



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

TESINA PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO
ACADEMICO DE LICENCIADO EN QUIMICA

“CARACTERIZACION DE AISLAMIENTOS DE MICROORGANISMOS NATIVOS
SIMBIONTES DE *RHYNCHOSIA*”

Autor: Gustavo Javier Cavallero

Santa Rosa – La Pampa

Argentina

2013

1

Prefacio

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para la obtención del grado Académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología, dependiente del Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNLPam, con fecha de aprobación del Proyecto de Tesina el día 14 de junio del 2013, Res. N° 181 y con fecha de presentación de Tesina el día 18 de diciembre del 2013, bajo dirección de la Dra. Fabiola Pagliero; y bajo codirección de la Dra. Marcela Motecchia.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Pampa.

Al Departamento de Química (UNLPam).

A la Directora y a la Co-Directora de la presente tesina.

Al excelente grupo de trabajo constituido por Graciela Lorda, Fabiola Pagliero y Carolina Castaño.

A la cátedra de “Biología Celular y Molecular” de la Licenciatura en Química.

A Mari y a Marcelo

A mi familia.

A Marcos E. Gutierrez.

A mi grupo de amigos con los cuales conformamos el “Partido Deladé”.

Gustavo Javier Cavallero

Departamento de Química

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Resumen:

El estudio de la biodiversidad microbiana contribuyente al mejoramiento de prácticas agrícolas vinculadas a la explotación de leguminosas nativas con alto potencial económico, en zonas desfavorecidas como lo es la región semiárida pampeana, es una alternativa para la implantación de técnicas sustentables y ecológicas imponentes del sector agroindustrial. La gran mayoría de los estudios que se realizan sobre microorganismos con capacidad simbiote corresponden a especies de leguminosas de cultivo intensivo. En contraste, se ha puesto poca atención en simbioses de leguminosas nativas, aquellas cuya ecología no es directamente afectada por la acción del hombre. La familia de las leguminosas incluyen más de 18000 especies. Solo una pequeña porción ha sido estudiada y por lo tanto el conocimiento de la diversidad biológica de las interacciones entre leguminosas y microorganismos es aún muy limitada. Las asociaciones rizobio-leguminosa son indudablemente la forma mayoritaria de fijación de nitrógeno y juega un rol de suma importancia en la contribución de este nutriente manteniendo y mejorando la fertilidad del suelo, sumado a la acción de microorganismos co-habitantes de rizobios con características promotoras del crecimiento vegetal. En el presente trabajo se caracterizaron microorganismos endofíticos provenientes de nódulos de la leguminosa *Rhynchosia*. Los resultados obtenidos demuestran gran variabilidad microbiana co-habitando con rizobios. Ninguna de las cepas caracterizadas pudo renodular. Todos los aislamientos presentan características PGPR. Estos hallazgos conjuntamente con otras publicaciones realizadas sobre leguminosas nativas ponen en manifiesto la gran variabilidad endofítica en relación con la incapacidad de recuperar rizobios nodulantes.

Índice

1- Introducción.....	6
- 1.1.1 Rizosfera.....	7
- 1.1.2 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	8
- 1.1.3 La simbiosis bacteria-leguminosa.....	10
- 1.1.4 <i>Quorum-Sensing</i>	13
- 1.2.1 La región semiárida pampeana. Leguminosas nativas y naturalizadas.....	17
2- Hipótesis.....	20
3- Objetivos.....	20
4- Materiales y métodos.....	21
- 4.1 Obtención de los aislamientos de microorganismos.....	22
- 4.1 Procesamiento general de los aislamientos.....	22
- 4.6 <i>Fingerprinting</i> genómico por Box-PCR.....	22
- 4.2 Determinación de auxinas del tipo AIA.....	24
- 4.3 Determinación de sideróforos.....	25
- 4.4 Solubilización de fosfato inorgánico.....	26
- 4.7 Determinación de AHLs.....	27
- 4.5 Caracterización isoenzimática.....	30
- 4.8 Capacidad simbiótica.....	31
5- Resultados y Discusión.....	32
- 5.1 Caracterización genética de los microorganismos	33
- 5.2 Evaluación de las características PGPR.....	34
5.2.1 Determinación de auxinas del tipo AIA.....	34
5.2.2 Producción de sideróforos.....	35
5.2.3 Solubilización de fosfato inorgánico.....	37
- 5.3 Determinación de moléculas <i>Quorum-Sensing</i>	41
- 5.4 Caracterización isoenzimática.....	44
- 5.5 Capacidad simbiótica.....	46
6- Conclusiones y perspectivas futuras.....	49
7- Bibliografía.....	50

Introducción

1.1.1 Rizosfera

La rizosfera puede ser definida como el volumen de suelo específicamente influenciado por raíces vegetales y materiales productos de plantas (Andrade *et al.*, 1997; Mahafee *et al.*, 1997; Bringhurst *et al.*, 2001). Este espacio incluye suelo ligado a la superficie radicular. Las características químicas y biológicas de la rizosfera se manifiestan en apenas una porción de 1 milímetro de espesor a partir de las raíces. En este microambiente tiene lugar una interacción dinámica de las raíces con los microorganismos.

Se pueden destacar tres características de la rizosfera:

- Presencia de numerosos organismos en mayor densidad que en el suelo no-rizosférico, como pueden ser bacterias, hongos y microfauna (nematodos, ácaros, insectos).
- Estabilidad de las partículas de suelo, tanto por la acción mecánica de las raíces, como por la acción agregante de los exudados de los diferentes organismos presentes (plantas y microorganismos).
- Es el lugar de destino de carbohidratos productos de la fotosíntesis y de exudados de raíces de plantas que proveen energía a los microorganismos, quienes en respuesta protegen a las raíces de organismos patógenos y además solubilizan minerales haciéndolos más asimilables. Se estima que al menos un tercio de los fotosintatos son exudados para este propósito.

La rizosfera provee un complejo y dinámico microambiente, donde bacterias y hongos, en asociación con las raíces, forman comunidades únicas con un considerable potencial para la detoxificación de compuestos orgánicos nocivos. Está controlada por la misma raíz a través de exudados secretados en el sustrato cercano. Esos exudados se pueden clasificar en:

- Compuestos volátiles como el CO₂
- Compuestos de alto peso molecular como mucílago y proteínas.
- Compuestos de bajo peso molecular que incluyen aminoácidos, carbohidratos, ácidos orgánicos y metabolitos secundarios (ej. citoquininas).

La rizosfera de una misma planta puede variar drásticamente como resultado de la producción de diferentes tipos de exudados. Gracias a esos exudados se pueden establecer diferentes interacciones microorganismo-raíz que afectan positiva o negativamente el crecimiento de las plantas. Entre los organismos que participan positivamente en el crecimiento de las plantas podemos distinguir:

- Hongos: Forman interacciones de simbiosis con las raíces de plantas que favorecen la ingesta de nutrientes, la tolerancia a heladas y la protección en contra de patógenos. Se conocen como micorrizas y son redes de comunicación física que permiten el movimiento de nutrientes entre hongos y plantas, e incluso entre plantas a través de los micelios. Un ejemplo de esto son las micorrizas entre *Vicia faba* y *Glomus intraradices* que, a través de redes miceliales establecen un puente de comunicación entre plantas, permitiendo a las plantas que han sido atacadas por áfidos enviar señales para prevenir a las plantas vecinas que no han sido atacadas.
- Bacterias: Con las cuales pueden inducir la formación de nódulos radiculares, facilitar la germinación de la planta o promover la adquisición de minerales, agua y fósforo, entre otros nutrientes. La diversidad bacteriana en la rizosfera comprende variados géneros donde predominan *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* y *Zoogloea* (Babalola, 2010)

1.1.2 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR - Plant Growth Promoting Rhizobacteria) son un grupo heterogéneo de bacterias que pueden ser halladas en la rizosfera, en la superficie de las raíces y en asociación con ellas, lo cual puede mejorar en extensión y calidad el crecimiento vegetal directamente o indirectamente. En las últimas décadas se han reportado numerosos ensayos de bacterias promotoras del crecimiento de plantas, en las cuales se incluyen *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alkaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Serratia* (Kloepper *et al.*, 1989; Glick, 1995). La promoción directa por

PGPR está dada por la provisión de sustancias promotoras del crecimiento sintetizadas por las bacterias o por el facilitamiento de la incorporación de determinados nutrientes para la planta desde el medio ambiente. La promoción indirecta del crecimiento ocurre cuando PGPR previene el efecto de deterioro por otros microorganismos fitopatógenos.

Existe un gradiente de proximidad e intimidad que se establece entre PGPR y el sistema de raíces en el suelo. Bajo este aspecto, se diferencian:

- Bacterias de vida libre
- Bacterias que colonizan el rizoplasma (superficie de raíces)
- Bacterias que colonizan en el interior de tejidos vegetales.

Las bacterias que se establecen en el interior de los tejidos vegetales son endófitas. Estas incluyen un amplio rango de bacterias del suelo, las cuales forman asociaciones menos específicas que la simbiosis rizobio-leguminosa. Los endófitos pueden promover el crecimiento vegetal, directa e indirectamente y también incluyen a los simbioses fijadores de nitrógeno.

Para ayudar en la conceptualización de bacterias PGPR, se adoptan dos nuevos términos, PGPR-intracelular y PGPR-extracelular (Gray and Smith, 2005). La primera denominación se refiere a bacterias que residen en el interior del tejido vegetal, mientras que la segunda denominación se refiere a bacterias que promueven el crecimiento vegetal pero que se localizan por fuera del tejido vegetal.

Los mecanismos exactos por los cuales las PGPR promocionan el crecimiento vegetal no se encuentran completamente comprendidos. Los mayormente estudiados incluyen la capacidad de producir o cambiar la concentración de reguladores del crecimiento vegetal como ácido indolacético, ácido giberélico, citoquininas, y etileno (Glick, 1995) fijación asimbiótica de N₂ (Boddey and Dobereiner, 1995), solubilización de fosfatos minerales y otros nutrientes (De Freitas *et al.*, 1997; Gaur, 1990) antagonismo contra microorganismos fitopatógenos por producción de sideróforos (Scher and Baker, 1982), antibióticos (Shanahan *et al.*, 1992) y cianuro (Flaishman *et al.*, 1996). Algunas PGPR promocionan el crecimiento bacteriano por fijación simbiótica de N₂, nodulación, o residencia en el nódulo (Fuhrman and Wollum, 1989).

Las cepas PGPR deben ser competentes en la rizosfera, es decir, capaces de sobrevivir y colonizar los suelos rizosféricos (Cattelan *et al.*, 1999). La asociación interactiva entre PGPR y

plantas es inestable, es decir, propensa a cambiar rápidamente. Los resultados obtenidos *in vitro* no siempre pueden ser reproducidos con igual confianza a las condiciones del campo (Chanway and Holl, 1993; Zhender *et al.*, 1999). La variabilidad en el rendimiento PGPR puede ser debido a varios factores medioambientales que pueden afectar su crecimiento y ejercer su efecto en la planta. Los factores medioambientales incluyen condiciones climáticas, características de suelo, su composición y la actividad de la flora microbiana del suelo. Para alcanzar el máximo rendimiento PGPR es importante comprender cómo las rizobacterias ejercen su efecto en plantas y cómo las actividades PGPR se ven afectadas por factores medioambientales, incluyendo la presencia de otros microorganismos (Bent *et al.*, 2001). Por ello es necesario la caracterización y el desarrollo de nuevas cepas en condiciones nativas del suelo explorado, las que combinan actividades promotoras del crecimiento vegetal con la capacidad de adaptación a las condiciones medioambientales del suelo.

1.1.3 La simbiosis bacteria-leguminosa

El nitrógeno biológicamente disponible es llamado también nitrógeno fijado y es esencial para el desarrollo vegetal. La capacidad de fijar nitrógeno (diazotrofia) es exclusiva de los procariontes y radica en el complejo enzimático de la nitrogenasa. Esta enzima se inactiva en presencia de oxígeno, por lo tanto, las primeras nitrogenasas debieron de haberse originado antes de que la condición reductora de la atmósfera primitiva se transformara en oxigénica por la acumulación de O₂, como producto final de la fotosíntesis.

Las bacterias nodulantes tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y reducirlo a una forma asimilable para la planta, el nitrógeno es fijado dentro de estructuras especializadas, los nódulos, que se desarrollan en la raíz o raramente en el tallo de las leguminosas. Su organogénesis se inicia con los factores de nodulación codificados en el genoma de la bacteria, o en plásmidos. Los genes de la nodulación son mucho más recientes que los de la fijación de nitrógeno ya que su origen se asocia con la aparición de su hospedero, la leguminosa.

La filogenia del gen *rrs* (gen de RNA ribosomal 16S) agrupa a los rizobios dentro de la división Proteobacteria, mayoritariamente en α -Proteobacteria con siete géneros: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium* y *Devosia*, y en β -

Proteobacteria con dos géneros recientemente descritos *Burkholderia* y *Wautersia*. La comparación de secuenciados de este gen coincide a nivel de género con la de otros genes cromosomales sin embargo, es incongruente con la de los genes simbióticos (*nif* y *nod*) debido a que por estar codificados en elementos móviles, su transferencia horizontal les ha permitido evolucionar en función de la adecuación a la planta hospedera (Lloret and Martínez-Romero, 2005).

