

## Los rizobios que nodulan la soja en sitios con ambientes nativos y cultivados de la Argentina.

Silvina M. Y. López <sup>(a)</sup>, Graciela N. Pastorino <sup>(ab)</sup>, Virginia Martínez Alcántara <sup>(ab)</sup>, Darío Salvucci <sup>(a)</sup> y Pedro A. Balatti <sup>(bc)</sup>

a). Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE) - Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales - Universidad Nacional de La Plata. b). Cátedra de Microbiología Agrícola - Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales – UNLP. c). Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) - Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales – UNLP.

### Resumen

La soja es una leguminosa que establece simbiosis con diez especies distintas de Rizobios entre las que se encuentran bacterias de crecimiento rápido y lento. La interacción es el resultado de la expresión de un conjunto de genes en la planta y en la bacteria. En este trabajo se describe que los cultivares de soja de la Argentina presentan variabilidad en su capacidad de nodulación y que se han encontrado dos satélites asociados a este carácter. Por otro lado el análisis de la diversidad en los suelos sin historia del cultivo de soja demostró que los rizobios nativos de esas áreas podrían aportar genes para la evolución de los rizobios simbiotes de la soja. Es más, la diversidad de los suelos y ambientes en los que se cultiva la soja es probable conduzca a la evolución de aislamientos con capacidades simbióticas contrastantes.

**Palabras clave:** Soja – *Bradyrhizobium* – Nodulación - Marcadores moleculares - Diversidad

## Introducción

La soja es una planta de la familia Fabaceae, su origen está asociado a las provincias del noroeste de China y Manchuria. En el año 2853 A.C. el emperador de China Sheng-Nung la nombró planta sagrada, momento en el que se convirtió en un grano importante. Fue domesticada en el noreste de Asia entre 3000 y 5000 años A.C. La primera planta de soja domesticada se documentó en el este de Asia y provenía de Daudong y del río Nam in Korea del Sur (Crawford and Lee 2003), lo que confirma el sitio de domesticación que ocurrió entre los años 3000 y 5000 A.C. (Hymowitz, 2004). Entre los años 1700 y 110 A.C. en el oeste de la China fue cultivada como una forrajera y a partir del año 100 A.C. fue introducida en países como Japón, Indonesia, Filipinas, Vietnam, Tailandia, Malasia, Burma, Nepal y la India y a partir de estos países, siguiendo las rutas del comercio internacional, se dispersó por el mundo. Los taxónomos sugieren que los cultivares comerciales de soja *Glycine max* (L.) Merr, derivan de *Glycine soja* (syn *G. usuriensis* o *G. formosana*), Regal and Mack, una planta trepadora anual que se encuentra en el norte de China en Korea, Taiwan y Japón (Broich and Palmer, 1981; Hymowitz, 1981).

La soja de la misma manera que otras leguminosas establecen simbiosis con bacterias del suelo conocidos comúnmente como rizobios. La soja establece simbiosis con *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982), *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall, 1992) *Bradyrhizobium liaoningense* (Xu, 1995), *Bradyrhizobium yuamingense* (Yao, 2002) *Bradyrhizobium canariensis* (Vinuesa et al., 2005), *Bradyrhizobium daqingense* (Wang et al, 2013) *Ensifer fredii*, *Ensifer sojae* (Chen et al, 1988), *Mesorhizobium tianshanense* (Chen, 1995) y *Rhizobium tropici* (Hungria et al, 2006). El género *Bradyrhizobium* tiene cierta complejidad en lo que hace a su constitución que ha sido el resultado de la identificación de nuevas especies de organismos que interactúan con diversas plantas (Tabla 1). Koppell and Parker (2012) sugirieron que la promiscuidad parece ser una característica de los integrantes del género *Bradyrhizobium*.

Tabla 1. Especies bacterianas que conforman el género *Bradyrhizobium*. <sup>a</sup>= nombre de la especie, <sup>b</sup>= cepa tipo, simbología con que se la puede encontrar en la bibliografía; <sup>c</sup>= Número de acceso al NCBI de cada una de las secuencias del gen *16S rRNA*.

