroloma* y *M. lathyroides*, de dos suelos con diferentes características química y aptitudes de uso. A partir de ellos se aislaron las cepas simbiontes y se realizaron los análisis de caracterización fenotípica sometidos a diferentes estreses abióticos. La estructura genómica de los rizobios fue examinada a través de huellas digitales de ADN por métodos de PCR, empleando secuencias conservadas de bacterias. Se han hallado rizobios noduladores de *M. erythroloma* y *M. lathyroides* con capacidades de crecimiento a 40°C, pH 9, 1%p/v de NaCl y diversas concentraciones y tipos de antibióticos. La caracterización genotípica permitió descubrir un germoplasma muy diverso en la colección. La biodiversidad hallada de rizobios noduladores de *M. erythroloma* y *M. lathyroides* junto con su tolerancia a la acción de diversos factores abióticos, constituyen una herramienta fundamental para la selección de nuevas cepas para la producción de biofertilizantes.

Palabras clave: Fenotipo, Genotipo, *Macropitium erythroloma*, *Macropitium lathyroides*, Rizobios.

Introducción

El aporte de nitrógeno a través de la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) por rizobios en asociación simbiótica con leguminosas, podría disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados que generalmente son costosos y de baja eficiencia. Las leguminosas forrajeras nativas presentan un gran potencial de producción, sin embargo, el desconocimiento sobre distintos aspectos ha sido una de las causas del escaso desarrollo que han tenido los planes de domesticación y mejoramientos en el país. La producción ganadera del centro-norte del a Argentina utiliza el forraje proveniente de pastizales naturales, pasturas cultivadas y verdeos estacionales. En estos, las leguminosas son la fuente principal de nitrógeno de la dieta animal, contribuyendo en la digestibilidad y balance nutricional del forraje ofrecido (Chestnut y Lowe, 1970).

Por otro lado, la ganadería se esta desplazando hacia zonas cada vez mas marginales donde las especies leguminosas forrajeras disponibles y adaptadas a esas condiciones son escasas. Una alternativa validad es la introducción de especies leguminosas nativas con reconocido potencias forrajero, asociadas a los rizobios adaptados a esas regiones agroecológicas. Existen especies promisorias para tal fin como las del género *Macroptilium* (Pensiero y Zabala, 2017), el cual contiene dieciocho especies americanas, de las

cuales nueve crecen en Argentina. (Drewes, 1997), encontrándose presente en las selvas subtropicales misionera y tucumano-boliviana, en las sabanas del Parque Chaqueño y del Mesopotámico, llegando su limite de distribución, hacia el Sur, hasta el Norte de la provincia de Buenos Aires (Drewes, 1995). Entre ellas, *Macroptilium erythroloma* (Mart. Ex Benth) y *Macroptilium lathyroides* (L.) Urban. Abundan en la zona del noroeste argentino, en las regiones fitogeográficas Paranaense, Yungas y Chaqueña (Juarez y Perez, 1987). La distribución de *M. erythroloma* y *M. lathyroides* en Argentina se esquematiza en la Tabla 1.

Tabla 1: Distribución de *M. erythroloma* y *M. lathyroides* en Argentina. (Adaptado de Drewes, 1995).

Provincias	<i>M. erythroloma</i>	<i>M. lathyroides</i>
Jujuy	X	X
Salta	X	X
Formosa	X	X
Tucumán	X	
Chaco	X	X
Misiones	X	
Sgo. del Estero		
Catamarca		
Corrientes	X	X
Santa Fe	X	X
Córdoba	X	
Entre Ríos		
Buenos Aires		

Referencias: X: Presencia en dicha provincia.

Ambas especies son plantas herbáceas, anuales o perennes, de ciclo primavero-estivo-otoñal (Covas, 1978; Pensiero y Zabala, 2017). Crecen en climas con una marcada estación seca (invierno-

primavera, veranos lluviosos con un rango de precipitación entre 500 y 1900 mm por año e inviernos con temperaturas bajas (Martin *et al.*, 2012). *M. erythroloma* es una especie que se destaca por su capacidad de producción y vigor para el rebrote (Fernández, Benítez, Pizzio y Pallares 1988). Fragmentos de una planta de *M. erythroloma*, se pueden observar en la Figura 1.

Figura 1: Fragmentos de planta de *Macroptilium erythroloma* (Mart. ex Benth.) Urb. (Adaptado de Snak *et al.*, 2011).



M. lathyroides se caracteriza por ser una especie muy palatable y tener buena resiembra, Las características morfológicas mas relevantes se pueden apreciar en la Figura 2.

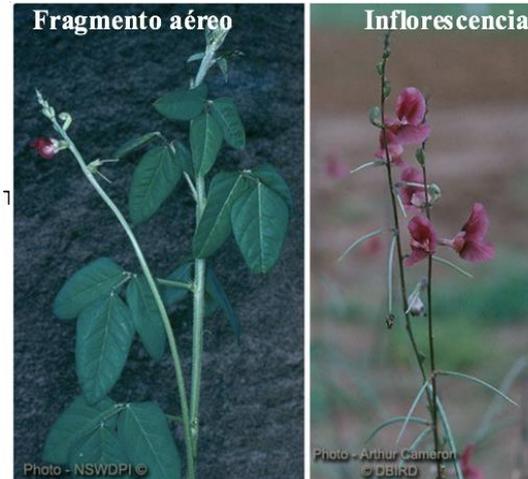


Figura 2: Fragmentos de planta de *Macroptilium lathyroides* (L) Urban. (Adaptado de Tropical Forrajes. Cook *et al.*, 2005).