Los procariontes fijadores de nitrógeno (diazótrofos) están ampliamente distribuidos en grupos parafiléticos con diferentes estilos de vida y metabolismos que incluyen: aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos, metanótrofos, como células individuales o en filamentos, en vida libre y en simbiosis. La fijación biológica de nitrógeno en arqueas ocurre solamente dentro del reino *Euryarchaeota* en las divisiones *Methanosarcinales*, *Methanobacterales*, *Halobacterales*, y *Methanococcales* y en Bacteria ocurre en 6135 de los más de 50 *phyla* bacterianos descritos hasta el momento que incluyen organismos cultivables en los que la fijación de nitrógeno ha sido demostrada ya sea bioquímicamente, o por la presencia del operón *nifHDK* que codifica para el complejo nitrogenasa, por la amplificación de su secuencia por PCR o su identificación por homología en la anotación de los genomas secuenciados. Este recuento corresponde a diazótrofos que han sido cultivados, sin embargo, existen otros *phyla* que potencialmente podrían ser descritos dentro de la gran cantidad de secuencias ambientales de diazótrofos no cultivables que han sido reportados por la amplificación del gen *nifH* (Mehta *et al.*, 2003)

Las leguminosas son una familia grande y diversa de plantas con flor dicotiledóneas que ocupa el tercer lugar en número de especies, con 650 géneros y más de 18,000 especies descritas divididas en tres subfamilias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. A esta última pertenece *Rhynchosia*. La filogenia molecular de las leguminosas es construida con la comparación de las secuencias del gen *rbcL*, que codifica para la enzima RUBISCO.

Las sustancias responsables de la inducción de la formación de los nódulos en leguminosas, son oligómeros de N-acetil-D-glucosamina N-acilados producidos por los rizobios, y son llamados factores de nodulación (factores Nod). Su estructura fue primeramente descrita en *Rhizobium meliloti* (clasificado actualmente como *Ensifer meliloti*) y posteriormente han sido descritos en otros rizobios. Se componen de una estructura básica y modificaciones en los extremos reductor y no reductor. La estructura básica es sintetizada por el producto de los genes *nodABC* que están

presentes en todos los rizobios, y sus distintos sustituyentes incluyen: metilaciones, acetilaciones, sulfataciones y glucosilaciones que pueden variar en cada especie y biovariedad de rizobio. A las decoraciones de los factores Nod se les atribuye la especificidad o promiscuidad de la interacción con su hospedero, así como también al regulador, el gen *nodD*, cuyo número y especificidad por su hospedero es variable.

La coevolución de los rizobios y las leguminosas ha llevado a la especialización de los factores Nod que han generado una amplia gama de decoraciones para adecuarse a su hospedero en algunos casos con alta especificidad. La figura 1 esquematiza el sistema de señales que desencadena la simbiosis rizobio-leguminosa.

Más de 50 genes han sido identificados con relación a la nodulación involucrados en la biosíntesis, modificación, regulación, transporte y secreción de los factores Nod. El término “genes *nod*” se aplica en forma genérica a todos los genes involucrados en la nodulación, conforme han sido identificados, se les han asignado letras del alfabeto. El número de letras del alfabeto no fue suficiente para nombrarlos a todos y fueron necesarias nuevas rondas y otra designación de código de tres letras. Los genes *nod* corresponden a la primera ronda del alfabeto, los genes *nol* son la segunda ronda, y actualmente los genes *noe* están siendo descritos con la tercera.

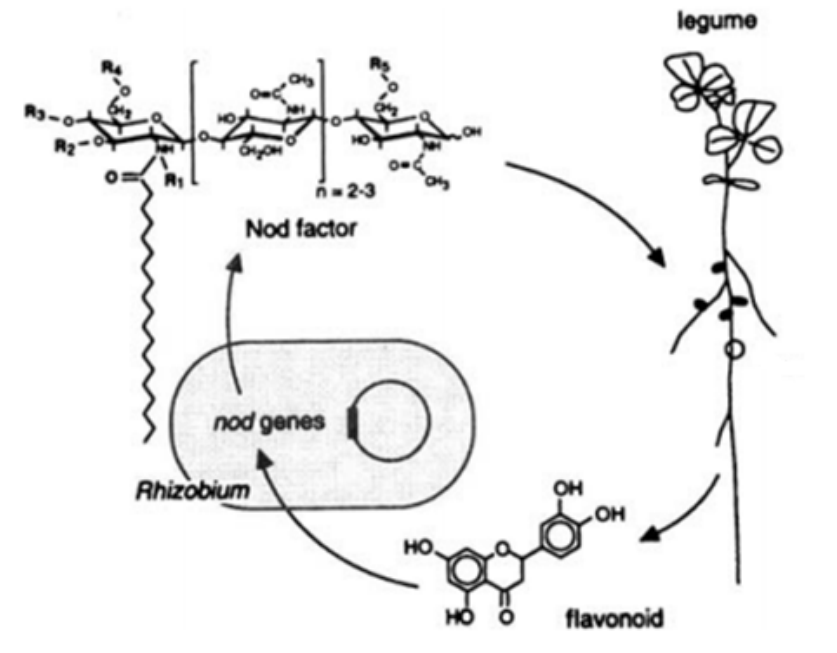


Figura 1: Representación esquemática del proceso de nodulación. Intercambio de señales en la simbiosis planta-rizobio. El hospedador produce flavonoides que inducen la expresión de genes *nod* lo cual se traduce en la síntesis de factores Nod que promueven la infección vía pelo radical.

1.1.4 Quorum-Sensing

La percepción de quórum o autoinducción es un mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular. Las células involucradas producen y liberan sustancias, llamadas autoinductores, que sirven de señales químicas para coordinar la expresión genética colectiva.

Las bacterias son capaces de coordinar su comportamiento en función de la densidad celular. Algunos de los mecanismos regulados por el fenómeno *quorum-sensing* en bacterias Gram negativas son la bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*, la virulencia en bacterias patógenas como *P. aeruginosa*, la transferencia de DNA en la bacteria patógena de plantas *Agrobacterium tumefaciens* y la formación de biofilms en un gran número de microorganismos.

Estos fenotipos son el resultado de los cambios en la expresión de múltiples genes. Estos cambios globales son regulados directa o indirectamente por proteínas tipo R, que además de regular la transcripción de otros genes regulan su propia expresión (Bassler, 2002).

En bacterias Gram negativas, el fenómeno de autoinducción esta mediado por moléculas de estructura variable de acil homoserina lactona (AHL). La estructura química de las AHLs (figura 2) se puede dividir en dos partes. La primera consiste en un anillo invariable de homoserina lactona que es común para todas las AHLs. La segunda es conformada por la cadena acilada que es responsable de la diversidad estructural de las AHLs y varía tanto en el largo (4-18 átomos de carbono), la sustitución del carbono 3 y la presencia de dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada.

Las AHLs pueden clasificarse en moléculas de cadena corta o moléculas de cadena larga, basándose en el largo de los grupos acilo. El largo y el nivel de saturación de las cadenas acilo unido a la presencia o ausencia de sustituyentes oxo o hidroxilo en la posición C-3 de dicha cadena, provee variación y especificidad para la comunicación por *Quorum-sensing* en una población bacteriana mixta (González J. and Keshavan N., 2006)

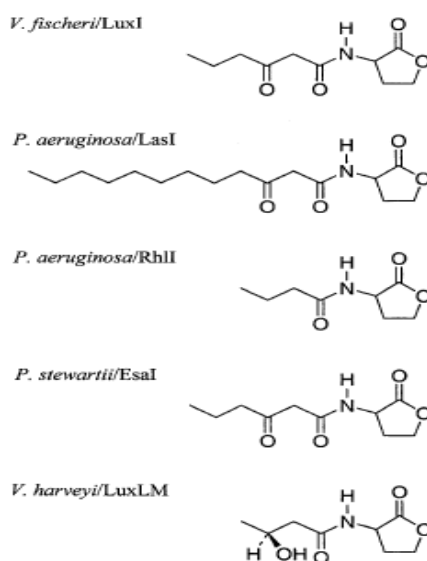


Figura 2: AHLs producidas por diferentes bacterias Gram-negativas y su respectiva sintetasa de AHL

Una vez descrito el sistema de comunicación celular dependiente de homoserina lactona identificado en bacterias Gram-negativas, se encontraron otros sistemas de comunicación bacteriana, que no utilizaban el mecanismo clásico mencionado anteriormente.

Las principales diferencias de estos nuevos sistemas con el modelo de *Vibrio fischeri* (LuxI/R) radican en la naturaleza del autoinductor, los mecanismos que controlan su síntesis, la respuesta celular que gatillan y el espectro de comunicación (interespecies, intraespecies o entre reinos). De acuerdo con el tipo de autoinductor secretado ha sido posible clasificar los distintos tipos de *quorum-sensing* en, a lo menos, cuatro grandes grupos (Reading and Sperandio, 2005):

- Sistema LuxR/I: QS mediado por homoserina lactona o autoinductor del tipo 1 (AI-1). Las bacterias Gram-negativas poseen una proteína de la familia I como sintasa y una proteína de la familia R como regulador transcripcional específico.
- Sistema de señalización por péptidos: QS mediado por oligopéptidos. Utilizado por bacterias Gram-positivas, estos pequeños péptidos activan vías de señalización de sistemas de dos componentes.
- Sistema LuxS/AI-2: Es utilizado tanto por bacterias Gram-positivas como Gram-negativas y corresponde a un sistema de comunicación interespecie. La síntesis de este AI depende de la proteína LuxS.
- Sistema AI-3/epinefrina/norepinefrina: QS utilizado como sistema de señalización inter-reino, ej.: comunicación que se establece entre enterobacterias y tracto intestinal humano.

Con bajas densidades de población, el gen que codifica una enzima específica para la síntesis del autoinductor, posee un nivel basal de expresión, que resulta en la producción de pequeñas cantidades de moléculas señal que difunden fuera de la célula y se diluyen inmediatamente en el medio circundante. Un incremento de la población bacteriana resulta en una acumulación gradual de autoinductor en el medio, que activa específicamente una proteína reguladora transcripcional. Los reguladores activados interactúan entonces, con secuencias blanco de ADN y aumentan o bloquean la transcripción de genes regulados por *Quorum-Sensing*, que resulta en la activación sincronizada de ciertos fenotipos en una población bacteriana (figura 3).

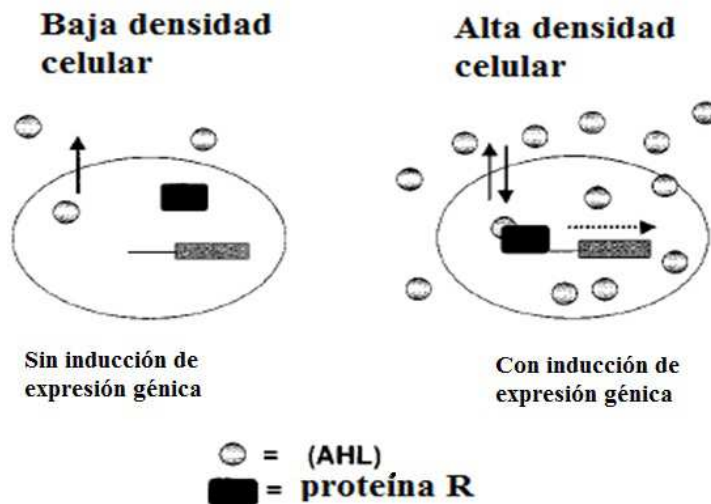


Figura 3: Representación esquemática del fenómeno *quorum-sensing*. En la imagen se observa (izquierda) un estado de baja densidad celular y baja concentración de moléculas autoinducidas, en el cual no se transcriben los genes involucrados. En la imagen derecha se representa un estado de alta densidad celular y una mayor concentración de autoinductores que permiten la transcripción mediada por la activación de la proteína R.

Las interacciones planta-microbio relacionadas con biofertilización, biorremediación, biocontrol y fitoestimulación son *quorum-sensing* dependientes.

Además de las bien caracterizadas moléculas implicadas en el proceso de nodulación tales como: flavonoides, factores Nod y exopolisacáridos, las AHLs producidas por *quorum-sensing* bacteriano pueden incluirse ahora en la lista de señales simbióticas. Este fenómeno ha sido relacionado recientemente con otros que incluyen eficiencia de nodulación, desarrollo del simbiosoma, producción de exopolisacáridos y fijación de nitrógeno, todos ellos importantes para el establecimiento de una simbiosis satisfactoria (González and Marketon, 2003).

Diferentes especies bacterianas pueden producir las mismas AHLs o bien con estructuras y propiedades similares, lo que sugiere que la comunicación cruzada entre poblaciones ocurre y es evidente que el *quorum-sensing* vía AHLs es más común entre bacterias que se asocian a plantas que en las poblaciones generales de bacterias del suelo (Sánchez-Contreras *et al.*, 2007).

1.2.1 La región semiárida pampeana. Leguminosas nativas y naturalizadas.

La región semiárida y árida central, 70 % de la superficie de las provincias de La Pampa y San Luis, presenta serios problemas de degradación de los recursos forrajeros, poniendo en riesgo la sostenibilidad económica, social y ambiental de los sistemas ganaderos (INTA, 2011).