Nombre de la especie	Cepa Tipo <sup>b</sup>	16S rRNA <sup>c</sup>	Referencia Bibliográfica
<i>B. arachidis</i>	CCBAU 051107 =CGMCC 1.12100T = HAMB1 3281 = LMG 26795	HM107167	Wang R., Rui Wang, Yue Li Chang, Wen Tao Zheng, Dan Zhang, Xiao Xia Zhang, Xin Hua Sui, En Tao Wang, Jia Qi Hu, Li Ya Zhang, Wen Xin Chen: <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2013, <b>63</b> , 616-624.
<i>B. betae</i>	PL7HG1 = CECT 5829 = LMG 21987 = NBRC 103048.	<a href="#">AY372184</a> .	Rivas R., Willems A., Palomo J., García-Benavides P., Mateos P., Martínez-Molina E., Gillis M. and Velázquez E.: <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2004, <b>54</b> , 1271-1275.
<i>B. canariense</i>	BTA-1 = ATCC BAA-1002 = CFNE 1008 = LMG 22265 = NBRC 103049.	<a href="#">AJ558025</a>	Vinuesa P., León-Barrios M., Silva C., Willems A., Jarabo-Lorenzo A., Pérez-Galdona R., Werner D. and Martínez-Romero E.: <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2005, <b>55</b> , 569-575.
<i>B. cytisi</i>	CTAW11 = CECT 7749 = LMG 25866.	<a href="#">EU561065</a> .	Chahboune R., Carro L., Peix A., Barrijal S., Velázquez E. and Bedmar E.J.: <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2011, <b>61</b> , 2922-2927.
<i>B. daqingense</i>	CCBAU 15774 = CGMCC 1.10947 = HAMB1 3184 = LMG 26137.	<a href="#">HQ231274</a>	Wang J.Y., Wang R., Zhang Y.M., Liu H.C., Chen W.F., Wang E.T., Sui X.H. and Chen W.X.: <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2013, <b>63</b> , 616-624
<i>B. denitrificans</i>	ATCC 43295 = DSM 1113 = HAMB1 2266 = LMG 8443 = VKM B-2062.	<a href="#">X66025</a> .	Van Berkum P., Leibold J.M. and Eardly B.D.: <i>Syst. Appl. Microbiol.</i> , 2006, <b>29</b> , 207-215
<i>B. elkanii</i>	USDA 76 = ATCC 49852 = DSM 11554 = IFO (now NBRC) 14791 = LMG 6134.	<a href="#">U35000</a> .	Kuykendall L.D., Saxena B., Devine T.E. and Udell S.E.: <i>Can. J. Microbiol.</i> , 1992, <b>38</b> , 501-505.
<i>B. huanghuaihaiense</i>	CCBAU 23303 = CGMCC 1.10948 = HAMB1 3180 = LMG 26136	<a href="#">HQ231463</a> .	Zhang Y.M., Li Y.J., Chen W.F., Wang E.T., Sui X.H., Li Q.Q., Zhang Y.Z., Zhou Y.G. and Chen W.X.: <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2012, <b>62</b> , 1951-1957.
<i>B. iriomotense</i>	EK05 = LMG 24129 = NBRC 102520.	<a href="#">AB300992</a>	Kawasaki H., Muramatsu Y., Nakagawa Y. and Seki T.: <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 2008, <b>72</b> , 1416-1429.
<i>B. japonicum</i>	strain ATCC 10324 = CCUG 27876 = CIP 106093 = DSM 30131 = HAMB1 2314	<a href="#">U69638</a>	Jordan D.C.: <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , 1982, <b>32</b> , 136-139.
<i>B. jicamae</i>	PAC68 = CECT 7395 = LMG 24556.	<a href="#">AY624134</a>	Ramírez-Bahena M.H., Peix A., Rivas R., Camacho M., Rodríguez-Navarro D.N., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Willems A. and Velázquez E.: <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2009, <b>59</b> , 1929-1934.
<i>B. lablabi</i>	CCBAU 23086 = HAMB1 3052 = LMG 25572	<a href="#">GU433448</a>	Chang Y.L., Wang J.Y., Wang E.T., Liu H.C., Sui X.H. and Chen W.X.: <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2011, <b>61</b> , 2496-2502.
<i>B. liaoningense</i>	ATCC 700350 = CIP 104858 = NBRC 100396 = LMG 18230.	<a href="#">AF208513</a>	Xu L.M., Ge C., Cui Z., Li J. and Fan H.: <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , 1995, <b>45</b> , 706-711
<i>B. oligotrophicum</i>	ATCC 43045 = JCM 1494 = LMG 10732.	<a href="#">JQ619230</a> .	Ramírez-Bahena M.H., Chahboune R., Peix A. and Velázquez E.: <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2013, <b>63</b> , 1013-1016.
<i>B. pachyrhizi</i>	PAC48 = CECT 7396 = LMG 24246	<a href="#">AY624135</a> .	Ramírez-Bahena M.H., Peix A., Rivas R., Camacho M., Rodríguez-Navarro D.N., Mateos P.F., Martínez-Molina E., Willems A. and Velázquez E.: <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2009, <b>59</b> , 1929-1934.
<i>B. rifense</i>	CTAW71=LMG26781=CECT8066	EU561074	Chahboune R., Carro L., Peix A., Ramírez-Bahena, M.H., Barrijal S., Velázquez E., Bedmar E.J.: <i>Systematic and applied microbiology</i> , 2012, <b>35</b> , 302-305.
<i>B. yuanmingense</i>	CCBAU 10071 = CFNEB 101 = CIP 108027 = NBRC 100594	<a href="#">AF193818</a>	Yao Z.Y., Kan F.L., Wang E.T., Wei G.H. and Chen W.X.: <i>Int. J. Syst. Evol. Microbiol.</i> , 2002, <b>52</b> , 2219-2230.

Los organismos que interactúan tienden a evolucionar en conjunto porque comparten los ambientes (Stukenbrock and McDonald, 2008), es decir que las regiones de origen de la soja son potenciales fuentes de rizobios que nodulan y fijan nitrógeno con la soja. Si bien hasta no hace tanto tiempo se consideraba que nodulaba solo con *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner, 1896), una bacteria de crecimiento lento. Más recientemente, Trinick (1980) en suelos de Papua Nueva Guinea, Keyser et al. (1982) y Dowdle and Bohlool (1985) en suelos de la China describieron la existencia de estirpes de rizobios de crecimiento rápido que nodulan la soja. A esto le siguieron investigaciones realizadas por Cleyet Marel (1987) en Vietnam en donde también aisló bacterias de crecimiento rápido que nodulan soja. Más tarde investigadores chinos y Europeos realizaron un detallado estudio de los suelos y los rizobios presentes (Thomas Oates et al., 2003; Camacho et al., 2002; Chen et al., 2004; Zhang et al., 2011; Li et al., 2011). Se encontró que en las regiones tropicales y subtropicales de China con climas húmedos y suelos ácidos la soja establece simbiosis con *B. japonicum*, *B. elkanii* y difícilmente con *B. liaoningense*, *B. yuanmingense* y *B. canariensis* (Barcellos et al., 2007; Yang, 2006), excepto en Hubei sitio de donde se aislaron diversas cepas de *Ensifer fredii* (Camacho et al., 2002). En Heilongjiang, una provincia al Noreste de la China que tiene clima húmedo y suelos neutros o ligeramente ácidos, la soja es nodulada primordialmente por *B. japonicum*, muy poco por *B. elkanii* y nunca por *E. fredii* (Wang et al., 2009). Tanto la provincia de Hubei como de Heilongjiang se cree que son los centros de origen de la soja. Esta también fue introducida en la provincia de Xinjiang, que tiene clima seco y suelos alcalinos en los que las especies de rizobios que nodulan soja son *Ensifer fredii* y *B. liaoningense* (han et al., 2009). Es importante destacar que en los sitios descriptos se cultivan distintos cultivares de soja. Todos estos resultados sugieren entre otras cosas que la diversidad de los rizobios que interactúan con la soja no es completamente clara, además de que los rizobios nodulan preferencialmente con ciertos materiales genéticos y por lo tanto el cultivar utilizado como trampa define la diversidad encontrada. Por otro lado también se concluyó que el pH de los suelos y la disponibilidad de un conjunto de nutrientes claves definen la distribución geográfica de los rizobios.