Un factor determinante en el establecimiento exitoso de leguminosas forrajeras es una efectiva FBN a través de la simbiosis con rizobios noduladores (Cooper, 1977). Esta asociación biológica se caracteriza por generar un beneficio mutuo, en la cual, la bacteria recibe carbohidratos a cambio de amonio proveniente de la fijación de nitrógeno atmosférico. Esta característica es de gran importancia ya que el nitrógeno es el elemento mineral de mayor necesidad para los cultivos (y con mayor déficit en muchos suelos). Dentro de los microorganismos de suelo se encuentran las bacterias que forman nódulos en las raíces de las leguminosas. Estas bacterias son las comúnmente conocidas como “Rizobios”, que en presencia de una leguminosa producen el fenómeno de simbiosis rizobio- leguminosa (Pascual, 2008). La FBN proporciona alrededor del 70% de todo el nitrógeno requerido en los ecosistemas naturales y agroecosistemas (Burns y Hardy, 1995). Esta fijación funciona en

bacterias adaptadas a diferentes ambientes ecológicos y estilos de vida muy diversos, sin embargo, todas poseen la misma enzima responsable de la reducción del nitrógeno, la “Nitrogenasa” (Zahran, 199). Ésta les permite la reducción del nitrógeno molecular atmosférico (N_2) hasta la forma asimilable de amonio (NH_4^+) (Mayz, 2004). Con la llegada de la revolución verde, se perdió de forma paulatina la necesidad de utilizar los rizobios como fertilizantes. No obstante, la necesidad de alimentar a una población cada vez mas abundante ha ocasionado el empleo masivo de fertilizantes químicos que, junto a plaguicidas y herbicidas, ha resultado en la contaminación de aguas y sedimentos, erosión de los suelos, e incluso daños a la salud humana. Esta situación ha ocasionado el auge de la agricultura biológica que trata de prescindir al máximo de cualquier producto químico, lo que ha revitalizado tanto el interés en la rotación de cultivos como las practicas de inoculación (Ramírez-Bahena, 2016). La búsqueda de nuevas alternativas que ayuden a disminuir los costos de producción agropecuarios, cuidar el medio ambiente y lograr un desarrollo sustentable, motiva a estudiar la posibilidad de utilizar el potencial que tienen las bacterias que nodulan las raíces de las leguminosas. Así, el relevamiento de las poblaciones de rizobios presentes en los suelos, constituirá una valiosa herramienta para el estudio y selección de posibles

cepas inoculantes que luego podrían ser usadas en suelos de la región. En este contexto y con el propósito de avanzar en diversos aspectos sobre la relación entre los rizobios y plantas del género *Macroptilium*, se ha enfocado el estudio en el análisis y caracterización fenotípica y genotípica de las cepas autóctonas de rizobios noduladores *Macroptilium erythroloma* y *Macroptilium lathyroides*.

Objetivos

Objetivo general:

- Caracterizar fenotípica y genotípicamente los rizobios noduladores de *Macroptilium erythroloma* y *Macroptilium lathyroides*.

Objetivos específicos:

- Establecer una colección de rizobios noduladores.
- Realizar una caracterización fenotípica de los aislamientos obtenidos.
- Analizar la tolerancia de las cepas a diferentes estreses abióticos.
- Estudiar la biodiversidad genética de los rizobios simbioses.

Materiales y Métodos

La colección de microsimbiontes se estableció mediante el aislamiento de rizobios de nódulos radiculares de plantas trampa (plantas cultivadas en ensayos de laboratorio e inoculadas con muestras de suelo). A partir de los ensayos en cámara de cre-

cimiento en condiciones controladas (28°C de temperatura, fotoperiodo de 16/8hs luz/oscuridad), se colectaron nódulos de *M. erythroloma* y *M. lathyroides*, empleando suelos provenientes de las localidades de General Obligado, provincia de Santa Fe (28°18'S, 59°16'W) y Santo Tomé, provincia de Corrientes (28°07'S, 56°03'W), ambos con buena aptitud potencial para el cultivo de estas leguminosa. Los suelos utilizados presentaron diferentes aptitudes de uso y características: General Obligado, pertenece a la Región Fitogeográfica Chaqueña, Distrito Oriental, con suelos alfisoles. En cambio, Santo Tomé, se ubica en la Región Fitogeográfica Paranaense, Distrito de Los Campos, con suelos ultisoles. Las Provincias Fitogeográficas presentan un clima cálido subtropical sin estación seca, con una temperatura media anual superior a 20°C y abundantes precipitaciones.

Para los ensayos se utilizó el cv. Don Augusto de *M. erythroloma* y cv. Mancebo de *M. lathyroides* como "plantas trampa". Las semillas fueron escarificadas manualmente con lija, desinfectadas y germinadas en placas de Petri con agar-agua 1% (p/v) a 28°C. Al cabo de un tiempo, las semillas que presentaron una radícula de 10 a 15mm de longitud se colocaron en macetas con vermiculita estéril y suelo, en relación 5:1. Las plántulas permanecieron en cámara de cultivo durante 60 días y se regaron periódicamente con agua estéril.

Los nódulos colectados fueron desinfectados superficialmente con alcohol 95° por un minuto, agua oxigenada (30 vol.) a lo largo de 3 a 4 minutos, lavados 5 veces con agua destilada estéril, macerados y los rizobios contenidos en su interior, fueron aislados en medio LMA (Extracto de levadura con Rojo Congo) e incubados a 28°C (Vincent, 1970). Las observaciones se realizaron repicando cada dos días las colonias típicas de rizobios hasta obtener cultivos puros (CIAT, 1988). Las cepas obtenidas de los aislamientos, fueron confirmadas mediante pruebas de infectividad, por su habilidad para formar nódulos en la planta huésped (Vincent, 1970). Posteriormente, las cepas de rizobios aisladas y confirmadas, fueron conservadas en tubos eppendorf con caldo LMA + glicerol en freezer a -20°C.