Dentro de los factores que produjeron cambios en las comunidades originales de esta región, el de mayor importancia es el sobrepastoreo provocado por ganado doméstico, seguido por los desmontes, el destino de tierras con especies nativas a cultivos, cultivos transgénicos, siembra directa, uso de fertilizantes y plaguicidas y en menor medida agricultura de precisión, los incendios y las variaciones climáticas intra e inter anuales (Carreño and Viglizzo, 2007).

Los factores antes mencionados, guardan estrecha relación con la heterogeneidad espacial, transformando estas áreas en sitios de muy baja receptividad ganadera, ocasionando cambios estructurales en la vegetación y en la composición florística (Estelrich and Cano, 1985; Morici *et al.*, 2003).

En los últimos años, importantes áreas del Caldenal con buena aptitud para la agricultura, han sido incorporadas para este fin (Roberto and Fraga, 2005). Este hecho ha motivado una mayor homogeneización del paisaje con pérdida de límites ecotonales y el desplazamiento de la ganadería hacia zonas más marginales del caldenal y el monte o zona semiárida, agudizando adicionalmente la presión sobre estos ambientes, ya que el pastoreo provocado fue continuo y altamente selectivo, estimulando a un reemplazo paulatino de especies nativas perennes palatables, generalmente gramíneas, por dicotiledóneas y gramíneas anuales, en su mayoría exóticas y de bajo o nulo valor forrajero (Deregibus and Cahuepé, 1983). La alta carga animal afecta la estructura y composición de la vegetación existente y por ende también se ve afectado el banco de semillas del suelo (Morici *et al.*, 2009; Ernst *et al.*, 2011). También se produjo la invasión de numerosas especies leñosas o indeseables y el deterioro del suelo (Jacobo *et al.*, 2006)

Como la ganadería de zonas áridas y semiáridas utiliza para su dieta principalmente los pastizales naturales y estos en la actualidad son escasos, nulos, o se encuentran en un muy mal estado de

mantenimiento, una alternativa para mejorar la productividad de los sistemas ganaderos sería la introducción de especies forrajeras nativas o naturalizadas tanto gramíneas como leguminosas, que estén adaptadas a la zona, caracterizada por sus escasas precipitaciones y gran variabilidad climática. (Zabala *et al.*, 2010; INTA, 2010)

En una vasta zona del centro de la provincia de San Luis, por ejemplo, estudios de clasificación de imágenes satelitales han detectado una drástica reducción en la cobertura de pastizales naturales, que pasaron de cubrir casi el 93% de la superficie en 1985 a tan solo el 44% en 2001, a manos de cultivos y otras pasturas (Demaría *et al.*, 2008), siendo similar la situación en muchas zonas del país, según los datos proporcionados por los últimos Censos Nacionales Agropecuarios (Paruelo *et al.*, 2005).

En la actualidad son escasos los estudios sobre especies leguminosas nativas o naturalizadas de la región semiárida pampeana. Recientemente, en un trabajo preliminar, se han colectado ejemplares de *Adesmia*, *Hoffmannseggia* y *Rhynchosia* como autóctonos, junto a otros géneros alóctonos naturalizados -*Medicago*, *Melilotus*-. Las poblaciones analizadas de *Rhynchosia* se destacaron por su mayor número de tallos y biomasa. También presentaron nódulos radicales y alta digestibilidad de materia seca. Es por ello, que se destacó como el género más promisorio para su potencial uso forrajero contemplando la incorporación de nitrógeno a los suelos (Ruiz *et al.*, 2013).

Como los suelos de los pastizales naturales de la región semiárida pampeana tienen déficit de nitrógeno resulta de mucha importancia la siembra de leguminosas, nativas o introducidas, ya que tienen la particularidad de propagarse por semilla, lo que implica una gran resiembra natural; poseen la capacidad de crecer en comunidades vegetales junto a gramíneas, de manera de incrementar la productividad y calidad del forraje y poseen la posibilidad de fijar nitrógeno atmosférico por simbiosis con bacterias. (Bell *et al.*, 2010; Interrante *et al.*, 2011).

El aislamiento y caracterización de microorganismos endofíticos de la leguminosa *Rhynchosia* permitiría acceder a información de gran utilidad, con la finalidad de promover la producción sustentable en los sistemas frágiles de nuestro país. De este modo se podría lograr la implantación de leguminosas nativas o naturalizadas de la región semiárida, inoculadas con cepas bacterianas nativas que aseguren una eficiente fijación de nitrógeno.

Asimismo, se podrían aportar conocimientos y herramientas para incrementar la productividad de los suelos y el valor nutricional de los cultivos, en base a propuestas que permitan combinar tecnologías para mejorar los beneficios de la producción y preservar el agroecosistema en el marco de una agricultura sustentable, no de una agricultura sostenida por insumos.

2. Hipótesis

Los microorganismos que colonizan los tejidos internos de leguminosas nativas comprenden un grupo heterogéneo de bacterias que conforman una comunidad estableciendo su nicho ecológico a la vez que benefician el desarrollo vegetal.

3. Objetivos:

El objetivo general del trabajo en el cual se enmarca esta tesina es proporcionar bases de conocimiento acerca de estrategias de intervención tendientes a incrementar y/o mantener la sustentabilidad en la región semiárida pampeana.

-El objetivo de este trabajo es caracterizar simbiontes de la leguminosa nativa *Rhynchosia*. Como objetivos específicos se pretende:

- caracterizar fenotípica y genotípicamente aislamientos de microorganismos provenientes de nódulos de la leguminosa *Rhynchosia*
- determinar si los microorganismos poseen capacidad infectiva.
- identificar moléculas quorum del tipo AHL
- determinar si estos aislamientos poseen actividades promotoras del crecimiento vegetal
- representar la heterogeneidad de los grupos bacterianos presentes en el interior de los nódulos

Materiales y Métodos

4.1 Obtención de los aislamientos de microorganismos

Los aislamientos fueron proporcionados por el banco de cepas microbianas del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UNLPam). Los mismos se encuentran conservados como cultivos puros a -20 °C. Los aislamientos provienen del interior de nódulos esterilizados en superficie, de la leguminosa *Rhynchosia*, los cuales son el resultado de un muestreo de diferentes zonas de la región semiárida pampeana.

4.2 Procesamiento general de los aislamientos

Para el conjunto de ensayos de caracterización, perfil isoenzimático, actividades promotoras del crecimiento vegetal y determinación de moléculas AHLs, cada una de las cepas se cultivaron en erlenmeyers de 250 ml con medio de cultivo líquido TY (Tryptona 5 g/l, extracto de levadura 3 g/l, CaCl₂·2H₂O 0.87 g/l, pH 6,8-7.2), durante 24 horas en agitación rotatoria a 30 °C. Los cultivos fueron centrifugados durante 10 minutos a 4°C y 10000 rpm. El sobrenadante obtenido se alícuotó y se utilizó para determinación de auxinas y moléculas AHLs, mientras que los pellets celulares fueron utilizados para el ensayo de isoenzimas. Para las determinaciones de sideróforos y solubilización de fosfatos se emplearon muestras directas del cultivo, las cuales fueron sembradas en placas para los ensayos correspondientes

4.3 Fingerprinting genómico por BOX - PCR

Para la caracterización genética de los aislamientos por BOX-PCR se procedió según Versalovic *et al.*, 1994. Para la reacción de PCR se utilizaron colonias aisladas en placas como fuente de DNA genómico. Se tomaron entre una y dos colonias por cepa y se suspendieron en un microtubo de 1.5 ml conteniendo agua milliQ estéril. Las suspensiones fueron centrifugadas y lavadas con solución de NaCl 1 M dos veces. Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en agua milliQ estéril y almacenados a -20°C. Se utilizó 1µl de suspensión para la reacción de PCR en

microtubos con 24 μ l de solución *master mix*, cuya composición se detalla la tabla 1. Las condiciones de reacción programadas en el termociclador fueron las siguientes:

Ciclos de reacción: 30 ciclos

Desnaturalización: 94 °C; 1 min

Annealing: 52 °C; 1 min

Extensión: 65 °C; 8min

Para la reacción de PCR se utilizó el cebador BOXA1R el cual presenta la secuencia nucleotídica 5'-CTACggCAAaggCgACgCTgACg-3' (Versalovic *et al.*, 1994)

Master mix	Solución stock
5 μ l	5 x Gitschier Buffer
0.2 μ l	BSA, 20 mg/ml
2.5 μ l	DMSO, 100%
13.65 μ l	ddH ₂ O
1.25 μ l	mix de dNTP's (1:1:1:1)
1 μ l	cebador
0.4 μ l	Taq DNA Polymerase, 5 U/l

Tabla 1: Composición de la solución Master Mix utilizada para el ensayo de PCR

Los productos de la reacción PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1.5 % en buffer TBE 1x. La preparación de las muestras a separar se realizó sobre material *Parafilm*, en el cual se colocaron en forma de gotas 2 μ l de solución *loading* buffer (composición: 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xylene cyanol FF and 15 % Ficoll 400) a cada cual se le agregó 6 μ l de producto de reacción de PCR. El mismo procedimiento se llevó a cabo en la preparación de controles positivos y marcadores de peso molecular.

La electroforesis se realizó con una fuente de voltaje constante de 70 V y 20-25 mA. El tiempo de corrida fue de 3 horas.

El revelado del gel se realizó con SYBR Safe y por exposición del gel al UV en ambiente cerrado con cámara de video incorporada. El análisis de los *fingerprints* se realizó por medio del software

GelCompar II v. 6.5 (Applied Maths NV), utilizando el coeficiente de correlación de Pearson y UPGMA.

4.4 Determinación de auxinas del tipo AIA:

La determinación de auxinas se llevó a cabo mediante la técnica espectrofotométrica descrita por Glickmann y Dessaux (1995). Se determinó la absorbancia de las muestras a 530 nm luego de hacerlos reaccionar con el reactivo de Salkowsky (Tabla 2). El reactivo de Salkowsky (H_2SO_4 7,9M- FeCl_3 40 mM, proporción muestra reactivo 1:4) produce la oxidación de los grupos indol, generando una coloración que va de la gama de los rosados al fucsia, evidenciando la presencia de moléculas con grupos indol presumibles como compuestos auxínicos. Se construyó una curva de calibración utilizando patrones de ácido indol-acético en un intervalo de concentraciones de 4 a 60 $\mu\text{g/ml}$. Los patrones de ácido indol-acético, se prepararon a partir de una solución madre de concentración 100 $\mu\text{g/ml}$.

droga	volumen
H_2SO_4 c	150 ml
H_2O destilada	250 ml
FeCl_3 (ac) 0.5M	7.5 ml

Tabla 2: Preparación del reactivo de Salkowsky.

Se dejó transcurrir 20 minutos luego de preparadas las muestras para proceder a la medición de Absorbancia a 530 nm.

4.5 Determinación de sideróforos:

La metodología utilizada es la descrita en el trabajo Pérez-Miranda (2007). Se sembraron en placa 10 μ l desde cultivo líquido. Se cultivaron las distintas cepas en placas en medio sólido hasta que la colonia sea visible. Una vez que se pudieron visualizar las colonias de microorganismos, se aplicó encima una capa de Agar-CAS el cual fue preparado en el momento y vertido sobre la placa sembrada a una temperatura inferior a 45 °C de modo de no dañar los microorganismos.

Modo de preparación de Agar CAS:

El medio CAS se preparó de acuerdo a Schwyn y Neilands, 1987. En 50 ml de H₂O MilliQ se disolvieron 60.5 mg de CAS y se le agregaron 10 ml de FeCl₃.6H₂O. En 40 ml de H₂O MilliQ se disolvieron el HDTMA (72,9 mg), añadiéndose luego sobre ésta la solución CAS lentamente. En 750 ml de H₂O Milli-Q se disolvieron 30,24 gr de PIPES (Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfónico) y se ajustó el pH a 6,8 con NaOH. Se agregó agarosa para alcanzar una concentración de al 0,9 %. Ambas soluciones se esterilizaron por separado en autoclave a 120°C durante 15 min. La detección de sideróforos se logró mediante la aplicación de 10 ml (caja Petri 80 mm de diámetro) o 30 ml (caja Petri de 150 mm diámetro) sobre placas agarizadas conteniendo las colonias de microorganismos que van a ser caracterizados para la producción de sideróforos. Luego de incubado 24 horas, un cambio de color se observa exclusivamente alrededor de las colonias de microorganismos productores de sideróforos, de azul a púrpura (como se describe en el ensayo tradicional de CAS sideróforos del tipo catecol), de azul a naranja (como reportado para los microorganismos que producen hidroxamatos) y de azul a amarillo para la producción de sideróforos del tipo carboxilatos (figura 7).