La capacidad de la soja para interactuar con los rizobios está determinada genéticamente y cada cultivar de soja responde específicamente a la interacción con cepas seleccionadas y en este sentido no solo se han identificado genes que regulan la respuesta de la planta a determinadas bacterias (Balatti, 200), sino que además se identificaron caracteres cuantitativos asociados a marcadores SSR que determinan la capacidad de nodulación de la soja (Nicolas et al., 2006; Santos et al., 2006; Salvucci et al., 2011). Más aún, Yang et al. (2010) encontraron que la respuesta de incompatibilidad de algunos cultivares de soja con estirpes de *Ensifer fredii* se debía a la presencia de un gen de resistencia a enfermedades. Es posible que de la misma manera que los genes de resistencia determinan que la planta reconozca a las bacterias patógenas, algo similar ocurra con los rizobios, desencadenando así una reacción de hipersensibilidad.. Una de las características de los rizobios es la especificidad, esto es que una bacteria aun con su genoma completo solo induce formación de nódulos fijadores de nitrógeno en una planta pero no en la otra, lo que podría estar regulado al menos en parte por los genes de resistencia a enfermedades que se encuentran en gran cantidad en el genoma de las plantas.

Con la idea de identificar interacciones leguminosa-rizobios de alto potencial de fijación de nitrógeno se trabajó sobre la planta de soja. Se evaluó si los marcadores moleculares asociados a caracteres cuantitativos de nodulación, descritos por otros investigadores, son herramientas útiles para identificar estos caracteres en los cultivares nacionales. El objetivo general fue identificar cultivares con alta capacidad de nodulación. Al mismo tiempo, se analizó la población de rizobios simbiotes de la soja, con el fin fue identificar cepas con mejores aptitudes simbióticas, en suelos de la provincia de Salta, sin historia del cultivo de soja pero con leguminosas nativas y en suelos con historia del cultivo de soja bajo distintos sistemas de manejo. Considerando el primer objetivo se procedió a evaluar la capacidad de nodulación de materiales provenientes de tres semilleros Nidera, Santa Rosa y Don Mario. Se trabajó con 30 cultivares de cada compañía. En la Figura 1 se presentan resultados parciales y representativos de los ensayos.

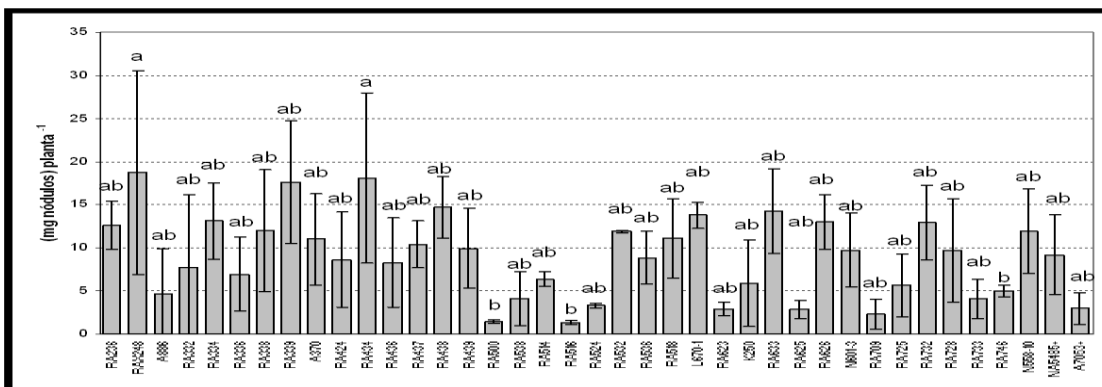


Figura 1 Capacidad de nodulación de cultivares comerciales de soja provenientes del semillero Santa Rosa. Los resultados son promedios de 10 plantas de cada cultivar. Letras iguales diferencias no significativas, letras distintas diferencias significativas al nivel del 5%

En primer lugar se demostró que los materiales genéticos de soja varían en su capacidad de nodular. Los cultivares de baja capacidad de nodulación desarrollaron 2.5 veces menos nódulos que los cultivares de alta capacidad de nodulación. Esto último también se confirmó realizando estudios de caracteres cuantitativos y cualitativos de un set de cultivares comerciales de argentina y tres cultivares de Brasil. Un grupo contuvo plantas altas, de crecimiento indeterminado y ciclo de vida largo, otro de plantas de baja altura, crecimiento determinado y ciclo de vida largo y un tercer grupo con plantas de altura y ciclo de vida medio; mientras los cultivares de los primeros dos grupos mostraron baja capacidad de nodulación, los del tercer grupo mostraron alta capacidad. En estos mismos estudios se asociaron dos microsateélites Satt 251 y Satt 233 con la capacidad de nodulación de los cultivares comerciales de soja argentinos. Este carácter variable de la nodulación y fijación de N es probable que responda al aporte de un conjunto de genes. Se han realizado cruzamientos entre cultivares de alta y baja capacidad de nodulación, se obtuvieron las F1 y se procedió a generar la F2. En la descendencia se evaluó el fenotipo de nodulación y se analizaron los genomas de estas plantas con marcadores SSR. En estos momentos se están construyendo los mapas de ligamiento (Salvucci, Aulicino, Balatti datos no publicados).