La caracterización fenotípica de los rizobios, se realizó por métodos de morfología de colonia, velocidad de crecimiento y microscópicas (forma, agrupamiento y respuesta a la coloración diferencial de Gram) (CIAT, 1988). La tolerancia de las cepas a diferentes condiciones de estrés abióticos se evaluó a través del crecimiento y desarrollo en medios de cultivos con diferentes niveles de pH, incubaciones a distintas temperaturas y diferentes contenidos de sal. Para evaluar la resistencia intrínseca a antibióticos, se sembraron los aislados en medio LMA con adición de los siguientes antibióticos: am-

picilina (20 y 40 ug/ml), kanamicina (10 y 40 ug/ml), gentamicina (5 y 20 ug/ml) y estreptomicina (20 y 100 ug/ml). En todos los estudios se utilizó como parámetro un tratamiento control que consistió en la incubación de las cepas en condiciones óptimas de crecimiento (pH 7, 28°C y 0,01% p/v de NaCl) y cinco cepas de referencia: *Bradyrhizobium liaoningense* USDA 3622T, *Bradyrhizobium elkani* USDA 76T, *Bradyrhizobium yuanmingense* CCBAU10 071T, *Esifer fredii* USDA 205T y *Rizobium tropici* CIAT 899T.

La caracterización genotípica de los rizobios se llevó a cabo a través del análisis de los productos de amplificación de ADN total de los aislamientos, usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las preparaciones y manipulaciones de las muestras de ADN se realizaron según las técnicas descriptas por Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989). La estructura genómica de los rizobios fue examinada a través de las huellas digitales (*fingerprintings*) de ADN. Los *fingerprints* de ADN total se realizaron con el cebador BOXA1R (Versalovic, Schneider, De Bruijin y Lupski, 1994). La composición de la mezcla de reacción utilizada fue: 50 mM Tris-HCl (pH 8,3); 3 mM MgCl₂, 200 uM dNTPS; 1 U Taq DNA polimerasa (Promega Corp.) y 10 uM del cebador BOXA1R completando un volumen final de mezcla de reacción de 25 ul. Las condiciones de ciclado empleadas fueron: un

ciclo de desnaturalización inicial a 94°C 7 minutos y 30 ciclos de desnaturalización a 94°C 10 segundos, *annealing* a 52°C 60 segundos y elongación a 72°C 2 minutos. Al finalizar las reacciones de PCR, 10 ul de cada uno de los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (De Bruijin, 1991; Judd, Schneider, Sadowsky y De Bruijin, 1993; Versalovic *et al.*, 1994). Se emplearon como referencia las cepas: *B. Elkani* USDA 76T, *B. yuanmingense* CCBAU 10071T y *B. japonicum* E109.

Para el análisis de los resultados fenotípicos, se construyó un dendograma con las cepas estudiadas, el cual demostró la separación de diversos grupos metabólicos. Se generó también una tabla que expone las principales características fenotípicas de cada microsimbionte estudiado. Para el análisis de los productos de amplificación de PCR, obtenidos con el ADN total de las cepas, se estableció la presencia "1" o ausencia "0" de bandas de cada individuo analizado. Los datos fueron utilizados para generar un dendograma (UPGMA y coeficiente de similitud Dice). Se utilizaron los software Cross Checker (para la construcción de la matriz binaria), FAMD (Schulter y Herris, 2006) y MEGA 4.0 (Tamura, Dudley, Nei y Kumar, 2007).

Resultados y Discusión

Se obtuvieron nódulos radicales de color marrón rojizo en su interior, lo cual permitió considerarlos como posibles fijadores,

en coincidencia con Marquina, González y Castro (2012). Además, dichos nódulos evidenciaron que en suelos de las Provincias Fitogeográficas Paranaense y Chaqueña, con características edáficas distintas y naturaleza química diferente, se encuentran poblaciones de rizobios simbiotes de *M. erythroloma* y *M. lathyroides*.

A partir de los aislamientos realizados, se conformó una colección de 32 aislamientos nodulares de *M. erythroloma*, 18 recuperados de Corrientes (MeC) y 14 de Santa Fe (MeSF), y 19 aislamientos simbiotes de *M. lathyroides*, 9 de Corrientes (MIC) y 10 de Santa Fe (MISF). Mediante la tinción de Gram se observó que la morfología de las células se correspondía con la descripción de bacterias que forman nódulos con leguminosas en el *Phylum B12 Proteobacteria* (Garrity, Bell y Lilbrun, 2005). Se observaron bacilos finos, Gram negativos y sin presencia de esporas. Las colonias de *M. erythroloma* y *M. lathyroides* se caracterizaron por ser menores a 1 mm, circulares, con bordes regulares y lisos, colores rosa blanquecinos o de color naranja traslucido. El aspecto de las colonias se ajustó a los fenotipos descritos por Fuhrmann (1990), para Bradyrhizobios simbiotes de soja. Las cepas presentaron crecimiento lento y muy lento, siendo el tiempo de aparición de las colonias 5-6 y 7-9 días respectivamente. Toniutti et al. (2015), obtuvieron resultados similares en referencia a la velocidad de crecimiento

de rizobios simbiotes de *M. atropurpureum* y *M. bracteatum*. Los aislamientos de la colección presentaron una morfología y tasa de crecimiento características del género *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984).