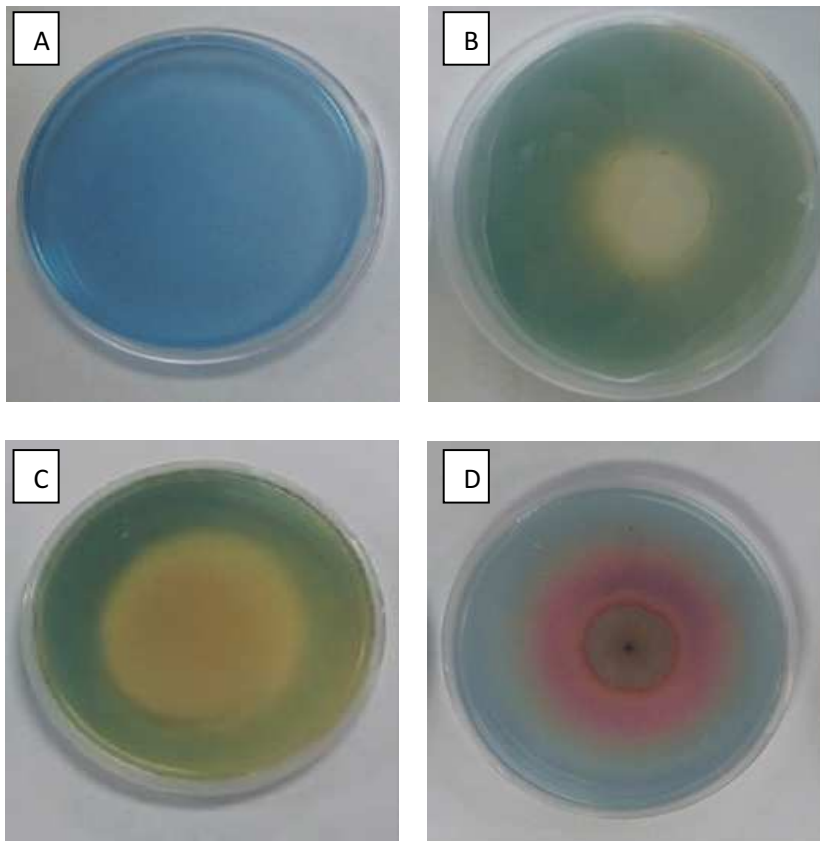


Figura 7: Las imágenes A, B, C y D muestran los posibles resultados que pueden obtenerse con la metodología utilizada. Se observa la formación de halos de coloración que viran desde el azul hasta el amarillo, naranja o púrpura dependiendo del tipo de sideróforo producido. A: control negativo. B: *Rhizopus oligosporus*, productor de carboxilatos. C: *Bacillus cereus*, productor de hidroxamatos. D: *Aspergillus niger*, productor de catecoles.

4.5 Solubilización de fosfato inorgánico:

Se llevó a cabo con el medio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium) detallado en tabla 3. Dicho medio contiene, entre otros componentes, fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Se sembraron 10 μl de cultivo en cada placa Petri y se incubaron durante 7 días a 28°C. La formación de un halo alrededor de las colonias indica capacidad solubilizadora de fósforo.

Composición NBRIP	Cantidad (g/l)
Glucosa	10
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
MgCl ₂ .6H ₂ O	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
KCl	0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
Agar	15

Tabla 3: Composición del medio NBRIP

Al momento de plaquear se agitó el frasco para asegurar que todas las placas tengan Ca₃(PO₄)₂ (insoluble). Se prepararon cajas de Petri con dicho medio y se sembraron hasta 4 muestras por caja (10 µl de cultivo). Se observó aparición de halo de solubilización. Se utilizó *P. fluorescens* P3 como control positivo.

4.6 Determinación de AHLs

Para la determinación de moléculas quórum, se investigaron la producción de AHLs (acil homoserina lactonas) en función de los motivos de cadena corta y cadena larga. Las AHLs son moléculas orgánicas de bajo peso molecular que se acumulan en el medio de crecimiento de un cultivo bacteriano. Debido a esto, son aislados desde los sobrenadantes de cultivos de bacterias. Para la detección de moléculas de cadena corta se realizó un ensayo en placa utilizando la cepa reportera *Chromobacterium violaceum* CV026. Se la cultivó en 5 ml de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) durante 24 horas. Luego sobre placas con medio LB agarizado (tabla 4), se adicionó 5 ml de medio LB semisólido (0.8% de agar) suplementado con 5 µg/ml de kanamicina, e inoculado con 150 µl de una suspensión del cultivo de *C.violaceum* CV026. Una vez solidificado el medio, se hicieron pocillos en el agar, donde se sembró la muestra (100 µl tomados de las alícuotas respectivas durante el procesado de los cultivos) y los controles respectivos. Se sembraron como controles negativos, medio líquido estéril y como control positivo, butiril homoserinlactona. Las placas se incubaron a 28°C durante 24-48 horas. Un

resultado positivo es la aparición de un halo de coloración púrpura alrededor del punto de siembra de muestra (figura 8).

Componentes	Concentración (g/L)
NaCl	5
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Glucosa	1
pH	6,8 - 7

Tabla 4: Composición del medio de cultivo LB

C. violaceum CV026 es una cepa mutada en el gen *cviI*, mediante inserción del Tn5, incapaz de producir la sintetasa CviI que interviene en la producción de 3-hexanoil homoserina lactona (C₆-HSL). Este compuesto induce la producción del pigmento violaceína, cuya producción se restaura mediante incubación con homoserina lactona exógena.

En la figura 8 se muestra una placa positiva del bioensayo de *C. violaceum* CV026



Figura 8: Placa control positivo sembrada con sobrenadante butiril homoserinlactona

Para la detección de AHLs de cadena larga se realizó un ensayo en placa similar al descrito para la detección de AHLs de cadena corta. La sensibilidad varía para cada una de las AHLs que

detecta. La cepa reportera en este ensayo fue *Agrobacterium tumefaciens* NT1-pZLR4. Este biosensor posee la capacidad de detectar AHLs de cadena acil de largo variable (C₄-C₁₂) y con y sin sustitución en el carbono 3. La sensibilidad varía para cada una de las AHLs que detecta. Esta cepa se cultivó en 5 ml de YEM líquido durante 24 horas. Se prepararon placas con medio YEM agarizado (tabla 5) suplementadas con 30 µg/ml de gentamicina y sobre éste medio, se adicionó 5 ml de medio YEM semisólido (0.8% de agar) adicionado con 40 µg/ml de Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido; 20 mg/ml en dimetilformamida), y se inocularon con 500 µl de una suspensión del cultivo de *A. tumefaciens* NT1-pZLR4. Luego de solidificado el medio, se realizaron pocillos en el agar, donde se sembraron las muestras y los controles respectivos. Las placas se incubaron a 28°C durante 24-48 horas.

A. tumefaciens NT1-pZLR4 es una cepa que curada del plásmido Ti y contiene el plásmido pZLR4 en el que se ha clonado el gen *traR* y una fusión *traG::lacZ*. Esta cepa es incapaz de producir su propio autoinductor, y la fusión *traG::lacZ*, que da un pigmento azulado (figura 9), el cual sólo se expresa en presencia de moléculas autoinductoras exógenas.

Componentes	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	0,4
Manitol	5
NaCl	0,1
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,2
K ₂ HPO ₄	0,05
Agar	15
pH	6,8-7

Tabla 5: Composición del medio de cultivo YEM

En la siguiente figura se observa la apariencia de un resultado positivo para el bioensayo con la cepa reportera *A. tumefaciens* NT1-pZLR4.

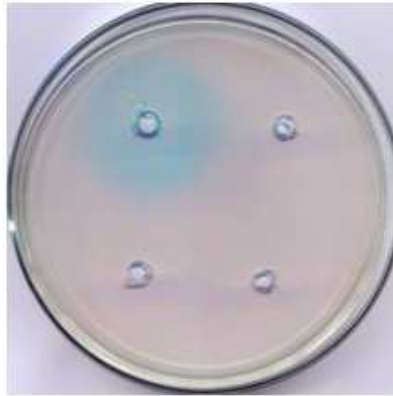


Figura 9: Placa control positivo sembrada con patrón de dodecil-homoserin-lactona

4.7 Caracterización isoenzimática

Para la determinación del perfil de isoenzimas α y β esterasas, se usó la técnica MLEE (Selander *et al.*, 1986) adaptada en nuestro laboratorio. Los precipitados (obtenidos mediante el procesamiento colectivo de las cepas para los distintos ensayos) fueron lavados y resuspendidos con 1 ml de solución de NaCl (0.85 %). Se recogieron en microtubos Eppendorff y se centrifugaron durante 10 minutos a 15.000 rpm en centrifuga EppendorF Centrifuge 5414. Para cada una de las muestras, se volcó nuevamente el sobrenadante y se recogió en 0.5 ml de tampón de extracción (Tris – HCl 0.1 M y pH 7.2; MgCl₂ ; glicerol 15 % y mercaptoetanol 0.1 %), se centrifugó a 15000 rpm durante 10 minutos y se resuspendió con el mismo tampón con lisozima en concentración 1 mg/ml, después de incubar 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 10 minutos a 1.500 rpm y se resuspendió en tampón de sonicación (Tris – HCl 0.1 M, pH 8.8, y glicerol 15 %). Se sonicó (Sonicador KONTES microultrasonic cell disrupter) durante 3 ciclos de 10 segundos. Por último, se centrifugó durante 10 minutos y el sobrenadante se reservó para la corrida electroforética.

Se realizó Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE) para separar las isoenzimas presentes en los extractos antedichos. La concentración de poliacrilamida para la placa de electroforesis fue de 5% para el gel concentrador y 10% para el gel separador (véase tabla 6). La composición stock del polímero fue de 30 % acrilamida y 0.8 % bis-acrilamida. Se colocó la placa de electroforesis en la cuba conteniendo solución reguladora de electrodos (0,012M Tris;

0,095M Glicina; pH 8,8). Se colocó un volumen de 70 μ l del extracto en cada pocillo. La electroforesis se corrió con un voltaje constante de 200 V, durante tres horas, utilizándose azul de bromofenol como indicador del frente de corrida.

Se revelaron α y β esterasas para lo cual los geles fueron tratados con 100 ml de buffer fosfatos 0,1 M, pH 6,2, conteniendo 100 mg de Fast Blue RR y 60 mg de α -naftil acetato y 40 mg de β -naftil acetato, previamente disueltos en 0,5 ml de acetona y luego incubados a temperatura ambiente con agitación lenta, continua y en oscuridad, hasta que las bandas desarrollaron suficiente coloración. Luego se lavaron los geles con 300 ml de solución decolorante (30% v/v etanol; 5% v/v ácido acético).

Componentes	Gel concentrador	Gel separador
Tris. HCl 2,25M pH 8,8	2 ml	4.35 ml
Acrilamida bis	1.33 ml	8.7 ml
Agua destilada	4.62 ml	12.7 ml
TEMED	20 μ l	25 μ l
Persulfato de amonio	100 μ l	200 μ l

Tabla 6: Composición de los geles (concentrador y separador) de poliacrilamida.

4.8 Capacidad simbiótica

Para evaluar la capacidad de simbiótica se realizó un ensayo de plantas en invernadero. Semillas de *Rhynchosia* (previamente germinadas) se inocularon con cultivos puros de cada aislamiento, en soporte estéril arena-vermiculita (proporción 1:2). Los cultivos vegetales fueron regados con agua estéril a modo de mantener condiciones microbiológicas adecuadas en cada uno de los cultivos desarrollados. Cada aislamiento fue ensayado por duplicado. Se desarrollaron en igual condiciones 10 controles negativos (plántulas sin inocular) y 10 controles inoculados con fertilizante nitrogenado. El ensayo consistió en un total de 124 plantas y se dio por finalizado dos meses pasados desde la inoculación. Se examinó la presencia de nódulos en la totalidad de las raíces.

Resultados y Discusión

5.1 Caracterización genética de los microorganismos

Este ensayo se realizó de modo de visualizar la variabilidad genética de los aislamientos endófitos de la leguminosa *Rhynchosia*. Para ello, se seleccionaron un total de 16 microorganismos, los cuales presentaban menores diferencias a nivel morfológico en placa. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10.

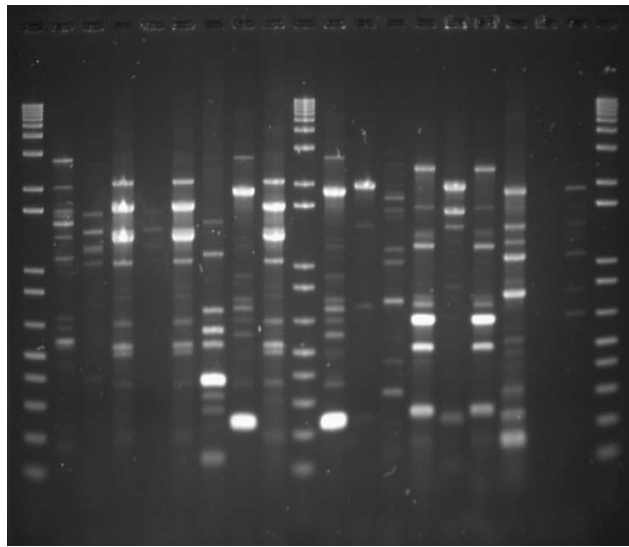


Figura 10: Apariencia del gel de agarosa revelado mediante UV luego de realizada la electroforesis de las muestras amplificadas.

Se agruparon las calles de acuerdo a la similitud de las mismas. El análisis de agrupamiento de los perfiles de BOX-PCR se presenta en la figura 11.