La biología molecular ha aportado herramientas útiles para la identificación de las especies de bacterias que interactúan con las leguminosas pero además, ha permitido realizar

no solo el análisis de la diversidad, sino determinar cuáles fueron los procesos que la generaron. La secuencia del 16S *rRNA* ha contribuido fuertemente a nuestra comprensión de los grupos bacterianos, sin embargo como es una secuencia muy conservada no muestra determinados niveles de variabilidad (Willems et al., 2001). La región espaciadora del 16S *rRNA* y el 23S *rRNA* es variable tanto en el largo como en la secuencia nucleotídica (Gurtler and Stanisich, 1996, Willems 2003). Además los *Bradyrhizobium* contienen regiones repetitivas del genoma RSc $\alpha$ , RS $\beta$  y IS1631, que son conservadas y se encuentran dispersas en el genoma (Minamisawa, 1998). Vale la pena destacar que las secuencias repetitivas descritas en *Bradyrhizobium* se ubican primordialmente en la isla simbiótica y que esta bacteria en general evoluciona sufriendo re-arreglos y recombinaciones en el genoma (Vinuesa, 2005). Otras herramientas moleculares utilizadas son las secuencias BOX, REP y Eric descritas por De Bruijn (1992). En base a todo lo dicho y a la potencialidad de cada marcador se desarrollaron un conjunto de reacciones REP, BOX, Multiplex PCR-RSc $\alpha$  tendientes a identificar a los aislamientos de *Bradyrhizobium* (López y Balatti, 2012)

Burkart (1943) ha descrito un número importante de leguminosas nativas de las cuales se conoce muy poco en lo que hace a las estirpes con las que establecen interacciones simbióticas. En base a la bibliografía y trabajos realizados con estas especies u otras relacionadas en otros sitios del planeta, se conoce que muchas de ellas establecen simbiosis con rizobios de crecimiento lento muy probablemente pertenecientes al género *Bradyrhizobium*. Esto y el hecho de que los bradyrizobios son promiscuos, hacen que los rizobios simbióticos de las especies nativas sean potenciales simbiosistas de soja y por lo tanto competidores de los inoculantes comerciales. Se analizó con reacciones de PCR con primers BOX la diversidad de aproximadamente 160 aislamientos provenientes de sitios de la provincia de Salta con plantas nativas. En el análisis se incluyeron las estirpes de *Bradyrhizobium* que se utilizan en los inoculantes comerciales de Argentina (E109=USDA138; Semia 5019; Semia 587, Semia 5079 y Semia 5080). Los resultados se presentan en la Figura 2.

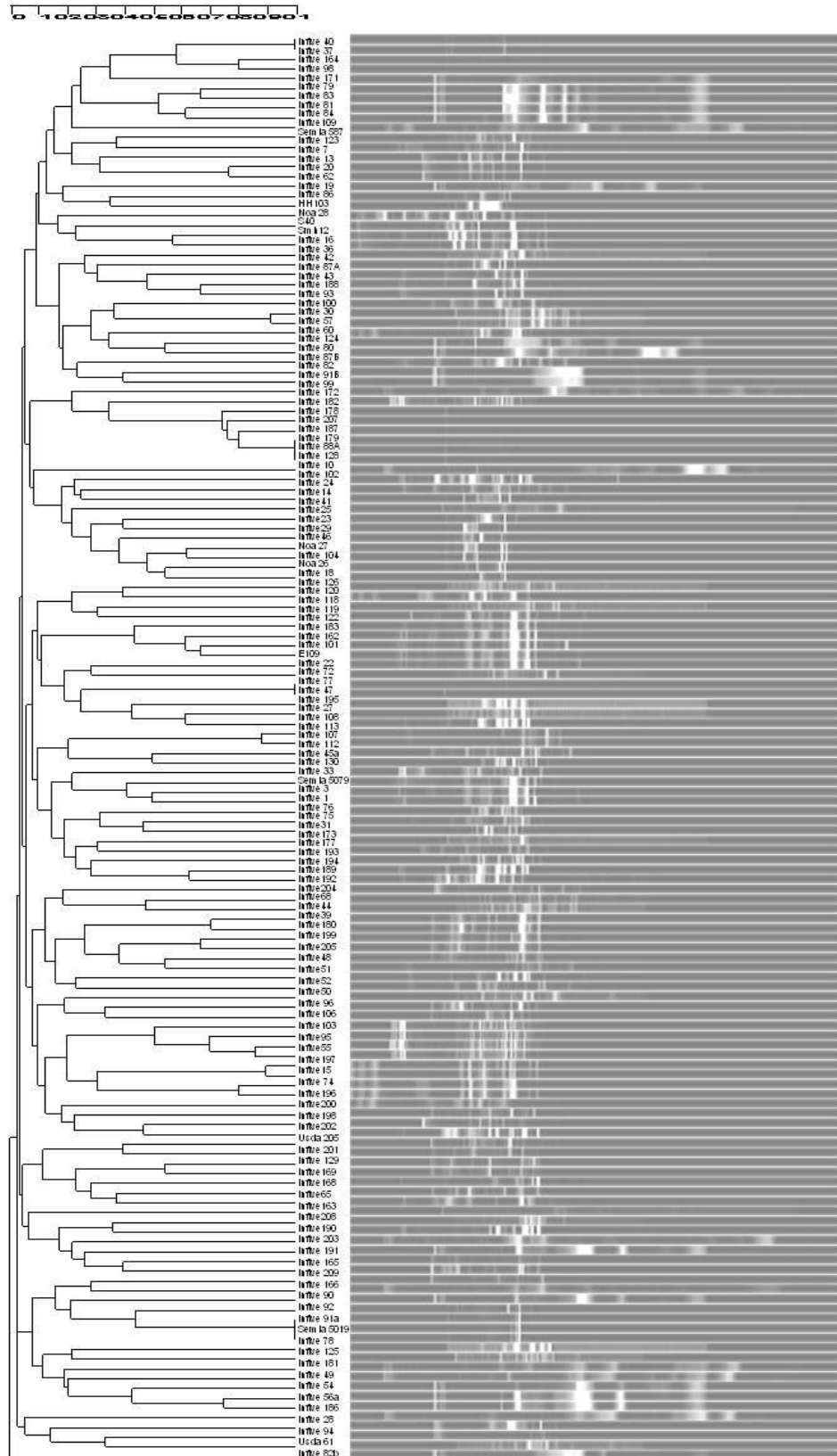


Figura 2 Rizobios aislados de suelos del norte Argentino sin historia del cultivo de la soja.