En particular, las bacterias simbiotes de *M. erythroloma* presentaron crecimiento óptimo en pH de 5 a 8. Los aislamientos recuperados de suelos de Santa Fe mostraron una buena aptitud de crecimiento a altas temperaturas, ya que el 57% pudo crecer a 37°C y 3 cepas a 40°C. Según Giongo et al. (2010), la tolerancia a altas temperaturas podría ser útil en la selección de rizobacterias tolerantes a temperaturas oscilantes en condiciones de campo. El NaCl es considerado un buen indicador de la tolerancia al estrés salino por parte de las bacterias (Abdelmoumen, Neyra y Belabed, 1999).

En el presente trabajo, la mitad de los aislados de Santa Fe toleró 0,5% de NaCl, mientras que el 16% de las cepas de Corrientes pudieron crecer a esa concentración. En relación a la resistencia intrínseca a antibióticos, las cepas manifestaron resistencia a diferentes concentraciones de ampicilina y gentamicina. Cabe destacar que el 70% de los aislados de Santa Fe fueron resistentes a kanamicina (10 ug/ml) y la cepa MeSF 2.6 también mostró resistencia a estreptomycin (20 y 100 ug/ml).

Las principales características fenotípicas manifestadas por los simbioses de *M. erythroloma* se resumen en la tabla 3.

Tabla 3: Crecimiento de bacterias simbioses de *M. erythroloma* frente a diferentes estreses abióticos, en comparación a un control en condiciones de crecimiento óptimas. Referencias: 3: Crecimiento óptimo; 2: C. bueno; 1: C. escaso; 0: C. nulo. a: Cepas utilizadas.

Cepas ^a	Crecimiento a la temperatura indicada (°C)					Crecimiento al nivel de pH indicado					Crecimiento a la concentración de NaCl (% p/v) indicada							
	28°	33°	35°	37°	40°	45°	4	5	6	7	8	9	10	0,01	0,5	1	2	3
MeC1.1	3	3	2	1	0	0	0	3	3	3	2	0	0	3	1	0	0	0
MeC1.2	3	3	2	1	0	0	0	3	3	3	3	2	1	3	2	2	1	0
MeC1.3	3	2	2	1	0	0	1	3	3	3	3	1	0	3	0	0	0	0
MeC2.1	3	3	1	0	0	0	1	3	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
MeC2.3	3	1	0	0	0	0	1	3	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
MeC3.1	3	2	2	1	0	0	0	3	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
MeC3.2	3	2	0	0	0	0	0	3	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0
MeC4.2	3	1	1	0	0	0	1	3	3	3	1	0	0	3	0	0	0	0
MeC5.1	3	1	1	0	0	0	0	3	3	3	2	1	0	3	0	0	0	0
MeC5.2	3	1	0	0	0	0	0	3	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
MeC5.3	3	3	2	1	0	0	1	3	3	3	3	1	0	3	1	1	0	0
MeC6.2	3	1	0	0	0	0	1	3	3	3	3	1	0	3	0	0	0	0
MeC6.3	3	1	0	0	0	0	0	3	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
MeC7.2	3	2	2	1	0	0	0	3	3	3	2	2	0	3	2	2	1	0
MeC8.1	3	2	0	0	0	0	0	3	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
MeC8.2	3	3	2	1	0	0	0	3	3	3	3	2	0	3	2	2	0	0
MeC9.2	3	2	0	0	0	0	0	3	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0
MeC9.3	3	3	2	1	0	0	0	3	3	3	2	0	0	3	1	0	0	0
MeS1.2	3	3	3	1	1	0	1	3	3	3	2	0	0	3	1	0	0	0
MeS1.6	3	3	3	1	1	0	1	3	3	3	2	0	0	3	1	0	0	0
MeS2.2	3	3	3	2	2	0	1	3	3	3	2	0	0	3	3	2	1	0
MeS2.5	3	3	3	1	0	0	1	3	3	3	2	0	0	3	2	0	0	0
MeS2.6	3	3	3	3	2	0	1	3	3	3	2	1	1	3	3	2	1	0
MeS2.8	3	3	3	2	1	0	1	3	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0
MeS3.2	3	3	3	3	3	1	1	3	3	3	2	1	0	3	1	0	0	0
MeS3.3	3	3	3	1	0	0	0	3	3	3	2	0	0	3	2	0	0	0
MeS3.5	3	3	3	2	0	0	1	3	3	3	2	2	1	3	2	1	0	0
MeS3.6	3	3	3	1	0	0	1	3	3	3	2	0	0	3	2	0	0	0
MeS3.7	3	3	3	2	1	0	1	3	3	3	2	0	0	3	2	2	1	0
MeS3.8	3	3	3	2	1	0	1	3	3	3	2	2	0	3	1	0	0	0
MeS4.2	3	3	2	1	1	0	1	3	3	3	3	0	0	3	2	0	0	0
MeS4.4	3	3	3	1	0	0	1	3	3	3	2	0	0	3	1	0	0	0

El análisis estadístico permitió generar un dendograma y reconocer 6 grupos principales de actividad metabólica, el grupo I incluyó la cepa de referencia *R. tropici*, de crecimiento rápido, tolerante pH ácido. El grupo II compuesto por 12 aislamientos de Corrientes, se caracterizó por crecer en pH 5 a 8 y no toleraron concentraciones de NaCl superiores a 0,01 g/L. El grupo III incluyó la cepa *E. fredii* y dos aislamientos que crecieron a 35°C, pH 5 a 9 y 1% de

NaCl. El grupo IV representado por dos cepas de Santa Fe y una de Corrientes, toleraron 40°C y 1% de NaCl. El grupo V incluyó 15 cepas nativas de características intermedias. El grupo VI integrado por las tres cepas de referencia *B. elkani*, *B. liaoningense* y *B. yuanmingense*, de crecimiento lento, sensibles a pH extremos y salinidad.