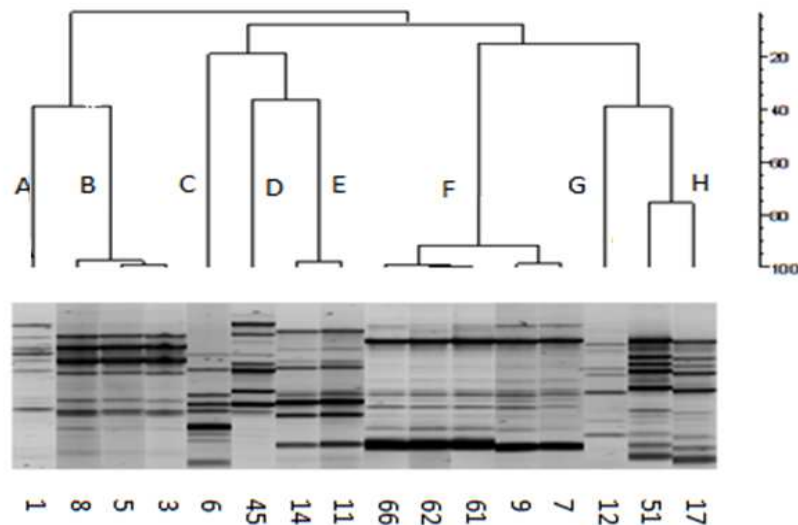


Figura 11: Dendrograma (Pearson/UPGMA) correspondiente al análisis de los patrones de bandas obtenidos por BOX-PCR

A un nivel de similitud del 50% pueden definirse 8 grupos. De éstos, 4 grupos tienen un nivel de similitud superior al 95%, los aislamientos dentro de cada uno de estos grupos serían cepas hermanas. Estos resultados coinciden con los de otros autores que han encontrado diferentes cepas en nódulos de *Rhynchosia* (Doignon-Bourcier *et al.*, 1999; Garau *et al.*, 2009).

5.2 Evaluación de las características promotoras del crecimiento vegetal

5.2.1 Producción de auxinas del tipo AIA

Todos los microorganismos caracterizados producen fitohormonas auxinas del tipo ácido indolacético, sin requerimiento de triptófano en caldo de cultivo como intermediario para su síntesis. En la figura 12 se puede observar los diferentes rangos de concentraciones de auxinas para los aislamientos estudiados. La mayor concentración determinada fue de 22 mg/l, la concentración promedio producida por el conjunto de aislamientos en estudio fue de 5,96 mg/l.

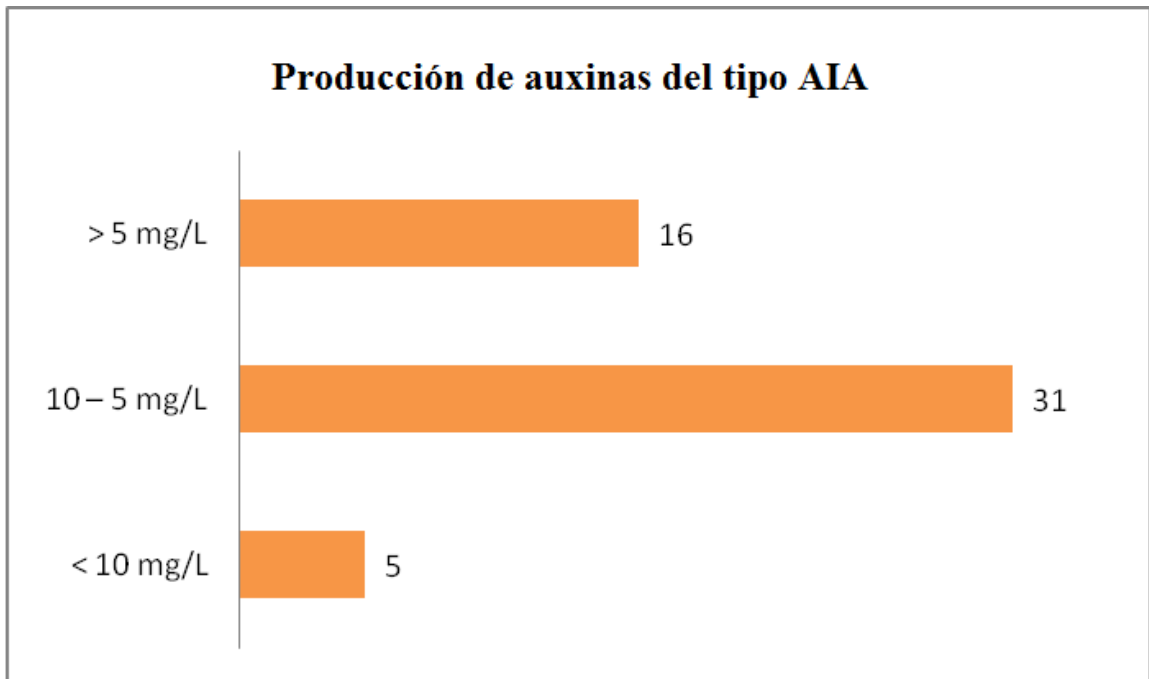


Figura 12: La figura muestra el total de los aislamientos agrupados en función de la concentración determinada.

Resultados similares fueron obtenidos por Ahmad *et al.*, 2008, quien demuestra que aislamientos de *Azotobacter* y *Pseudomonas* producen diversas hormonas vegetales cuando se cultivan en medios líquidos. Una de las principales es el AIA, demostrando que las cepas más activas en cuanto a la producción de esta auxina producían entre 5 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de AIA. El rango de concentraciones hallado en este ensayo es un caso frecuente y se corresponde también a los encontrados por otros autores que estudian la comunidad simbiótica de bacterias endófitas y rizosféricas (Ahmad *et al.*, 2005; Torres-Rubio *et al.*, 2000; Khalid *et al.*, 2004; Patten and Glick, 1996; Ahmad *et al.*, 2008).

5.2.1 Producción de sideróforos

En la figura 13 se puede observar el aspecto de los halos de coloración obtenidos para algunos de los aislamientos caracterizados.

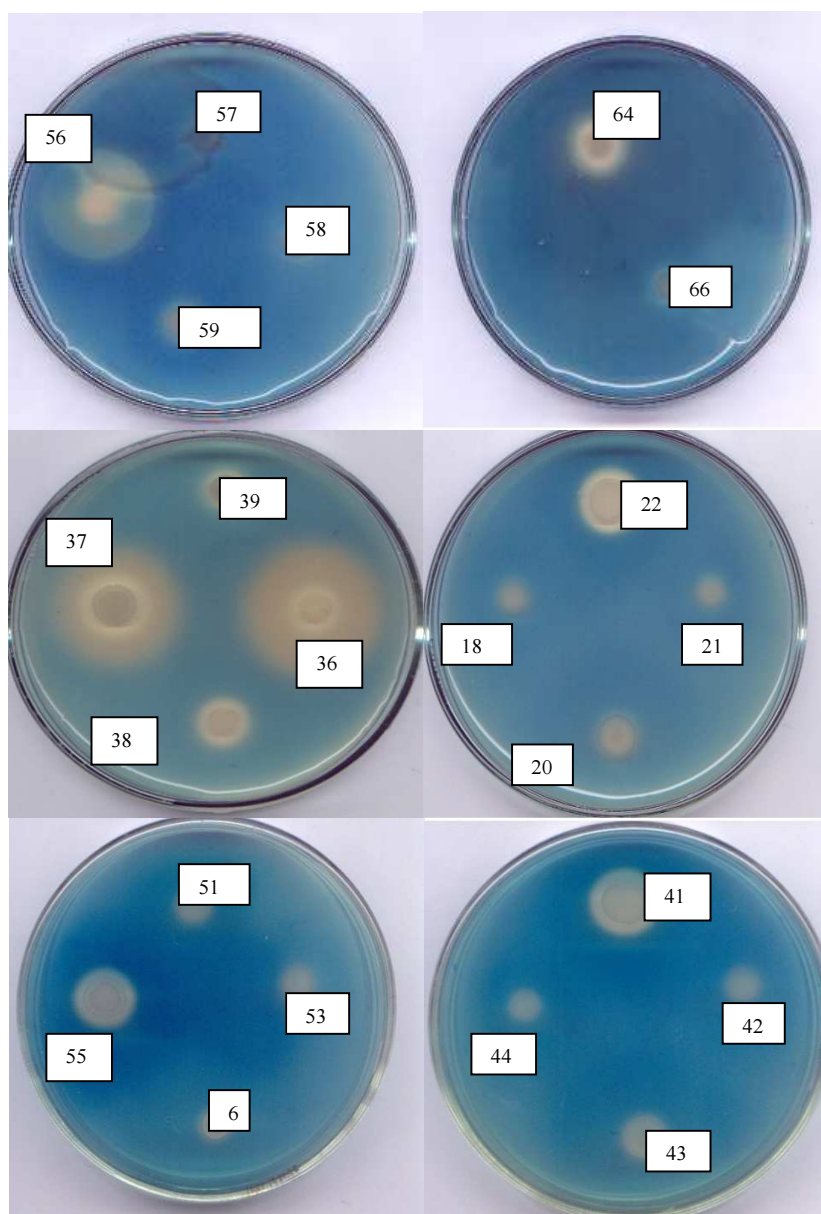


Figura 13: Imágenes de placas positivas para los aislamientos productores de sideróforos.

En nuestro ensayo, se encontró que el 27 % de las cepas caracterizadas son productoras de sideróforos. El cambio de coloración observado evidencia que los sideróforos producidos se corresponden con los tipos hidroxamatos y carboxilatos.

5.2.3 Solubilización de fosfato inorgánico

Si bien muchos géneros bacterianos presentan capacidad para solubilizar fosfato inorgánico, es de particular interés detectar esta habilidad en grupos que tengan otras propiedades de promoción de crecimiento vegetal, como por ejemplo, capacidad para fijar nitrógeno atmosférico. Se han aislado microorganismos como *Azospirillum lipoferum* y *Azotobacter chroococcum* que además de ser fijadores libres de nitrógeno, son capaces de promover el crecimiento vegetal mediante la solubilización de fosfatos inorgánicos (Murty and Ladha, 1988; Kundu and Gaur, 1980). Además, distintas especies de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, bacterias del suelo que fijan nitrógeno en asociación simbiótica con distintas leguminosas, poseen capacidad de solubilización de fósforo inorgánico (Halder and Chakrabartty, 1993; Surange and Kumar, 1993).

En la figura 14 se puede observar el aspecto de los halos de solubilización para algunos de los aislamientos caracterizados.

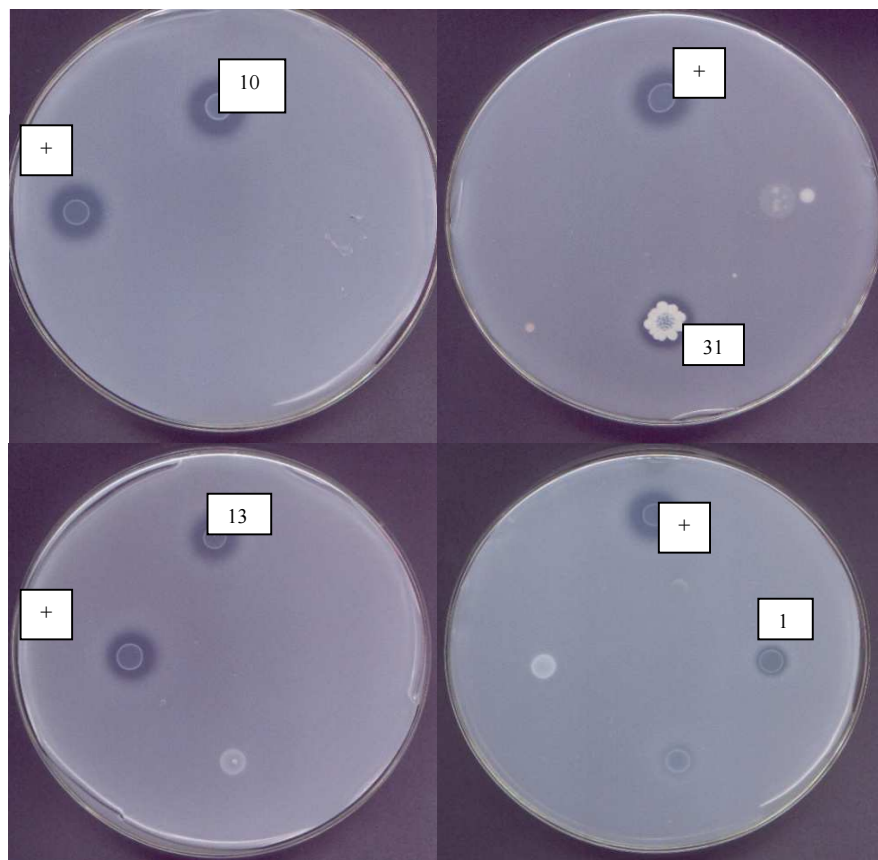


Figura 14: Imágenes de placas positivas para los aislamientos solubilizadores de fosfato inorgánico

El ensayo realizado en el presente trabajo demostró que solo el 9.6 % de las cepas caracterizadas presenta capacidad solubilizadora de fósforo inorgánico, mientras que el 90.4 % de las cepas caracterizadas no presentaron tal actividad o al menos no fue detectable con la sensibilidad de la técnica utilizada descrita en la sección de materiales y métodos. Varios estudios han puesto en evidencia la capacidad solubilizadora de fosfato inorgánico por diferentes especies microbianas (Khan *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2010, Zaidi *et al.*, 2009). En bacterias se destacan los géneros: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Pantotea*, *Klebsiella*, *Rhodobacter*.

En la figura 15 se muestra un gráfico en forma de barras el cual representa conjuntamente el total de los aislamientos caracterizados para las distintas propiedades PGP (promotoras del crecimiento vegetal). La Tabla 7 muestra además, los resultados obtenidos para los ensayos de PGP.