Se observa en primer lugar que el nivel de diversidad es considerable y que los aislamientos no se agruparon en clados que contengan las cepas comerciales de *Bradyrhizobium*. Más aún, dos de los aislamientos fueron de crecimiento rápido lo que se confirmó por medio de la reacción de multiplex PCR (Pastorino et al, 2003), esta reacción demostró la presencia de genes específicos del genoma de *E. fredii*. El resto de los aislamientos fueron de crecimiento lento y contuvieron secuencias repetitivas RSc por lo que probablemente son Bradyrizobios. Estas estirpes desarrollaron nódulos en cultivares comerciales de soja, si bien un grupo lo hizo más eficientemente en cowpea. Además, el análisis de las pruebas fisiológicas agrupó, por un lado a las especies que nodularon la soja que fueron aproximadamente 90 y por otro lado a las que nodularon el cowpea que fueron aproximadamente 70. Otra observación fue que los aislamientos no se agruparon en base a su origen geográfico, lo que quiere decir que los genotipos bacterianos no estuvieron influenciados por el ambiente o alternativamente que los ambientes muestreados presentaron características similares. Melchiorre et al (2011) y Chavez Díaz et al (2013) analizaron la diversidad de los rizobios en suelos de la Argentina, si bien los objetivos fueron distintos. Melchiorre identificó cepas resistentes a condiciones de estrés de agua y en los estudios realizados en diversos lotes encontró altos niveles de diversidad. Chávez Díaz describió la diversidad de los rizobios que nodulan *Prosopis alba* en los suelos del parque chaqueño y también encontró niveles considerables de diversidad. Vinuesa et al. (2005) demostró incongruencias entre árboles filogenéticos realizados con "house keeping genes" y genes de simbiosis, sugiriendo que es muy frecuente la transferencia horizontal de genes entre representantes de *Bradyrhizobium*, y esta sería una manera de adquirir genes de resistencia a estreses ambientales.

La diversidad de los rizobios también se estudió en aislamientos realizados a partir de suelos bajo distinto sistema de manejo, uno de siembra directa con cultivo antecesor soja y otro de labranza convencional con cultivo antecesor maíz. Los rizobios se aislaron por medio de plantas trampa, para lo cual semillas de soja esterilizadas superficialmente se inocularon con una

serie de diluciones de suelo. Nuevamente se analizó la diversidad, con fingerprints generados con primers BOX, en este caso el total de aislamientos analizados fue de 200 (Figura 3).

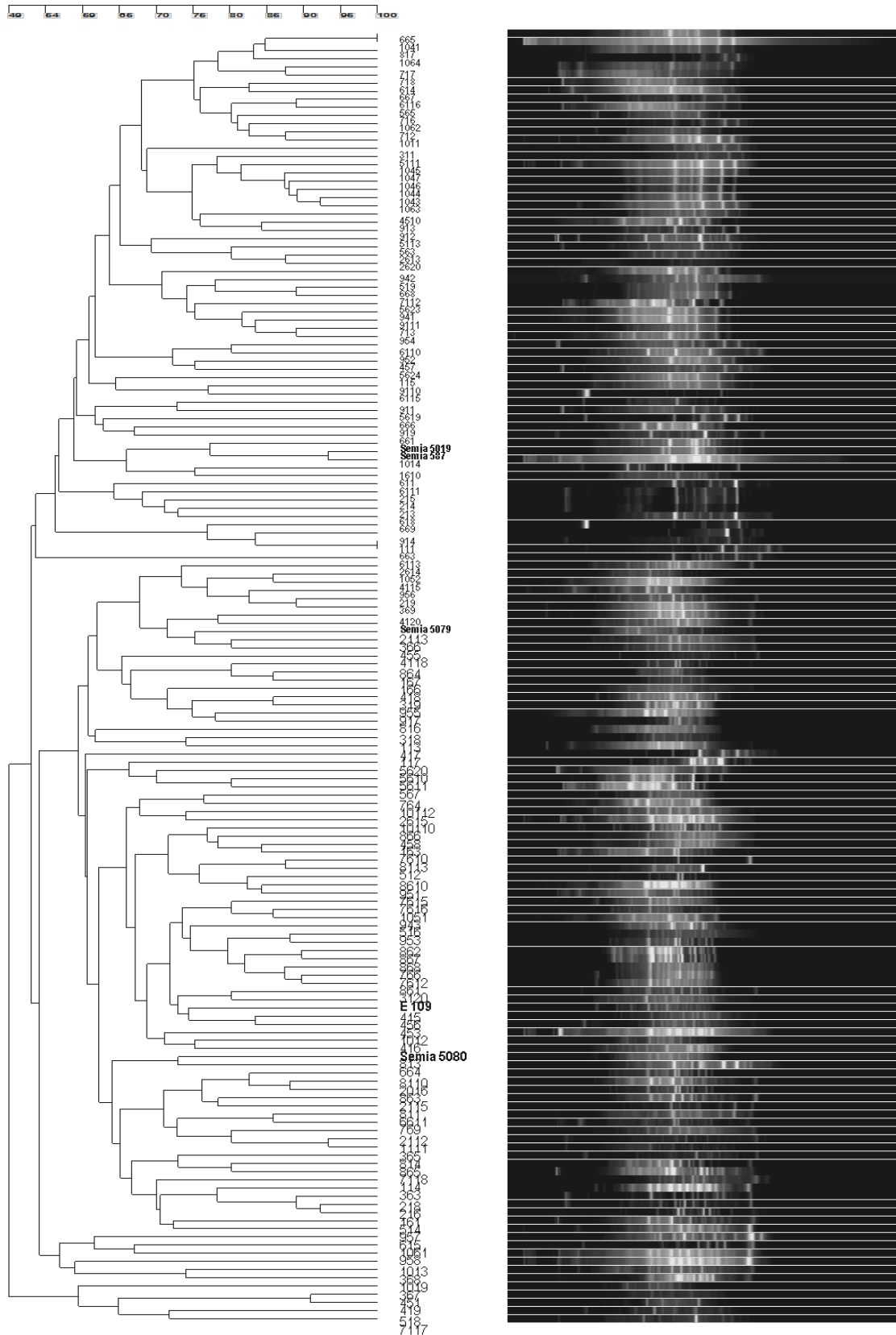


Figura 3 Rizobios bajo distinto sistema de manejo (siembra directa con cultivo antecesor soja y labranza convencional con cultivo antecesor maíz).