Las bacterias simbioses de *M. lathyroides* presentaron crecimiento óptimo en un rango de pH 6 a 8, aunque se observó diversidad de crecimiento a pH extremos en los aislamientos correspondientes a Santa Fe, donde el 30% de las mismas pudieron crecer a pH 5 y 9. En el caso de las cepas procedentes del suelo de Corrientes, el 20% manifestó desarrollo a pH 5 y solo el 11% a pH 9. Con respecto al crecimiento en diferentes temperaturas, los aislamientos de Santa Fe evidenciaron tolerancia a altas temperaturas, ya que el 70% y el 60% de los simbioses pudieron crecer en temperaturas de 37°C y 40°C respectivamente, mientras que solo un 20% de los rizobios provenientes de Corrientes mostró desarrollo a 37°C. Se comprobó que las cepas de Corrientes presentan dificultades para crecer en concentraciones de sal elevadas. Por el contrario, en los aislamientos de Santa Fe, 3 cepas pudieron crecer a 0,5% p/v NaCl, dos simbioses a 1% p/v NaCl y una en particular lo hizo también a concentraciones de 2% y 3% p/v NaCl. Respecto a la

resistencia intrínseca a antibióticos, los rizobios noduladores de *M. lathyroides* manifestaron resistencia a diferentes concentraciones de ampicilina y gentamicina. Las principales características fenotípicas manifestadas por los simbioses de *M. lathyroides* se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Crecimiento de bacterias simbioses de *M. lathyroides* frente a diferentes estreses abióticos, en comparación a un control en condiciones de crecimiento óptimas. Referencias: 3: Crecimiento óptimo; 2: C. bueno; 1: C. escaso; 0: C. nulo. a: Cepas utilizadas.

Cepas ^a	Crecimiento a la temperatura indicada (°C)						Crecimiento al nivel de pH indicado						Crecimiento a la concentración de NaCl (% p/v) indicada							
	28°	33°	35°	37°	40°	45°	4	5	6	7	8	9	10	0,01	0,5	1	2	3		
MLC1.2	3	3	3	1	0	0	0	1	3	3	2	1	0	3	1	0	0	0		
MLC1.3	3	3	3	0	0	0	0	2	3	3	1	0	0	3	0	0	0	0		
MLC1.7	3	3	3	1	0	0	0	1	3	3	3	2	0	3	0	0	0	0		
MLC1.8	3	3	3	0	0	0	0	1	3	3	1	0	0	3	0	0	0	0		
MLC1.9	3	3	3	0	0	0	0	0	3	3	2	0	0	3	0	0	0	0		
MLC2.1	3	3	3	3	3	0	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0		
MLC2.3	3	3	3	1	0	0	0	0	3	3	3	1	0	3	0	0	0	0		
MLC2.5	3	3	3	2	1	0	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0		
MLC2.6	3	3	3	0	0	0	0	0	3	3	3	0	0	3	1	0	0	0		
MLS1.2	3	3	3	3	2	0	0	0	1	3	3	2	2	0	3	1	0	0	0	
MLS1.5	3	3	3	1	0	0	0	0	0	3	3	2	1	0	3	1	0	0	0	
MLS2.7	3	3	3	3	3	0	0	0	3	3	3	3	1	0	3	1	1	1	0	
MLS3.2	3	3	3	2	2	0	0	0	0	3	3	3	3	1	3	3	3	2	2	
MLS4.1	3	3	3	0	0	0	0	0	1	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0	
MLS4.3	3	3	3	0	0	0	0	0	1	3	3	1	1	0	3	1	0	0	0	
MLS4.7	3	3	3	3	2	0	0	0	1	3	3	1	0	0	3	2	2	0	0	
MLS6.3	3	3	3	2	2	0	0	0	0	3	3	3	1	1	0	3	2	0	0	0
MLS6.8	3	3	3	2	2	0	0	0	1	3	3	3	3	1	3	1	0	0	0	0
MLS9.1	3	3	3	3	1	0	0	0	2	3	3	1	0	0	3	1	1	0	0	0

Cabe resaltar que un aislamiento precedente de Corrientes expreso resistencia a las dos concentraciones de kanamicina evaluadas, sin presentar crecimiento en estreptomycin. De modo inverso, una cepa recuperada de Santa Fe manifestó crecimiento en distintas concentraciones de estreptomycin, pero sin evidenciar crecimiento en kanamicina.

El dendograma reveló 8 grupos metabólicos. Las bacterias nativas que conformaron el grupo I se caracterizaron especial-

mente por crecer a una temperatura extrema de 40°C, mientras que los simbioses del grupo V no manifestaron crecimiento a dicha temperatura. El grupo II y el grupo IV estuvieron constituidos cada uno por un solo aislamiento (cepas MISF 3.2 y MIC 1.7 respectivamente). En relación a estos dos últimos grupos, MISF 3.2 presentó crecimiento a 40°C, pH 9 y concentración de NaCl hasta 3%, en tanto MIC 1.7 es la única bacteria simbiote recuperada de Corrientes que presentó tolerancia a pH 9 y diversas concentraciones de kanamicina.

El análisis de la diversidad del germoplasma asociado a *M. erythroloma* y *M. lathyroides* se realizó a través de la generación de huellas digitales de ADN empleando como cebadores secuencias conservadas de bacterias (BOXA1R).

Los resultados obtenidos para los simbioses de *M. erythroloma* revelaron 8 tipos de perfiles de amplificación BOXA1R diferentes evidenciando una marcada diversidad genética entre los aislamientos. El dendograma con los perfiles formados se presenta en la Figura 3.