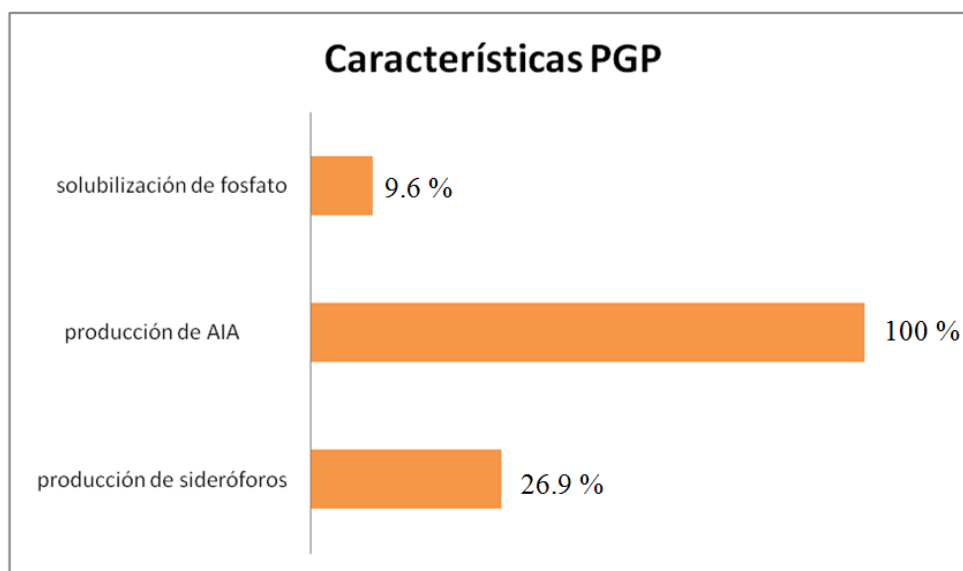


Figura 15: Presentación de las características PGP para el total de los aislamientos

Aislamientos	AIA (µg /ml)	Sol. fosfato	Sideróforos
1	2,85	+	-
2	2,85	-	-
3	1,42	-	-
4	5	+	-
5	0,71	-	-
6	0,71	-	-
7	1,42	-	-
8	4,28	-	+
9	0,71	-	-
10	1,42	+	+
11	0,71	-	-
12	3,57	-	-
13	0,71	+	-
14	1,42	-	-
15	0,71	-	-
17	5,71	-	-
18	6,42	-	-
20	5,71	-	-
21	5	-	-
22	6,42	-	+
24	7,14	-	-
26	5,71	-	-
27	5,71	-	+
29	0,71	-	-
30	6,42	-	-
31	5	+	-
32	7,85	-	-
33	8,57	-	-
34	6,42	-	-
36	5,71	-	+
37	9,28	-	+
38	5,71	-	+
39	7,14	-	+
41	5,71	-	+
42	6,42	-	+
43	5,71	-	-
44	25	-	-
45	11,42	-	-
48	7,14	-	-
51	5,71	-	-
53	5	-	-
55	5	-	+
56	7,14	-	-
57	11,42	-	+
58	6,42	-	-

59	5	-	+
60	5	-	-
61	10,71	-	-
62	5,71	-	-
63	8,57	-	-
64	5,71	-	+
66	22,85	-	-

Tabla 7: Características PGPR para el total de los aislamientos caracterizados

El estudio de actividades promotoras del crecimiento vegetal en microorganismos endófitos pertenecientes a otras taxas no rizobiales surge como un campo nuevo de estudio en la simbiosis rizobio-leguminosa. Dichos microorganismos comprenden hongos y bacterias y no necesariamente están relacionados con patogenicidad. Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004, demostraron características promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en microorganismos endofíticos de cultivos de soja. Los microorganismos endofíticos no solo se encuentran en nódulos sino también en otros tejidos vegetales. Los nódulos pueden ser colonizados por microorganismos endófitos de varios géneros microbianos no relacionados a los rizobios fijadores de nitrógeno, incluyendo a Gram positivos y gamma-proteobacteria. Ibañez *et al.* 2008, encontraron que en el interior de nódulos de soja esterilizados en superficie se hallaban especies de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*. Bai *et al.* 2003, demostraron que *Bacillus subtilis* y *Bacillus turigensis* habitan conjuntamente con rizobios en nódulos de soja y que además incrementan la productividad vegetal. Zakhia *et al.* 2006 describe la asociación de 14 géneros bacterianos en nódulos de plantas nativas.

Las cepas PGPR deben ser competentes en la rizosfera, es decir, capaces de sobrevivir y colonizar los suelos rizosféricos (Cattelan *et al.*, 1999). La asociación interactiva entre PGPR y plantas es inestable, es decir, propensa a cambiar rápidamente. Los resultados obtenidos *in vitro* no siempre pueden ser reproducidos con igual confianza a las condiciones del campo (Chanway and Holl, 1993; Zhender *et al.*, 1999). La variabilidad en el rendimiento PGPR puede ser debido a varios factores medioambientales que pueden afectar su crecimiento y ejercer su efecto en la planta. Los factores medioambientales incluyen condiciones climáticas, características de suelo, su composición y la actividad de la flora microbiana del suelo. Para alcanzar el máximo

rendimiento PGPR es importante comprender como las rizobacterias ejercen su efecto en plantas y como las actividades PGPR se ven afectadas por factores medioambientales, incluyendo la presencia de otros microorganismos (Bent *et al*, 2001). Por ello es necesario la caracterización y el desarrollo de nuevas cepas en condiciones nativas del suelo explorado, las que combinan actividades PGP con la capacidad de adaptación a las condiciones del suelo.

5.3 Determinación de moléculas *Quorum*

Se llevo a cabo la detección de moléculas *Quorum* en función de dos motivos: AHLs de cadena hidrocarbonada corta y cadena hidrocarbonada larga a través de dos bioensayos respectivos. En la figura 16 se muestra el registro fotográfico para algunos de los aislamientos que resultaron positivos en el ensayo de detección de AHLs.

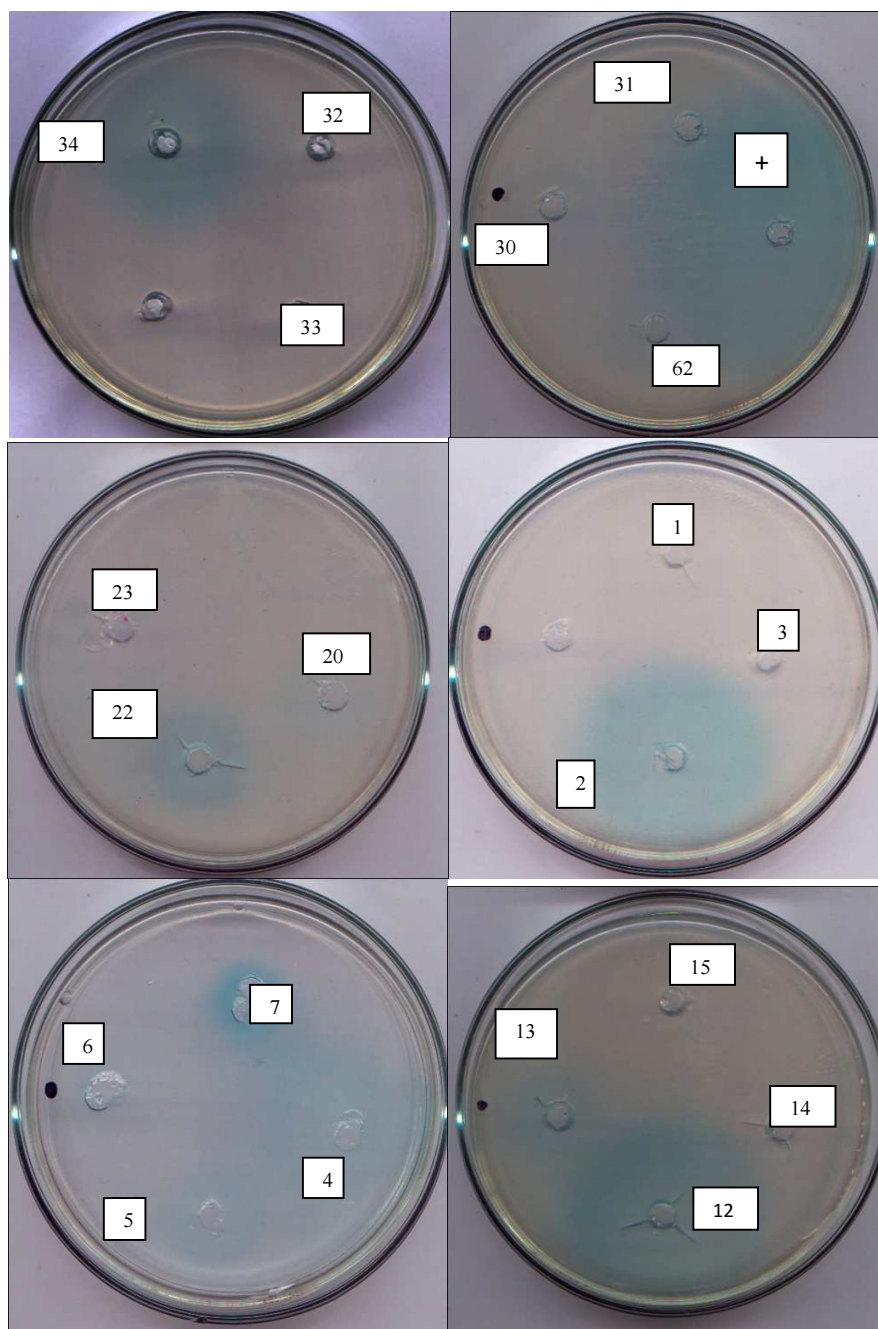


Figura 16: Imágenes de resultados positivos para el bioensayo de detección de moléculas AHLs de cadena hidrocarbonada larga producidas por los diferentes aislamientos.

El bioensayo utilizando el biosensor *C.violaceum* CV026, no pudo detectar ninguna muestra positiva. El bioensayo utilizando el biosensor *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 que detecta autoinductores de cadena hidrocarbonada larga dio positivo para el 33% de las cepas

caracterizadas. Los halos originados en las placas ponen de manifiesto los distintos niveles de expresión de estas moléculas. En la tabla 8 se presenta el conjunto de datos obtenidos para el total de los aislamientos caracterizados. Los resultados se presentan de manera semicuantitativa en función del halo de coloración observado alrededor del punto de siembra de muestra. El nivel de producción de AHLs se detalla mediante la utilización de signos “+” en un intervalo del 1 al 4 correspondiéndose con el nivel de producción de moléculas autoinductoras más bajo observable, al más alto observable, en placas.

Aislamientos	Nivel de detección
2	++++
4	+++
7	++++
12	+++++
13	+
20	+
22	+++
33	+++
34	+
36	+
38	+
41	+++
42	++
43	+
44	++
56	+
66	+

Tabla 8: Representación de resultados positivos para el ensayo de detección de AHLs

Los resultados obtenidos en este ensayo no descartan la posibilidad de que las cepas que resultaron negativas, no utilicen AHLs de cadena corta o cadena larga como moléculas de comunicación célula-célula, sino que pueden estar por debajo del límite de detección proporcionado por la técnica, o que las moléculas de comunicación presenten motivos diferentes a los que detectan los biosensores utilizados. Es interesante el hallazgo de moléculas

autoinductoras producidas por los aislamientos estudiados en lo que respecta a la comunicación que se establece entre los organismos de las comunidades en las que éstas habitan.

Es de destacar que el enfoque de estudio que se centra en la red de *quorum-sensing*, que opera en bacterias de la misma especie, sería limitado. En el hábitat de la mayoría de ellas se encuentran múltiples especies bacterianas y otros organismos superiores (Pacheco and Sperandio, 2009). En estas comunidades multiespecie-multireino se establecen redes de señalización de quórum-sensing. Independientemente de cómo se procesan las señales, la respuesta será un cambio en el comportamiento colectivo de la comunidad en su conjunto o de alguna de las especies que la constituyen (Ryan and Down, 2008). Se han descrito por distintas especies bacterianas la inducción o modificación de respuestas por acción de AHLs producidas por otros microorganismos (Choudhary and Smidt, 2010).

5.4 Caracterización isoenzimática

En este ensayo se estudió la presencia de las isoenzimas alfa y beta esterases con el objetivo de determinar la variabilidad de los microorganismos en estudio. En los zimogramas obtenidos (figuras 17, 18, 19) mediante un análisis de presencia y ausencia de bandas conjuntamente con su indicativo de intensidad, se pudo determinar una alta variabilidad fenotípica.