La diversidad de los bradyrizobios no estuvo relacionada con la dilución de suelo a partir de la cual se obtuvieron. E ha mencionado que en algunos estudios distintas diluciones de suelo muestran niveles de diversidad distintos. En todos los análisis siempre se incluyeron las cinco estirpes de rizobios con que se formulan los inoculantes comerciales E109 (USDA123), SEMIA5019, SEMIA587, SEMIA5079 y SEMIA5080. El porcentaje de haplotipos distintos fue de aproximadamente 38%; dicho de otra manera, los 200 aislados están representados en aproximadamente 70 haplotipos. En la Figura 3 se presenta el fenograma realizado sobre la base del análisis de agrupamiento de los fingerprint BOX. Se observa que los patrones de las cepas comerciales aparecen en el fenograma mezclados con el resto de los aislamientos. Además estos no se agruparon en base al sitio de recolección ni en base a la especie de bradyrizobio. Los aislamientos se analizaron con los fragmentos RSa y se observó que si bien gran parte de los aislamientos son *Bradyrhizobium japonicum*, otros aislamientos que producen en medio extracto de levadura-manitol-agar pequeñas colonias a los 7 días de cultivo son *B. elkanii*. Esto además fue confirmado en base a la secuencia del ITS (Figura 4).

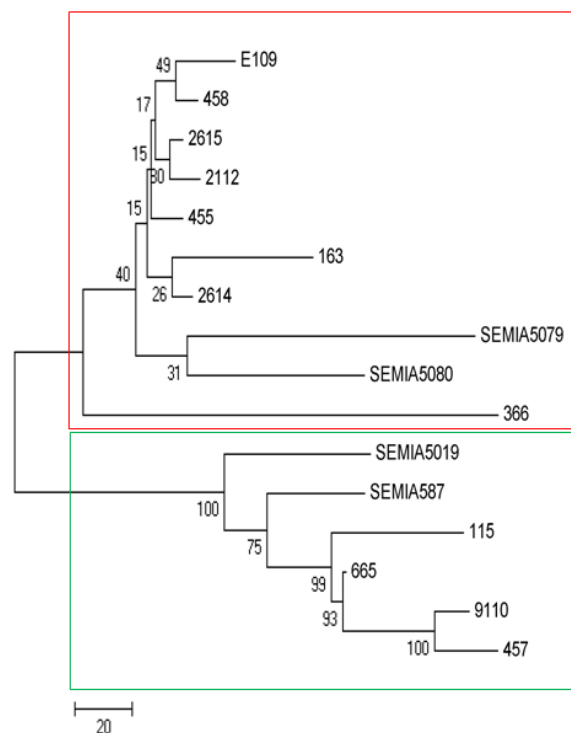


Figura 4 Análisis de secuencias ITS de rizobios aislados de suelos y cepas controles de las especies *B. japonicum* y *B. elkanii*, utilizadas en formulaciones comerciales.

Los rizobios se adaptan a diversos suelos lo que resulta en la aparición de linajes adaptados a condiciones específicas (Koppel and Parker, 2012). Ellos encontraron que en regiones endémicas en las que *B. japonicum* y *B. elkanii* comparten ambientes, en general *Bradyrhizobium* cambia sus estructura de población por sobre los linajes, que suelen ocupar lugares o sitios distintos y distantes. Esto quiere decir que las características ambientales de los suelos pueden generar linajes o grupos de *Bradyrhizobium* u otros rizobios con características propias, tal cual se describió que ocurrió en los suelos de China. Algo importante, que aún no está claro, es si es común que las leguminosas establezcan relaciones exclusivas con ciertos rizobios, o si es que se asocian con rizobios menos especializados que pueden asociarse con otras leguminosas que coexisten. Este sería el caso de lo encontrado en los suelos de Salta en donde probablemente simbioses de plantas nativas nodulan soja. Recientemente, Tian et al. (2013) demostraron que el genoma de *Bradyrhizobium* es desproporcionadamente rico en lípidos y metabolitos secundarios; por otro lado, genes de osmo-protección y de adaptación a pH alcalino son específicos del genoma de *Sinorhizobium*. Estos resultados sugieren que los genomas de los rizobios evolucionan preferentemente por recombinación que incluye a la transferencia lateral de genes; y en esto, la adaptación de los rizobios a interacciones simbióticas y otras condiciones ambientales demanda incorporar genes de protección procedentes de otros linajes, en lo que es un proceso de especiación que ocurre permanentemente en el suelo.

Siguiendo con el análisis de los aislamientos de suelos con diversos manejos, se seleccionaron 12 representantes (115, 665, 457, 9110, 2614, 2615, 163, 366, 458, 2112, 455 y 953). Estos aislados fueron evaluados en un ensayo bajo condiciones controladas en lo que hace a su capacidad de fijación de nitrógeno, lo que se determinó indirectamente en base al peso seco de la parte aérea de las plantas. El ensayo consistió en 18 tratamientos con 10 repeticiones de cada uno, en el mismo se incluyeron además las cepas de uso comercial de *B. japonicum* (Semia 5079, Semia 5080 y E109) y *B. elkanii* (Semia 587y Semia 5019). Se encontró que las plantas inoculadas con las cepas de crecimiento lento 366, 115, 665, 457, 2614, 2615,

458, 2112, 455 y 953 mostraron una mayor producción de biomasa vegetal que las plantas inoculadas con la cepa de control E109. También se observó que en las plantas inoculadas con las cepas 366 y 665 se produjo una mayor biomasa de nodular que en las plantas inoculadas con la cepa E109 y las plantas inoculadas con la cepa 953 mostraron una menor producción de biomasa nodular en relación a la cepa E109 control. Estos resultados fueron reconfirmados en dos nuevos test de inoculación de plantas, con una sub-selección de cepas que en el primer ensayo mostraron comportamientos contrastantes a la cepa E109, conforme se continuaba con la caracterización de las mismas.