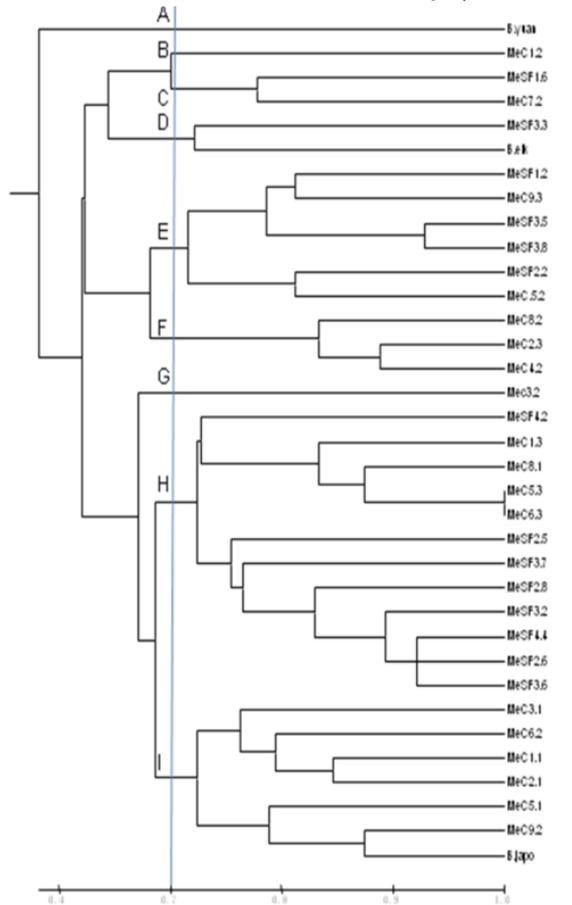


Figura 3: Análisis UPGMA realizado en base a la presencia-ausencia de bandas en los productos de amplificación BOXA1R de diferentes aislamientos noduladores de plantas de *M. erythroloma*. MeC: Aislamientos provenientes de Corrientes MeSF: Aislamientos provenientes de Santa Fe. Cepas de referencia: B. yuan: *B. yuanmingense*; B. elk: *B. elkani*; B. japo: *B. japonicum*.

El perfil tipo “H” está representado por 38% de las cepas recuperadas de Corrientes y Santa Fe, mientras que dos perfiles BOXA1R (tipo “B” y “G”) se hallan representados solo por un aislamiento precedente de Corrientes. La cepa de referencia *B. yuanmingense* mostró un perfil distinto a los observados en los aislamientos simbiotes de *M. erythroloma*. Los grupos restantes presentaron características intermedias.

El análisis de la diversidad genética de los rizobios noduladores de *M. lathyroides*, evidenció la separación de los aislamientos en 6 tipos de perfiles BOXA1R diferentes. El dendrograma de la Figura 4 manifiesta la separación en distintos perfiles del germoplasma de *M. lathyroides*.

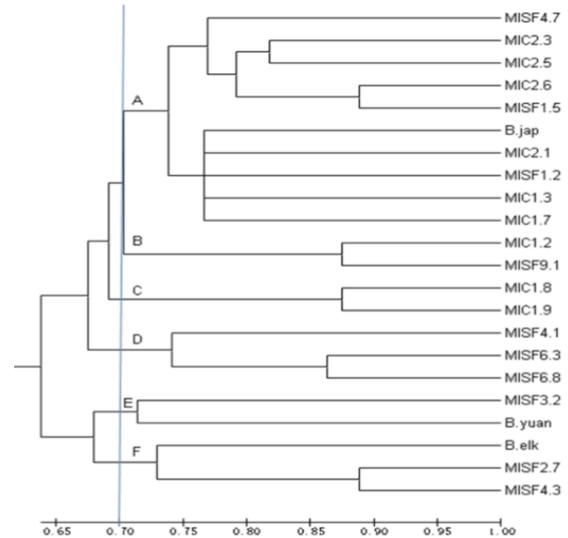


Figura 4: Análisis UPGMA realizado en base a la presencia-ausencia de bandas en los productos de amplificación BOXA1R de diferentes aislamientos noduladores de plantas de *M. lathyroides*. MIC: Aislamientos provenientes de Corrientes MISF: Aislamientos provenientes de Santa Fe. Cepas de referencia: B. yuan: *B. yuanmingense*; B. elk: *B. elkani*; B. japo: *B. japonicum*.

El perfil tipo “A” incluye el 47% de los aislamientos, mientras que 5 perfiles se hayan representados solo por una, dos o tres cepas simbiotes.

La marcada diversidad genética también ha sido hallada en germoplasma asociado a las leguminosas nativas *Desmanthus paspalaceus* (Fornasero et al., 2014) y *Desmodium incanum* (Toniutti et al., 2017), procedentes del centro y norte de nuestro país.

Los principales simbioses de *M. erythroloma* y *M. lathyroides* presentes en los suelos de Corrientes y Santa Fe que manifestaron características destacables se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: Aislamientos de rizobios noduladores de *M. Erythroloma* y *M. Lathyroides* con tolerancia destacada a condiciones de estrés abiótico de importancia agronómica.

Cepa de rizobio ¹	Tolerancia a la condición de estrés abiótico indicada			Perfil BOXA1R
	Temperatura 40°C	Nivel de pH 9	Concentración 1% p/v NaCl	
MeC1.2 MeC7.2 MeC8.2	- - -	+ + +	+ - +	B ² C ² F ²
MeSF2.2 MeSF2.6 MeSF3.2 MeSF3.5 MeSF3.7	+ + + - -	- - - + -	+ + - - +	E ² H ² H ² E ² H ²
MIC1.7 MIC2.1	- +	+ -	- -	A ³ A ³
MISF1.2 MISF2.7 MISF3.2 MISF4.7 MISF6.3 MISF6.8	+ + + + + +	+ - + - - +	- - + + - -	A ³ F ³ E ³ A ³ D ³ D ³

(+): Crecimiento óptimo. (-): Sin crecimiento

¹ Seleccionadas en base a su tolerancia al menos a un factor abiótico adverso.