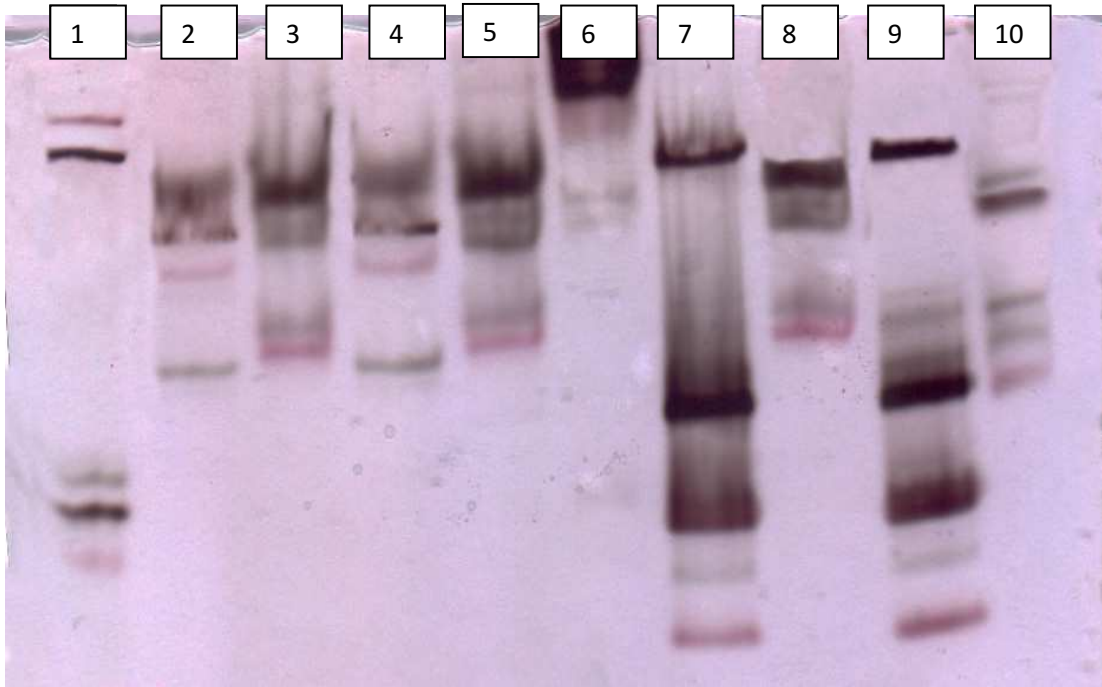


Figura 17: Gel de poliacrilamida revelado para aislamientos seleccionados

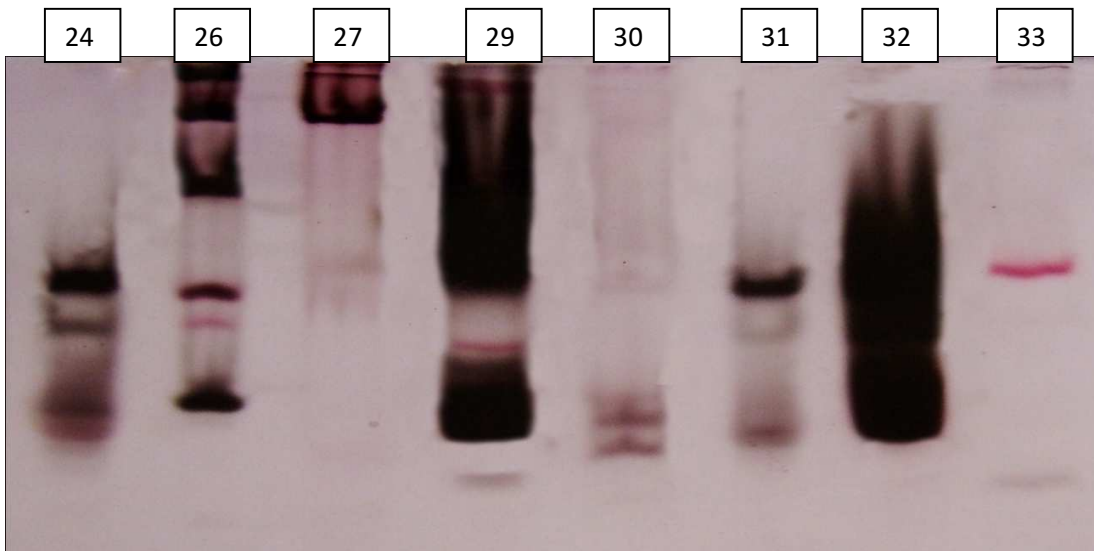


Figura 18: Gel de electroforesis revelado para los aislamientos seleccionados

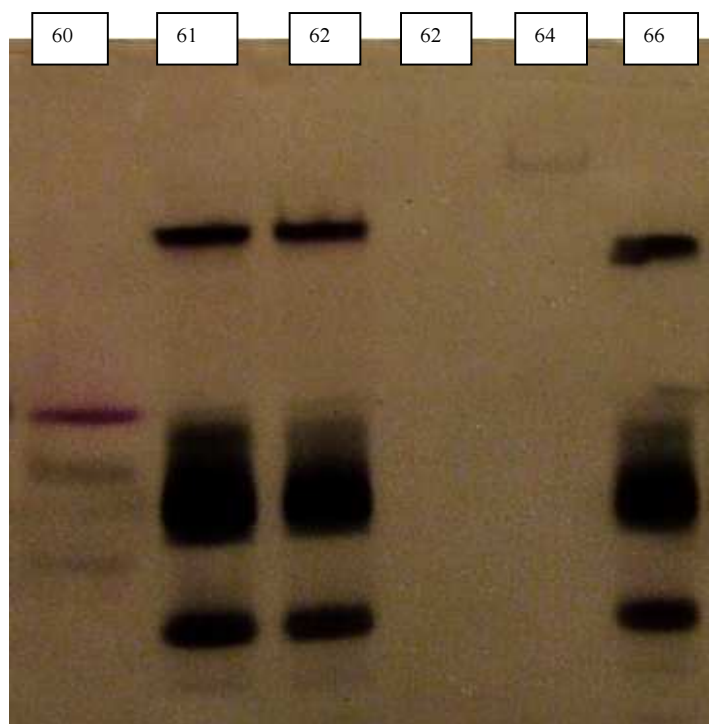


Figura 19: Gel de electroforesis revelado para aislamientos seleccionados

De los 52 aislamientos caracterizados se encontró similitud entre los patrones correspondientes a los aislamientos 2 y 4; 3, 5 y 8; 7 y 9; 11 y 14 y en los 61, 62 y 66. Se presume que cada una de las distintas agrupaciones anteriormente mencionadas representan a un mismo microorganismo o que estos se encuentran estrechamente relacionados. Esta afirmación se respalda en la igual correspondencia que mantienen estos grupos entre los *fingerprints* de isoenzimas con los de Box-PCR (figura 13).

5.6 Capacidad simbiótica

Las cepas caracterizadas provenientes del interior de nódulos de la leguminosa *Rhynchosia*, fueron sometidas a un ensayo de re-nodulación en plantas, en invernadero. Tal ensayo consistió en la inoculación, con cultivos puros de los aislamientos, aplicados en soporte tierra-vermiculita,

previamente a la incorporación de la semilla pre-germinada, en condiciones de cultivo vegetal controladas (figura 20). El ensayo se dio por finalizado, completado dos meses, luego de haber realizado la inoculación (comprendiendo crecimiento vegetativo y floración).



Figura 20: Imagen correspondiente al ensayo de re-nodulación en invernadero

Ninguno de los aislamientos caracterizados, provenientes del interior de nódulos esterilizados en superficie, consiguieron nodular la leguminosa.

Estos resultados difieren de los hallados por Garau *et al.*, 2009, quienes encontraron un microorganismo que presenta capacidad infectiva sobre la leguminosa *Rhynchosia*. El endófito nodulante corresponde al género *Burkholderia*.

El comportamiento no-nodulante de los aislamientos caracterizados podría atribuirse a la dificultad en la reproducción de las condiciones medioambientales que promueven la nodulación en especies de leguminosas nativas. Se propone como futuro ensayo la identificación de genes *nod* y *nif* de los microorganismos caracterizados para definir su potencial nodulante.

Otra posibilidad es que los aislamientos obtenidos no sean provenientes de los microorganismos infectivos que inducen la formación de nódulos en las raíces de leguminosas sino que se trate de aislamientos provenientes de una infección secundaria oportunista.

Resultados similares fueron encontrados por Muresu *et al.*, 2007, quien además menciona que la transición bacteriana desde el estado vegetativo al estado bacteroide de los rizobios simbioses se da en relación con la presencia de microorganismos correspondientes a otras taxas no-rizobiales, dejando abierta la pregunta de si la presencia de estos co-habitantes está involucrada en la incapacidad de recuperar rizobios en su forma cultivable en leguminosas nativas; y cuáles son las interacciones que se dan entre la comunidad microbiana que conlleva a la diferencia en la recuperación de rizobios en especies vegetales de cultivo intensivo respecto de especies leguminosas nativas.

La estrategia tradicional utilizada para la investigación de microorganismos nodulantes de leguminosas incluye su aislamiento y cultivo desde los tejidos internos de nódulos esterilizados en superficie (Vincent, 1979), siguiendo los postulados de Koch. La descripción de asociaciones simbioses entonces se basa en la capacidad cultivable de las bacterias endófitas del nódulo cuando son estriadas en placas con agar-YEM. Los rizobios nodulantes de leguminosas pueden perder su capacidad de división cuando colonizan el interior de estas estructuras, lo cual puede dificultar su aislamiento. A pesar de las transformaciones fisiológicas de las bacterias vegetativas en bacteroides sin capacidad de división, su cultivabilidad se deriva en que todavía existen células que no se han diferenciado en bacteroides, que estas recuperan su estado cultivable, o ambas. Desde este punto de vista, otra explicación a los resultados obtenidos, es que los rizobios nodulantes no pudieron aislarse porque se habían diferenciado a un estado no cultivable.

A pesar de la incapacidad de cultivar rizobios endosimbioses desde el interior de nódulos usando técnicas de cultivo estándares, ensayos de amplificación por PCR del gen que codifica para el 16S RNAr revela que la mayoría de los nódulos de leguminosas nativas contienen rizobios como población predominante (Muresu *et al.*, 2007).

6. Conclusiones y perspectivas futuras

Los datos presentados en el presente trabajo de tesina demuestran dos aspectos importantes que se presentan frecuentemente en trabajos similares dentro del campo de estudio de la rizobiología de leguminosas nativas:

- Ninguno de los aislamientos caracterizados presenta capacidad de inducir nuevamente la nodulación cuando son inoculados ajo condiciones microbiológicamente controladas.
- Los microorganismos caracterizados presentan gran variedad fenotípica (algunas de las cuales son promotoras del crecimiento vegetal) y genotípica, lo cual demuestra la diversidad bacteriana que cohabita con rizobios en el interior de nódulos de la leguminosa nativa dejando abierto el cuestionamiento acerca de su nicho ecológico dentro de estas estructuras especializadas.

Como continuación de este trabajo de tesina se propone la amplificación de genes *nif* y *nod* en los aislamientos caracterizados y la identificación de los aislamientos mediante secuenciación del gen que codifica para el ARN 16S.

Bibliografija

- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res.* 163:173-181.
- Ahmad, F., Ahmad, I., Khan, M.S. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of Azotobacter and fluorescent Pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Biol.*, 29, 29-34
- Andrade, G., Mihara, K.L., Linderman, R.G., Bethlenfalvay, G.J. 1997. Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant Soil.* 192: 71-79.
- Bai, Y., Zhou, X., Smith, D. 2003. Enhanced soybean plant growth due to coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci.* 43: 1774–1781.
- Babalola, O. O. 2010. Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnol Lett.* 32:1559-1570.
- Balachandar, D., Raja, P., Kumar, K., Sundaram, S.P. 2007. Non-rhizobial nodulation in legumes. *Biotechnol Mol Biol Rev.* 2: 48-57.
- Bassler, B. 2002. Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell.*109. 421-424
- Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Muresu, R., Giacomini, A. Squartini A. 2004. Gammaproteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 462–468.
- Bell, L.W., Bennett, R.G., Ryan, M.H., Clarke H. 2010. The potential of herbaceous native Australian legumes as grain crops: a review. *Renew Agr Food Syst.* 26:72–91.
- Bent, E., Tuzun, S., Chanway, C.P., Enebak, S. 2001. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 47: 793-800.

- Boddey, R.M., Dobereiner, J. 1995. Nitrogen fixation with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. *Fert. Res.* 42: 241-250.
- Bringhurst, R.M., Cardon, Z.G. 2001. Galactosides in the rizosphere: utilization by *Ensifer meliloti* and development of a biosensor. *PNAS.* 98: 4540-4545.
- Carreño, L., Viglizzo, E. 2007. Provisión de servicios ecológicos y gestión de los ambientes rurales en Argentina. Área estratégica de gestión ambiental. Ediciones INTA. Pp. 68.
- Cattelan, A.J., Hartel, P.G., Fuhrmann, J.J., 1999. Screening of plant growthpromoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63, 1670–1680.
- Chanway, C.P., Holl, F.B., 1993. First year yield performance of spruce seedlings inoculated with plant growth promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 39, 1084–1088.
- Chen W.M., Laevens S., Lee T.M., Coenye T., de Vos P., Mergeay M and Vandamme P. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1729-1735.
- Chen X., Schauder S., Potier N., Van Dorsselaer, Pelczer I., Bassler B.L., Hughson F.M. 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature.* 415-545
- Choudhary, S., Smidt-Dannert, C. 2010. Applications of quorum-sensing in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 1267-1279.
- De Freitas, J.R., Banerjee, M.R., Germida, J.J. 1997. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol. Fertil. Soil.* 24: 358-364.
- Demaría, M.R., Aguado-Suarez, I., Steinaker, D.F. 2008. Reemplazo y fragmentación de pastizales pampeanos semiáridos en San Luis, Argentina. *Ecología Austral.* 18: 55-70.