Simultáneamente, se realizó una caracterización genética de los aislados con marcadores moleculares REP, BOX, Multiplex PCR-RSα. El conjunto de estas secuencias suelen ser útiles para diferenciar aislados de *Bradyrhizobium* en al menos dos grupos, uno de cepas de *B. elkanii* y el otro de *B. japonicum* (López y Balatti, 2012). La combinación de los fingerprints generados por este conjunto de marcadores permitió diferenciar los genomas de las cinco cepas comerciales más utilizadas en inoculantes comerciales de Brasil, Uruguay y Argentina. Además, el análisis de la combinación de fingerprints generados con REP, BOX y RSα agrupó a los aislados y a las estirpes control en dos clusters, uno formado por las estirpes 115, 665 y 9110 y *B. elkanii* SEMIA587 y 5019. El otro cluster incluyó a las estirpes control de *B. japonicum* y el resto de los aislados. En conclusión el uso combinado de los tres fingerprints resultó en una herramienta para la identificación precisa de las cepas naturalizadas que frecuentemente acumulan mutaciones.

La identidad de los aislados se confirmó con la secuencia del ITS (Intergenic Transcribed Spacer) de cada aislado (GenBank accession numbers: GI390136076 a GI390136091), estas fueron analizadas utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search de la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI). Este análisis confirmó el agrupamiento generado con fingerprints en dos grupos [*B. japonicum* (163, 366, 457, 2614, 2615, 458, 2112, 455 y 953) y *B. elkanii* (cepas: 115, 665, 9110)]. Los ITS se utilizaron para hacer un análisis

evolutivo en la Figura 4 se presenta los resultados y se puede observar que hay considerables niveles de evolución.

En conclusión hemos realizado análisis de diversidad de los suelos con y sin historia de cultivo de soja y en los dos identificamos potenciales competidores de las bacterias que se adicional a partir de los inoculantes. La presencia de pools de bacterias provenientes de diversas especies de leguminosas nativas y aún las estirpes naturalizadas, que se incorporan con los inoculantes comerciales, son fuente de genes que a través de la transferencia lateral y la recombinación pueden provenir de la incorporación de genes por transferencia lateral de genes asociados.

Considerando que la soja se cultiva en una extensa región de la Argentina que incluye muy distintos tipos de suelo y condiciones ambientales y que en estas bacterias es común la variación por transferencia horizontal de genes a partir de cepas dadoras, es probable que esté ocurriendo una suerte de evolución de grupos de bradyrizobios diferenciados por sus capacidades simbióticas que no son más que el resultado de variaciones a nivel genético. Futuros trabajos deberán orientarse a muestreos sistemáticos de diversas áreas de cultivo para analizar los rizobios de la soja.

Por otro lado se reporta la disponibilidad de satélites para la selección de cultivares con alta capacidad de nodulación, característica que además se demostró tiene cierta variabilidad en los cultivares comerciales de soja y por lo tanto el carácter puede ser objetivo de un plan de mejoramiento. Por otro lado sería interesante correlacionar la presencia de genes de resistencia a enfermedades y la capacidad de nodulación de los cultivares de soja, de manera de identificar si los genes R de la planta condicionan la respuesta simbiótica.

## Bibliografía

Balatti P.A. 2004. Competition an old unsolved problem of rhizobia nodulating soybean. In: Proceedings of the VII World Soybean Research Conference. F. Moscardi, C.B. Hoffman-Campo, O. Ferreira Saravia, F.C. Krzyzanowski, M. C. Carrao-Panizzi. February 29-March 5, 2004, Foz do Iguazu, Pr, Brazil.

Balatti P.A. 2007. La diversidad de los rizobios que nodulan la soja (*Glycine max* L. Merr).. En : De la biología a la agricultura. Alicia Thuar, Fabricio Cassán y Carmen Olmedo (Eds). Universidad de Rio Cuarto, Rio Cuarto, Córdoba, Argentina. ISBN 978-950-665-439-9

Barcellos F, Menna P, da Silva BJ et al (2007) Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium* (*Ensifer*) *fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. *Appl Environ Microbiol* 73:2635–2643

Broich SL, Palmer RG (1981) Evolutionary studies of the soybean: The frequency and distribution of alleles among collections of *Glycine max* and *G. soja* of various origin. *Euphytica* 30: 55–64.

Burkart 1943. Las leguminosas argentinas, silvestres y cultivadas Buenos Aires Acme Agency, Soc. de Resp. Ltda., 1943 - Legumes-590 pages

Camacho M, Santamaría C, Temprano F et al (2002) Soils of the Chinese Hubei province show a very high diversity of *Sinorhizobium fredii* strains. *Syst Appl Microbiol* 25:592–602

Chávez Diaz L.,Gonzalez P.,Rubio E. and Melchiorre M. 2013. Diversity and stress tolerance in rhizobia from Parque Chaqueño region of Argentina nodulating *Prosopis alba*. *Biol. Fertility of Soils* DOI 10.007s00374-013-0814-6

Chen WX, Wang ET, Wang SY et al (1995) Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *Int J Syst Evol Microbiol* 45:153–159

Chen WX, Yan GH, Li JL (1988) Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 38:392–397

Cleyet-Marel JC (1987) Dynamique des populations de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium* dans le sol et la rhizosphère. Thesis, Université Claude Bernard, Lyons

Crawford GW, Lee G-A (2003) Agricultural origins in Korea. *Antiquity* 77: 87–95.

De Bruijn F. J. Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction To Fingerprint the Genomes of *Rhizobium meliloti* Isolates and Other Soil Bacteria

dos Santos M.A., Nicolás M.F. and Hungria M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja Hungria(1) *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.41, n.0, p.000-000, xxx. 2006

Dowdle, S. F., and Bohlool B. B.. 1985. Predominance of fast-growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1171-1176.

Gurtler V. Stanisich V.A. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142, 3-36

Han LL, Wang ET, Han TX et al (2009) Unique community structure and biogeography of soybean rhizobia in the salinealkaline soils of Xinjiang, China. *Plant Soil* 324:291–305

Hungria M, Chueire L, Megias M et al (2006) Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. *Plant Soil* 288:343–356

Hymowitz T (2004) Speciation and cytogenetics. In: Boerma HR, Specht JE, eds. Soybeans: Improvement, production, and uses. Madison: American Society of Agronomy. pp 97–136.