² Tipos BOXA1R según las huellas genómicas en el análisis de los productos de amplificación de *M. erythroloma*.

³ Tipos BOXA1R según las huellas genómicas en el análisis de los productos de amplificación de *M. lathyroides*.

Aislamientos de *M. erythroloma*: MeC: aislamientos procedentes de Corrientes. MeSF: aislamientos provenientes de Santa Fe.

Aislamientos de *M. lathyroides*: MIC: aislamientos procedentes de Corrientes. MISF: aislamientos provenientes de Santa Fe.

Conclusiones

Al inicio del presente trabajo, hemos mencionado los problemas por los que atraviesa el sector ganadero y los efectos ecológicos atribuidos al sector agropecuario. Es evidente la creciente preocupación por la preservación en el mundo de los ecosistemas que habitamos y también de los que sacamos provecho. Es necesario forjar y aplicar prácticas agronómicas más respetuosas hacia el medio ambiente. Una

alternativa es prometedora es el aprovechamiento de las relaciones biológicas que se establecen entre leguminosas y rizobios, las cuales permiten prescindir de fertilizantes nitrogenados ajenos al sistema. En la búsqueda de microorganismos simbioses que realicen esa función, y además sean altamente eficientes y especializados, en este trabajo de investigación se hallaron cepas autóctonas, las cuales son huéspedes habituales de las raíces de *M. erythroloma* y *M. lathyroides*. Sobre la base de estas observaciones y consideraciones, en este trabajo se ha presentado una colección de rizobios noduladores, caracterizada fenotípica y genotípicamente. Estas caracterizaciones son fundamentales para perseguir los criterios polifásicos estándar de la taxonomía de bacterias en el futuro. Además son criterios valiosos como recurso para la búsqueda y selección de cepas eficientes en la fijación de nitrógeno, lo cual permitiría incrementar los programas de desarrollo de inoculantes bacterianos que estimulen la producción vegetal de *M. erythroloma* y *M. lathyroides*.

En las colecciones se han hallado cepas de rizobios noduladores de *M. erythroloma* y *M. lathyroides* agrónomicamente destacables, debido a las diferentes cualidades manifestadas en torno a la resistencia de estreses abióticos. La caracterización genotípica permitió separar los aislamientos recuperados en grupos de perfiles BO-

XA1R diferentes, los cuales constituyen un material interesante por la variabilidad encontrada en suelos de Argentina, como así también, ciertas cepas élites halladas podrían ser candidatas para programas de selección de rizobios inoculantes. De esta manera se verían beneficiadas zonas marginales para la producción forrajera, extendiendo así, las barreras de la producción acompañadas de un crecimiento sostenible a nivel medioambiental al disminuir las necesidades de aportes de nutrientes nitrogenados exógenos, estimulando la FBN y sumando las bondades del aumento cuantitativo de biomasa microbiana en el suelo, que posteriormente será transformada en fuente de materia orgánica y nitrógeno, mejorando y recuperando, en ciertos aspectos suelos con diferentes grados de degradación.

Bibliografía

- ABDELMOUMEN, H.; NEYRA, M. Y BELABED, A. 1999. Effect of high salts concentrations on the growth of rizobia and responses to added osmotica. J. Appl. Microbiol. 86: 889–898.
- BURNS, R.C. Y HARDY, R.W.F. 1975. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Mol. Biol. Biochem. Biophys. 21: 1-189.
- CHESTNUTT, D. Y LOWE, J. 1970. White clover research (LOWE, J. Ed.)

Ocasional Symp. N°6. British Grassl. Soc. Hurley, Maidenhead, UK. p.121-213.

- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (1988) Simbiosis leguminosa-rizobio. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. (Ed. Proyecto CIAT-UNDP). Cali, Colombia. 178 pp.
- COOK, B.G.; PENGELLY, B.C.; BROWN, S.D.; DONNELLY, J.L.; EAGLES, D.A.; FRANCO, M.A.; HANSON, J.; MULLEN, B.F.; PARTRIDGE, I.J.; PETERS, M. Y SCHULTZ-KRAFT, R. 2005. Forrajes tropicales: una herramienta de selección interactiva, CSIRO, DPI & F (Qld), CIAT e ILRI, Brisbane, Australia.
- COOPER, C.S. 1977. Growth of the legume seedling. Adv. Agron. 29: 119.
- COVAS, G. 1978. Forrajas indígenas: Especies que requieren un plan de conservación de germoplasma. Ciencia e Investigación 34: 209.
- DE BRUJIN, F. 1992. Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction to finger print the genomes of *Rizobium meliloti* Isolates and other Soil Bacteria. Appl. Envirom. Microbiol. 2180-2187.