Deregibus, V.A., Cahupé, M.A. 1983. Pastizales naturales de la depresión del salado: utilización basada en conceptos ecológicos. Revista de Investigaciones Agropecuarias. Buenos Aires. INTA XVIII. 1: 47-78.

Deregibus, V.A., Soriano, A. 1981. Los pastizales de la zona de cría de la depresión del salado desde el punto de vista ecológico. Rev. Arg. De Producción Animal. 2: 60-83.

Doignon-Bourcier, F., Sy, A., Willems, A., Torck, U., Dreyfus, B., Gillis, M., de Lajudie, P. 1999. Diversity of Bradyrhizobia from 27 Tropical *Leguminosae* Species Native of Senegal. *System. Appl. Microbiol.* 22: 647-661.

Elliott, G.N., Chen W-M, Chou J-H, Wang H-C, Sheu S-Y, Perin L, Reis V.M, Moulin L, Simon M.F, Bontemps C., Sutherland J.M, Bessi R, de Faria S.M, Trinick M.J, Prescott A.R, Sprent J.I, James E.K. 2007. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen *ex planta*. *New Phytol.* 173: 168-180

Ernst, R., Morici E., Muiño W., Berrueta M.A. and Lerner P. 2011. “Comparación pre y post quema del banco de semillas germinable y total de gramíneas en un área del caldenal pampeano”. XXXIII Jornadas Argentinas de Botánica. Posadas. Misiones.

Estelrich, D., Cano, E. 1985. Disponibilidad forrajera y determinación de capacidad de carga de un bosque de *Prosopis caldenia*. En actas 1º jornadas de Biología y 2º Jornadas de Geología de La Pampa. UNLPam. 30-35.

Flaishman, M.A., Eyal, Z.A., Zilberstein, A., Voisard, C., Hass, D., 1996. Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust of wheat by recombinant cyanide producing strains of *Pseudomonas putida*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 9: 642–645.

Fuhrmann, J.J., Wollum A.G., 1989. Nodulation competition among Bradyrhizobium japonicum strains as influenced by rhizosphere bacteria and iron availability. *Biol. Fertil. Soil.* 7:108–112.

Garau, G., Yates, R.J., Deiana, P., Howieson, J.G. 2009. Novel strains of nodulating Burkholderia have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. *Soil Biol. Biochem.* 41:125-134.

Gaur, A.C.1990. Physiological functions of phosphate solubilizing micro-organisms. Omega Scientific Publishers, New Delhi.16-72.

Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109–114.

Glickman, E., Dessaux, Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 61:793–796.

González, J.E. and Marketon M.M. 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 574-92.

González, J.D, Keshavan, N.D. 2006. Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 859-875

Gonzalez-Lopez, J., Salmeron, V., Martinez-Toledo, M.V., Ballesteros, F., Ramos Cormenzana, A., 1986. Production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837 in chemically defined media and dialyzed soil media. *Soil Biol. Biochem.* 18: 119–120.

Gray, E.J., Smith, D.L. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil. Biol. Biochem.* 37: 395-412

Gupta, A., Saxena, A.K., Murali, G., Tilak, K.V.B.R. 1998. Effect of plant growth promoting rhizobacteria competitive ability of introduced *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) for nodulation. *J. Sci. Ind. Res.* 57: 720-725.

Halder A. K, Chakrabartty P. K. 1993. Solubilization of inorganic phosphates by Rhizobium. *Folia. Microbiol.* 38:325-330.

- Hallman, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., and Kloepper, J. W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43:895-914.
- Hernández, A. 1998. Caracterización de cepas de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* y *Pseudomonas fluorescens* aisladas de la rizosfera del maíz. La Habana. Tesis (en opción al grado científico de magíster en ciencias biológicas); Facultad de Biología. Universidad de la Habana.
- Hernández, A. N. 1996. Selección de rizobacterias para la biofertilización en el cultivo del maíz. La Habana. Tesis (en opción al título de magíster en ciencias biológicas); Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Hernández, M. 1994. Síntesis de ácido 3-indol acético a partir de fuente microbiana. Trabajo de Diploma. Facultad de Biología. Universidad de la Habana.
- Ibañez, F., I. Angelini, T. Taurian, M.L. Tonelli and A. Fabra. 2009. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic *Gammaproteobacteria*. *Syst. Appl. Microbiol.* 32: 49–55.
- Illmer P., Schinner F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil. Biol. Biochem.* 24:389-395.
- INTA. 2010. Taller: Especies Leguminosas para la región árida-semiárida central, Villa Mercedes (San Luis), 29 de junio de 2010.
- INTA. 2011. Diagnóstico y prospectiva del cultivo de especies leguminosas forrajeras extra-pampeanas en Argentina. Seminario Nacional. INTA EEA San Luis.
- Interrante, S.M.; Singh, R.; Islam, M.A.; Stein, J.D.; Young, C.A. Butler, T.J. 2011. Effectiveness of *Sinorhizobium* Inoculants on Annual Medics. *Crop. Sci.* 51: 2249-2255.
- Jacobo, E.J., Rodriguez, A.M., Bartolini N., Deregibus V.A. 2006. Rotational grazing effects on rangeland vegetation at a farm scale. *Rangeland Acol. Manage.* 59: 249-257.
- Khalid A., Arshad M., Zahir Z.A. 2004. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 96: 473-480.

Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. *Agron. Sustain. Dev.* 27: 29-43.

Kloepper, J.W., Lifshitz, R., Zablotowicz, R.M., 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends. Biotechnol.* 7: 39–43.

Kumar, V., Rishi Kumar, R.B., Narula, N. 2001. Establishment of phosphate-solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions. *Microbiol. Res.* 156: 87-93.

Kundu, B.S., Gaur, A.C. 1980. Establishment of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere and their effect on yield and nutrient uptake of wheat crop. *Plant Soil.* 57: 223-230.

Kuklinski-Sobral J., Araújo W., Mendes, R., Geraldi I., Pizzirani- Kleiner A., Azevedo J., 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 6: 1244-1251.

Lloret, L., Martínez-Romero, E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 47: 43-60.

Louws, F.J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. 1996. In: Toranzos G, (ed), *Nucleic Acid Amplification Methods for the Analysis of Environmental Samples.* Technomic Publishing Co. 63-94.

Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W. 1997. Bacterial communities of the rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber plants inoculated with a plant growth promoting rhizobacterium or its genetically modified derivative. *Can. J. Microbiol.* 43:344-353.

Mahaffee, W.F., Bauske, E.M., van Vuurde, J.W.L, van der Wolf, J.M., van den Brink, M., Kloepper, J.W. 1997. Comparative analysis of antibiotic resistance, immunofluorescent colony staining, and a transgenic marker (bioluminescence) for monitoring the environmental fate of a rhizobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1617-1622.

McClellan, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S.F., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., Williams, P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiol.* 143: 3703-3714.

Mehta, M.P., Butterfield, D.A., Baross, J.A. 2003. Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:960-970

Milkman, R. 1973. Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. *Science.* 182:1024-1026.

Morici, E., Ernst, E., Kin, A., Estelrich, D., Mazzola, M., Poey, S. 2003. Efecto del pastoreo en un pastizal semiárido de Argentina según la distancia a la aguada. *Archivos de Zootecnia.* 52: 59-66.

Morici, E., Doménech García, V., Gómez Castro, G., Kin, A., Saenz A., Rabotnikof, A. 2009. Diferencias Estructurales entre parches de pastizal del cardenal y su influencia sobre el banco de semillas, en la provincia de La Pampa, Argentina. *Agrociencia.* 43: 529-537.

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.

Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G., Cappuccinelli, P., Alberghini, S., Benhizia, Y., Benhizia H, Benguedouar, A., Mori, B., Calamassi, R., Dazzo, F.B., Squartini, A. 2008. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 63: 383-400

Murty, M.G., Ladha, J.K. 1988. Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plant. Soil.* 108:281-285.

Noda, S., Ohkuma, M., Usami, R., Horikoshi, K., Kudo, T. 1999. Culture-independent characterization of a gene responsible for nitrogen fixation in the symbiotic microbial community in the gut of the termite *Neotermes koshunensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4935-42.

Pacheco, A.R., Sperandio, V. 2009. Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host. *Curr. Opin. Microbiol.* 12: 192-198

Parsek, M.R., Greenberg, E.P. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends. Microbiol.* 13: 27-33.

Paruelo, J.M., Guerschman, J.P., Verón, S.R. 2005. Expansión agrícola y cambios en el uso del suelo. *Ciencia Hoy.* 15: 14-23.

Pazos, M., Hernández, A., Paneque, V. M., Santander, J. L. 2000. Caracterización de cepas del género *Azospirillum* aisladas de dos tipos de suelos de la localidad de San Nicolás de Bari. *Cultivos Tropicales (CU)* 21 (3): 19-23.

Patten, C.L., Glick, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42: 207-220

Peix, A., Rivas-Boyer, A.A., Mateos, P.F., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E., Velazquez, E. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil. Biol. Biochem.* 33:103-110.

Pérez-Miranda, S., Cabirol, N., George-Téllez, R., Zamudio-Rivera, LS., Fernández, FJ. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Methods.* 70:127-131

Reading, N., Sperandio, V. 2005. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 254(1):1-11.

Roberto, Z., Adema, E., Rucci, T. 2005. Relevamiento fisonómico de la vegetación en el área del caldenal. Publicación Técnica N° 60. INTA EEA Anguil. 24.

- Rodríguez, H., Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotech. Adv.* 17:319-339.
- Ruiz, M. A., Lorda, G. Ernst, R. D., C. Castaño C., F. Pagliero F., Gil Báez C. A. 2013. Leguminosas nativas herbáceas de la región semiárida pampeana (Argentina). VII Congreso Nacional. III Congreso del Mercosur de Pastizales Naturales. ISBN: 978-950-863-193-0
- Ryan, R.P., Down, J.M. 2008. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiol.* 154: 1845-1858.
- Sala, O.E., Oesterheld, M., León, R.J.C., A. Soriano, A.1986. Grazing effects upon plant community structure in subhumid grasslands of Argentina. *Vegetation.* 67: 27-32.
- Sanchez-Contreras, M., Bauer, W.D., Gao, M., Robinson, J.B., Downie, J.A. 2007. Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 362(1483): 1149–1163.
- Scher, F.M., Baker, R., 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathol.* 72, 1567-1573.
- Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 47–56.
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N., Whittam, T. S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl environ microbiol.* 51: 873-884
- Shanahan, P., O’Sullivan, D.J., Simpson, P., Glennon, J.D., O’Gara, F. 1992. Isolation of 2,4-diacetylphlorogucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 353- 358.
- Strezelczyk, E., Kampert, M., Le, C. I. 1994. Effect of plant growth hormones on growth of *Azospirillum sp.* in media with carbon sources. *Acta Microbiol. Polonica.* 43: 89-95.

Surange, S., Kumar, N. 1993. Phosphate solubilization under varying pH by *Rhizobium* from tree legumes. *Indian J. Exp. Biol.* 31:855-857.

Torres-Rubio, M.G., Valencia-Plata, S.A., Bernal-Castillo, J., Martinez-Nieto, P. 2000. Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter* sp. and *Pseudomonas* sp., Producers of Indol-3-Acetic Acid and Siderophores, from Colombian Rice Rhizosphere. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 42:171-176.

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., Lupski, J.R. 1994 Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Cell. Mol. Biol.* 5: 25-40.

Vincent, J.M., 1970. In: Vincent, J.M. (Ed.), A Manual of Practical Study of Root Nodule Bacteria. Blackwell, Oxford.

Waters, C.M., Bassler, B.L. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21: 319-46.

Whitehead, N.A., Barnard, M.L., Slater, H., Simpson, J.L., Salmond, G. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365-404.

Xie, H., Pasternak, J.J., Glick, B.R. 1996. Isolation and characterization of mutants of plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 that over produce indoleacetic acid. *Curr. Microbiol.* 32: 67-71.

Zabala, J.M., Giavedoni, J., Tomas, P.A., Budini, E.A. 2010. Variabilidad en caracteres morfológica relacionados con la implantación de *Desmantus virgatus* (L.) Willd. Y *Desmantus paspalaceus* (Lindm.) Burkart. *Agriscientia.* 27: 97-105.

Zakhia, F., Jeder, H., Domergue, O., Willems, A., Cleyet-Marel, C.J., Gillis, M., Dreyfus, B., de Lajudie, P. 2004. Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infraarid zone of Tunisia. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 380-395.

Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B., de Lajudie, P. 2006. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH* like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial. Ecol.* 51: 375–393.

Zehnder, G., Kloepper, J., Tuzun, S., Yao, C. Wei, G., Chambliss, O., Shelby, R. 1997. Insect feeding on cucumber mediated by rhizobacteria-induced plant resistance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83: 81-85.

Zehnder, G., Kloepper, J., Yao, C., and Wei, G. 1997. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (Coleoptera: *Chrysomelidae*) by plant growth promoting rhizobacteria). *J. Econ. Entomol.* 90:391-396.

Zehnder, G.W., Yao, C., Murphy, J.F., Sikora, E.R., Kloepper, J.W., Schuster, D.J., Polston, J.E., 1999. Microbe-induced resistance against pathogens and herbivores: evidence of effectiveness in agriculture. In: Agarwal, A.A., Tuzun, S., Bent, E. (Eds.), *Induced Biochemistry, Ecology and Agriculture*. APS Press, StPaul, MN. 33.