Hymowitz T, Newell C (1981) Taxonomy of the genus *Glycine*, domestication and uses of soybeans. *Econ Bot* 35:272–288

Jordan D (1982) NOTES: transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slowgrowing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol* 32:136–139

Kaneko T., Nakamura Y., Sato S., Minamisawa K., Uchiumi T., Sasamoto S., Watanabe A., Idesawa K., Iriguchi M., Kawashima K., Kohara M., Matsumoto M., Shimpo S., Tsuruoka H., Wada T., Yamada M., and Tabata S. 2002. Complete Genomic Sequence of Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 DNA Research 9, 189–197 (2002),

Keyser, H. H., B. B. Bohlool, T. S. Hu, and D. F. Weber. 1982. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science* 215:1631-1632.

Koppell J.H. and Parker M.A. 2012 Phylogenetic clustering of *Bradyrhizobium* symbionts on legumes indigenous to North America *Microbiology* 158, 2050-2059.

Kuykendall L, Saxena B, Devine T et al (1992) Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can J Microbiol* 38:501–505

Li.Q.Q., Wang E.T., Zhang Y.Z., Zhang Y.M., Tian C.F., Sui X.H., Chen W.F. and Chen W.X. 2011. Diversity and biogeography of Rhizobia isolated from root nodules of *Glycine max* grown in Hebei Province, China. *Microb. Ecol.* 61, 917-931.

Lopez SMY and Balatti P.A. Closely related strains of *Bradyrhizobium* contained in commercial inoculates of soybean are identified by a set of PCR reactions 2011 *Genetic Engineering and Biotechnology Journal Genetic Engineering and Biotechnology* , Vol. 34

Man CX, Wang H, Chen WF et al (2008) Diverse rhizobia associated with soybean grown in the subtropical and tropical regions of China. *Plant Soil* 310:77–87

Nicola's M.F. , Hungria M, Arias C.A.A. Identification of quantitative trait loci controlling nodulation and shoot mass in progenies from two Brazilian soybean cultivars *Field Crops Research* 95 (2006) 355–366

Pastorino G N, Martinez Alcántara V, and P A Balatti 2003. Identification of fast and slow growing rhizobia nodulating soybean (*Glycine max* L. Merr) by a multiplex PCR reaction. *FEMS Microbiology Letters* 229, 153-158.

Salvucci, R.D. Aulicino M., Hungria M. and Balatti P.A. 2011 Nodulation capacity of Argentinean soybean (*Glycine max* L. Merr) cultivars inoculated with commercial strains of *Bradyrhizobium japonicum* *Journal of Plant Sciences*, 2012, 3, 130-140

Stepkowsky T., Zak M., Moulin L., Krolczak J., Golinska B., Narozna D., Safronova V.I. and Madrzak C.J.. 2011, vol 34 368-375.

Stukenbrock E.H. and Bruce A. McDonald The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems *Annu. Rev. Phytopathol.* 2008. 46:75–100

Thomas-Oates<sup>1</sup>, J. Bereszczak<sup>1</sup>, E. Edwards<sup>1</sup>, A. Gill<sup>1</sup>, S. Noreen<sup>1</sup>, J. C. Zhou, M. Z. Chen, L. H. Miao, F. L. Xie, J. K., Yang, Q. Zhou, S. S. Yang, X. H. Li, L. Wang, H. P. Spaink, H. R. M. Schlaman, M. Harteveld<sup>4</sup>, C. L. Díaz<sup>4</sup>, A. A. N. van Brussel, M. Camacho, D. N. Rodríguez-Navarro, C. Santamaría, F. Temprano, J. M. Acebes, R. A. Bellogín, A. M. Buendía-Clavería, M. T. Cubo, M. R. Espuny, A. M. Gil, R. Gutiérrez, A. Hidalgo, F. J. López-Baena, N. Madinabeitia, C. Medina<sup>6</sup>, F. J. Ollero, J. M. Vinardell, and J. E. Ruiz-Sainz 2003 A Catalogue of Molecular, Physiological and Symbiotic Properties of Soybean-Nodulating Rhizobial Strains from Different Soybean Cropping Areas of China System. *Appl. Microbiol.* 26, 453–465.



Tian C.F., Zhou Y.J., Zhang Y.M., Li Q.Q., Zhang Y.Z., Li D.F., Wang S., Wang J., Gilbert L.B., Li Y.R. and Chen W.X. 2012, Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations. *Proceedings of the National Academy of Science* Vol 109, 1629-1634.

Trinik M.J. 1980. Relationships amongst the fast-growing rhizobia *Labdium purpureum*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *J. of Appl. Bacteriol.* 49, 39-53.

Vinuesa P, Leon-Barrios M, Silva C et al (2005) *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:569–575

Wang H, Man CX, Wang ET et al (2009) Diversity of rhizobia and interactions among the host legumes and rhizobial genotypes in an agricultural-forestry ecosystem. *Plant Soil* 314:169–182

Wang J.Y., Wang R., Zhang Y.M., Liu H.C., Chen W.F., Wang E.T., Sui X.H. and Chen W.X. *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2013), 63, 616–624

Willems A., Coopman R., Gillis M., 2001 Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analysis of *Bradyrhizobium* species. *Int.J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 111-117

Willems A., Munive A., de lajudie P. and Gillis M. 2003. In most *Bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer regions corroborates DNA-DNA hybridizations. *System. Appl. Microbiol.* 26: 203-210.

Xu LM, Ge C, Cui Z et al (1995) *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int J Syst Bacteriol* 45:706–711

Yang JK, Zhang WT, Yuan TY et al (2006) Genotypic characteristics of the *rrn* operon and genome of indigenous soybean bradyrhizobia in cropping zones of China. *Can J Microbiol* 52:968–976

Yang, S Tanga F., Gao M., Krishnan H.B., and Hongyan Zhua R gene controlled host specificity in the legume–rhizobia symbiosis [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1011957107](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1011957107)

Yao ZY, Kan FL, Wang ET et al (2002) Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:2219–2230

Zhang, Y.M., Li, Y Jr., Feng Chen W., Wang E.T., Tian C.F., Qin Qin Li, Yun Zeng Zhang, Xin Hua Sui, and Wen Xin Chen 2011 Biodiversity and Biogeography of Rhizobia Associated with Soybean Plants Grown in the North China Plain *Applied and Environmental Microbiology*, Sept. 2011, vol 77 6331–6342