- DREWES, S. 1997. El Género *Macroptilium* (*Fabaceae*) en la Flora Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 32: 195-216. Argentina.
- DREWES, S. 1995. Revisión de las especies argentinas del género *Macroptilium* (Benth.) Urban (*Leguminosae-Phaseolinae*). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- FERNÁNDEZ, J.G.; BENÍTEZ, C.A.; PIZZIO, R.F. Y PALLARES, O.R. 1988. Leguminosas forrajeras nativas del este de la provincia de Corrientes. Serie Técnica N° 26, EEA Mercedes del INTA, 86 p.
- FORNASERO, L.V.; DEL PAPA, M.F.; LÓPEZ, J.L.; ALBICORO, F.J.; ZABALA, J.M.; TONIUTTI, M.A.; PENSIERO, J.F. Y LAGARES, A. 2014. Phenotypic, Molecular and Symbiotic Characterization of the Rhizobial Symbionts of *Desmanthus paspalaceus* (Lindm.) Burkart That Grow in the Province of Santa Fe, Argentina. PLoS ONE 9 (8): e104636.
- FUHRMANN, J. 1990. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. Appl. Environ. Microb. 56 (1) 224–229.
- GARRITY, G.M.; BELL, J.A. Y LILBURN, T. 2005. The revised road map to the manual. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Ed. Vol. 2. The Proteobacteria. (Eds. Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley J.T. y Grrity G.M). Springer, N.Y.
- GIONGO, A.; BENEDUZI, A.; AMBROSONI, A.; KAYSER, L.; STROSCHEIN, M.R.; ELTZ, F. L.; BODANESE-ZNETTINI, M.H. Y PEREIRA L.M. 2010. Isolation and characterization of two plant growth-promoting bacteria from the rhizoplane of a legume (*Lupinus albus*) in sandy soil. Rev. Bras. Cienc. Solo.
- JORDAN, D.C. 1984. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (Eds. N.R. Krieg y J.G. Holt) Williams and Wilkins, Baltimore, EE.UU. p. 234 256.
- JUAREZ, F.C. Y PEREZ, S.M. 1987. El género *Macroptilium* (*Fabaceae*) en la Provincia de Salta, Argentina. Anales INTA Salta 1: 31-42.
- JUDD, A.K.; SCHNEIDER, M.; SADOWSKY, M.J. Y DE BRUJIN, F.J. 1993. Use of sequences and the Polymerase Chain Reaction Tech-

- nique to classify Genetically Related *Bradyrhizbium japonicum* Serocluster 123 Strains. Appl. Environ. Microbiol. 1702-1708.
- MARTÍN, M.D.C.; PÉREZ DE BIANCHI, S.M.; ETCHEVERRY, A.; CAMARDELLI, C.; ALEMÁN, M. Y FIGUEROA, T. 2012. Hábito de crecimiento y anatomía de la raíz en *Macroptilium erythroloma* y *Macroptilium bracteatum* (Fabaceae). Phytón (Buenos Aires), 81(2): 215-220.
- MARQUINA, M.E.; GONZÁLEZ, N.E. Y CASTRO, Y. 2011. Caracterización fenotípica y genotípica de doce rizobios aislados de diversas regiones geográficas de Venezuela. Revista de Biología Tropical. 59(3): 1017-1036.
- MAYZ, J. 2004. Fijación biológica de nitrógeno. UDO Agrícola, 4 (1): 15 p.
- MILFORD, R. 1967. Nutritive values and chemical composition of seven tropical legumes and lucerne grown in subtropical south-eastern Queensland. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry. 7: 540-545.
- PASCUAL, J.O. 2008. Fijación biológica de Nitrógeno. Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada. En: <http://www2.eez.csic.es/oivares/ciencia/fijacion/>. Acceso: 12/01/2018.
- PENSIERO, J. Y ZABALA, J. 2017. Recursos Fitogenéticos Forrajeros Nativos y Naturalizados para los Bajos Submeridionales: prospección y priorización de especies para planes de introducción a cultivo. FAVE Sección Ciencias Agrarias, 16 (1): 67-98.
- RAMÍREZ-BAHENA, M.; PEIX, Á.; VELÁZQUEZ, E. Y BEDMAR, E. 2016. Historia de la investigación en la simbiosis leguminosa-bacteria: una perspectiva didáctica. Arbor, 192 (779): 319.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. Y MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCHLUTER, P.M. Y HARRIS, S.A. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. Mol. Ecol. Notes: 6:569-572.
- SNAK, C.; MIOTTO, S.T.S. Y GOLDENBERG, R. 2011. *Phaseolinae* (Leguminosae, Papilionoideae, Phaseoleae) no estado do Paraná, Brasil. Rodriguésia 62(3): 695-716.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. Y KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.

TONIUTTI, M.A.; FORNASERO, L.V.; ALBICORO, F.J.; MARTINI, M.A.; DRAGHI, W.; ALVAREZ, F.; LAGARES, A.; PENSIERO, J.F. Y DEL PAPA, M.F. 2017. Nitrogen-fixing rhizobial strains isolated from *Desmodium incanum* DC in Argentina: phylogeny, biodiversity and symbiotic ability. *Syst. Appl. Microbiol.* 40(5):297-307.

TONIUTTI, M.A.; FORNASERO, L.V.; TROD, B. S.; ZUBER, N. E. Y CORDOBA, M. S. 2015. Caracterización fenotípica y funcional de rizobios noduladores de dos especies del género *Macropitilium*. *Rev. FAVE. Sección Ciencias Ararias.* 14 (1) 107-119.

VERSALOVIC, J.; SCHNIEDER, M.; DE BRUIJN, F.J. Y LUPSKI, J.R. 1994. Genomic Fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reactions. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40.

VINCENT, J.M. 1970. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. (VINCENT, J.M. Ed.) IBP

Handbook No. 15, Blackwell Scientific Publications. Oxford. 164p.

ZAHRAN, H.H. 1999. Rhizobium-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:968-989.

Financiamiento

El presente trabajo fue realizado gracias al financiamiento otorgado por el proyecto CAI+D 2011 "Caracterización funcional de rizobios noduladores el género *Macropitilium* sp." 50120110100265LI.